

**JUGLONUN BÜYÜK BALMUMU GÜVESİ *GALLERIA
MELLONELLA* L. (LEPIDOPTERA: PYRELIDAE)'DA
OKSİDATİF VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Emine DUMAN

Aralık, 2017

Eskişehir

**JUGLONUN BÜYÜK BALMUMU GÜVESİ *GALLERIA MELLONELLA* L.
(LEPIDOPTERA: PYRELIDAE)'DA OKSİDATİF VE GENOTOKSİK
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Emine DUMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hülya ALTUNTAŞ

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Aralık, 2017

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1608F610 no.'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Emine Duman’ın “Juglonun Büyük Balmumu Güvesi *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyrelidae)’da Oksidatif ve Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi” başlıklı tezi **08/12/2017** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Hülya ALTUNTAŞ	
Üye	: Prof. Dr. Z. Ulya NURULLAHOĞLU	
Üye	: Doç. Dr. Gözde AYDOĞAN KILIÇ	

Prof. Dr. Ersin YÜCEL

Enstitü Müdürü

ÖZET

JUGLONUN BÜYÜK BALMUMU GÜVESİ *GALLERIA MELLONELLA* L. (LEPIDOPTERA: PYRELIDAE)'DA OKSİDATİF ve GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Emine DUMAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aralık, 2017

Danışman: Doç. Dr. Hülya ALTUNTAŞ

Bu çalışmada, önemli bir fitokimyasal bileşen olan juglonun, bal mumu zararlısı ve model böcek olan *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) üzerindeki oksidatif ve genotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında değerlendirilen tüm parametrelerin araştırılması böceğin zararlı olduğu larva evresi üzerinde yapıldı. Bu amaçla *G. mellonella* türünün birinci evre larvalarının besinlerine farklı dozlarda saf juglon uygulanarak, juglonun insektisidal etkisi probit analizi kullanılarak belirlendi. Zararlı türün larval dönemi üzerinde insektisidal etki gösterdiği belirlenen juglonun, letal (LD₉₉) ve ortalama letal dozu (LD₅₀) sırasıyla 6,1 ve 2,3 mg/2g besin olduğu tespit edildi. Letal dozlara bağlı kalarak çalışma kapsamında hedeflenen ekotoksik ve genotoksik analizler için LD₅₀'nin altında kalan etkin dozlar 0,5, 1 ve 2 mg/2g besin olarak belirlendi. Besinsel juglon uygulanan ve uygulanmayan *G. mellonella* son evre larval hemolenflerinde antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, CAT ve GST) ile MDA miktarı doza bağlı değişimler gösterirken, GPx enzim aktivitesinde herhangi bir değişimin olmadığı belirlendi. Larval dönem üzerinde juglonun genotoksik etkilerinin olup olmadığı ise COMET yöntemi ve mikronükleus analizi ile belirlendi. Bu analizler sonucunda da doz artışına bağlı olarak genomda önemli hasarın ortaya çıktığı tespit edildi. Çalışma sonuçları juglonun etkin dozlarının zararlı ve model böcek olan *G. mellonella*'nın larval evresi üzerinde ekotoksik ve genotoksik etkili olduğunu göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Juglon, *Galleria mellonella*, Antioksidan Sistem, Genotoksikoloji, Comet Yöntemi.

ABSTRACT

OXIDATIVE AND GENOTOXIC EFFECTS OF JUGLONE ON THE GREATER WAX MOTH *GALLERIA MELLONELLA* L. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

Emine DUMAN

Department of Biology

Programme in General Biology

Anadolu University, Graduate School of Sciences, December, 2017

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hülya ALTUNTAŞ

In this study aimed to investigate the effects of the oxidative and genotoxic effects of juglone which is an important phytochemical compound on the greater wax moth *G. mellonella*; an model organism and a serious pest in wax. Investigation of all parameters assessed within the scope of the study was carried out on the larvae, the harmful stage of the pest. For this purpose, the insecticidal effect of the juglone was determined with probit analysis by applying technical juglone at different doses to the diets of the first instars of *G. mellonella*. Juglone showed insecticidal effect on the larval stage of the pest and lethal (LD₉₉) and median lethal doses (LD₅₀) were determined as 6.1 and 2.3 mg/ 2g in diet, respectively. According to LD₅₀ dose of juglone, the effective doses of 0.5, 1 and 2 mg in 2 g of diet were used for the ecotoxic and genotoxic analyses. It was determined that antioxidant enzyme activities (SOD, CAT, and GST) and the amount of MDA showed dose-dependent changes in hemolymph of last instars of *G. mellonella* treated with dietary juglone doses with respect to untreated larvae, but it was determined that there is no change in GPx enzyme activity in treated and untreated larvae. To determine whether juglone has genotoxic effects on larvae, DNA fractions and micronucleus formation were analyzed using COMET and micronucleus assays. As a result of these analyzes, it was determined that significant damage occurred in the genome of insect due to the increase of the juglone doses. In conclusion, our project results show that effective doses of juglone are ecotoxic and genotoxic on the larval stage of pest and model organism *G. mellonella*.

Keywords: Juglone, *Galleria mellonella*, Antioxidant System, Genotoxicology, Comet Assay.

TEŞEKKÜR

Yapmış olduğum çalışmalar süresince her daim bilgi, tecrübe ve deneyimleri ile yanımda olan, akademik anlamda ilerleme ve gelişme kaydetmeme yardımcı olan, yenilikçi bakış açısı ile ufkumu genişleten ve her daim destekçim olan saygıdeğer danışmanın Doç. Dr. Hülya ALTUNTAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim. Çalışmalarım içerisinde yer alan ve tarafımda ilk kez gerçekleştirdiğim COMET Analizleri ile ilgili bilgi, tecrübe ve deneyimlerini benden esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Gözde KILIÇ AYDOĞAN ve Yard. Doç. Dr. Volkan KILIÇ ile değerli arkadaşım doktora öğrencisi Şeyda UÇARCAN'a teşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarım süresince aynı laboratuvar ortamını paylaştığım, gerektiğinde yardımlarını benden esirgemeyen değerli çalışma arkadaşım yüksek lisans öğrencisi Selin ÇİM'e de sonsuz teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni büyük bir özveri ile yetiştiren, maddi ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen sevgili annem Sevgi DUMAN, sevgili babam Hüseyin DUMAN ve canım kardeşlerim Mustafa DUMAN ve Yurdagül DUMAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Emine DUMAN

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Emine DUMAN

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
GÖRSELLER DİZİNİ	xi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Allelokimyasallar ve Juglon.....	5
1.2. Böceklerde Antioksidan Sistem	8
1.3. Genotoksisite	15
1.4. <i>Galleria mellonella</i> Linnaeus, 1758 (Büyük Balmumu Güvesi)	18
1.4.1. Sistematikteki yeri.....	19
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
2.1. <i>Galleria mellonella</i> Stok ve Süksesif Kültürlerinin Kurulması.....	21
2.2. <i>G. mellonella</i> Larval Besinine Juglon Uygulanması ve İnsektisidal Dozun Belirlenmesi	22
2.3. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	23
2.3.1. Homojenizasyon	23
2.3.2. Protein miktarlarının belirlenmesi.....	24
2.3.3. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin belirlenmesi.....	25
2.3.4. Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi	26
2.3.5. Glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesinin belirlenmesi	27
2.3.6. Glutasyon S transferaz (GST) aktivitesinin belirlenmesi.....	28
2.3.7. Malondialdehid miktar tayini.....	28
2.4. COMET Analizi (Tek Hücre Jel Elektroforezi) ile DNA Hasarının Belirlenmesi	30
2.5. Mikronükleus Testi.....	32
2.6. İstatistiksel Analiz.....	32
3. BULGULAR.....	34
3.1 İnsektisidal Etki	34

3.2. Antioksidan Enzim Aktiviteleri ve MDA Miktarı	35
3.2.1. SOD enzim aktivitesi.....	35
3.2.2. CAT enzim aktivitesi	35
3.2.3. GPx enzim aktivitesi	36
3.2.4. GST enzim aktivitesi.....	37
3.2.5. MDA miktar analizi.....	38
3.3. Juglonun <i>G. mellonella</i> Hemositleri Üzerine DNA Hasar Tespiti	39
3.4. Juglonun <i>G. mellonella</i> Hemositlerinde Mikronükleus Analizi.....	42
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	44
KAYNAKÇA.....	55
ÖZGEÇMİŞ	79

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1. <i>Galleria mellonella</i> yarısentetik besiyeri bileşenleri	22
Tablo 2.2. Süperoksit dismutaz aktive ölçümü bileşenleri (1 adet mikropatekuyucuğu için).	26
Tablo 2.3. Katalaz aktivite ölçümü bileşenleri.....	27
Tablo 2.4. Glutasyon-S-transferaz aktivite ölçümü bileşenleri.	28
Tablo 2.5. Malondialdehid miktar tayini bileşenleri.	30
Tablo 3.1. Farklı dozlarda Juglon uygulanan <i>G. mellonella</i> 'nın larval evresinde letal dozlar (LD ₁₀ , LD ₂₀ , LD ₃₀ , LD ₄₀ , LD ₅₀ , LD ₉₅ ve LD ₉₉).	34
Tablo 3.2. <i>Galleria mellonella</i> larval besinine farklı dozlarda uygulanan Juglona bağlı olarak antioksidan enzim aktiviteleri ve MDA miktarındaki değişimler.....	39
Tablo 3.3. <i>Galleria mellonella</i> larvalarına farklı dozlarda uygulanan Juglona bağlı olarak hemositlerde belirlenen DNA hasarının oranları ve istatistiksel değerlendirmesi.....	41
Tablo 3.4. <i>Galleria mellonella</i> larvalarına farklı dozlarda uygulanan Juglona bağlı olarak hemositlerde mikronükleus oluşumunda görülen değişimler.	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Juglonun kimyasal yapısı	7
Şekil 1.2. Süperoksit dismutaz enzim reaksiyonu	12
Şekil 1.3. Katalaz enzim reaksiyonu	12
Şekil 1.4. Glutasyon peroksidaz enzim reaksiyonu	13
Şekil 2.1. Protein standart grafiği.....	24
Şekil 2.2. SOD standart eğri grafiği	26
Şekil 2.3. MDA standart grafiği	29
Şekil 3.1. Juglonun <i>G. mellonella</i> 'nın son evre larval hemolenfindeki SOD aktivitesine etkileri. Sütunlar üç tekrarın ortalamasını, çubuklar ise standart hata verilerini göstermektedir. Sütunlar üzerindeki farklı harfler (a-c) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD).	35
Şekil 3.2. Juglonun <i>G. mellonella</i> 'nın son evre larval hemolenftteki CAT aktivitesine etkileri. Sütunlar üç tekrarın ortalamasını, çubuklar ise standart hata verilerini göstermektedir. Sütunlar üzerindeki farklı harfler (a-b) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD).	36
Şekil 3.3. Juglonun <i>G. mellonella</i> 'nın son evre larval hemolenftteki GPx aktivitesine etkileri. Sütunlarüç tekrarın ortalamasını, çubuklar ise standart hata verilerini göstermektedir. Sütunlar üzerindeki aynı harfler (a) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p \geq 0,05$, ANOVA, LSD).	37
Şekil 3.4. Juglonun <i>G. mellonella</i> 'nın son evre larval hemolenftteki GST aktivitesine etkileri. Sütunlarüç tekrarın ortalamasını, çubuklar ise standart hata verilerini göstermektedir. Sütunlar üzerindeki farklı harfler (a-b) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD).	38
Şekil 3.5. Juglonun <i>G. mellonella</i> 'nın son evre larval hemolenftteki MDA miktarına etkileri. Sütunlarüç tekrarın ortalamasını, çubuklar ise standart hata verilerini göstermektedir. Sütunlar üzerindeki farklı harfler (a-b) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD).	39
Şekil 3.6. Besinsel juglonun etkin dozlarının <i>G. mellonella</i> larval hemositlerinde oluşturduğu DNA hasarının kuyruk yoğunluğu (% DNA Tail), kuyruk momenti (Tail Moment) ve kuyruk göçü (Tail Migration) ortalamasının karşılaştırılması.	42

GÖRSELLER DİZİNİ

Görsel 1.1. <i>Galleria mellonella</i> larva (a-b), pup (c), ergin bireyi (d).	20
Görsel 3.1. COMET analizine ait SYBR Green ile boyanmış <i>G. mellonella</i> larval hemositlerinin floresans mikroskobu görüntüleri, a: DNA hasarı olmayan hemositler, b: DNA hasarı olan hemositler.....	41
Görsel 3.2. Giemsa boyama yöntemi ile boyanan hemositler ve mikronükleusların mikroskopik görüntüsü (100X objektif).	43

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ANOVA	: Varyans analizi
ATP	: Adenozin trifosfat
BSA	: Bovin serum slbumin
CAT	: Katalaz
CDNB	: 1-kloro-2,4-dinitrobenzen
COMET	: Tek Hücre Jel Elektroforezi
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EPA	: Avrupa Koruma Ajansı
GPx (GSHPx)	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSSG	: Oksitlenmiş glutasyon
GST	: Glutasyon-S-transferaz
H	: Hidrojen
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
H ₂ SO ₄	: Sülfürik asit
IPM	: Birleşik Zararlı Yönetimi
LD ₅₀	: Ortalama letal doz
LD ₉₉	: Letal doz
LMPA	: Düşük kaynama dereceli agaroz
MDA	: Malondialdehit
MN	: Mikronükleus

NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
NMA	: Normal kaynama dereceli agaroz
O ₂	: Moleküler oksijen
PBS	: Fosfat tamponu
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Süperoksit radikali
TBA	: Tiyoarbütirik asit
XOD	: Ksantin oksidaz
g	: gram
mA	: mili amper
mg	: miligram
ml	: mililitre
mm	: milimetre
n	: örneklem sayısı
nm	: nanometre
° C	: Santigrat derece
µg	: mikrogram
µl	: mikrolitre

1. GİRİŞ

Dünya üzerinde yaşamakta olan her canlının temel gereksinimleri arasında neslini devam ettirme içgüdüğü bulunmaktadır. Canlının neslini devam ettirebilmesi için beslenme, korunma, habitat ve üreme faaliyetlerini gerçekleştirmesi gerekmektedir. Bu faaliyetlerin tümü biyolojik gerekliliğin bir parçasını oluşturmaktadır. Bir canlının üreme yeteneğinin artmasına bağlı olarak populasyon yoğunluğu da artmakta, buna bağlı olarak da beslenme, korunma ve habitat sorunlarıyla karşılaşmaktadır. Bu sorunlar ekosistem içerisinde yer alan kontrol mekanizmaları ile giderilmektedir. Böylece canlı sistemler müdahale edilmediği takdirde ekosistem tarafından oluşturulan denge ile kendi düzenini korumaktadır. Beslenme, habitat, korunma ve üreme ile ilgili ortaya çıkabilecek olumsuzluklar insanın da içinde bulunduğu tüm canlıları etkilemektedir. Ancak insanı diğer canlılardan ayıran düşünme yetisi, bu problemler karşısında farklı çözüm yollarının geliştirilmesine neden olmuştur. İnsanın geliştirmiş olduğu teknoloji, hastalıklar ile mücadele edilmesinde, habitat sorunlarının giderilmesinde ve beslenme ile ilgili alternatifler bulmasıyla kendi populasyon yoğunluğunu daha da artırmaktadır. Fakat insan tarafından sunulan bu alternatifler aynı zamanda ekosistemin kendi içinde sahip olduğu dengeyi de bozmaktadır.

Küresel problemlerden biri olan beslenme problemi çözüme ulaştırılması gereken öncelikli konular arasında yer almaktadır. Beslenme ile ilgili yaşanan problemler, verimli tarım alanlarının azalmasına ve tarımsal ürünlerin şuanki insan populasyonu için yetersiz kalmasına bağlıdır. Bu nedenle bu problemin giderilmesinde, daha az alandan daha fazla besin içeriğine sahip ürünlerin yetiştirilmesi konusunda çalışmalar yapılmaktadır. Ancak besinlerin üretimi ve depolanması sırasında zararlı organizmalar tarafından istilaya uğraması ekonomik kayıplarla birlikte gıda kalitesi eksikliği, ağırlık kaybı, çimlenme noksanlığı gibi nedenlere bağlı olarak da kitlesel kayıpların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Tulaganov, 1995). Bununla birlikte yaşanan diğer bir problem ise tarım ürünlerinin üretim, hasat ve depolanması sırasında yaşanan problemlerdir. Bunlar arasında yer alan tarımsal ürünlerin enfekte olmaları, zararlılar tarafından istilaya uğraması gibi önemli problemlerinde göz ardı edilmemesi gerekmektedir. Bu yüzden besinlerin üretimi ve bu ürünlerden elde edilen hammadde ve maddelerin depolanması sırasında zararlı organizmalar ile mücadele edilmesi gerekliliği doğmaktadır.

Zararlı organizmalar ile mücadele yöntemlerinde ekonomik kaygılar ve sonuca daha hızlı ulaşılması nedeniyle sıklıkla kimyasalların kullanılması tercih edilmektedir. Son yıllarda insektisitlerin en sık kullanılan kimyasal mücadele yöntemi olduğu ve bunların zararlı tür üzerindeki etkileri ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır (Kudon vd.,1988; Ahmad vd., 1995; Hill ve Foster, 2000; Nowak vd., 2000). Aynı zamanda bu kimyasalların canlıların dayanıklılık kazanması, çevredeki yararlı organizmaların, bal arılarının, kuşların ve balıkların kitlesel yok oluşları, besin zinciri aracılığıyla insanlara kadar ulaşmasıyla da kanserojen, teratojen ve mutajen etkiler gibi olumsuz sonuçlara neden olarak ekolojik dengenin bozulmasına sebep olduğu bilinmektedir (Cox, 1996; Lee vd., 1996; Ahmad vd., 1997; Rick ve Relyea, 2005; Szatkowska vd., 2012; Mineau ve Whiteside, 2013). Kimyasal kullanımı sonucunda ortaya çıkan bu olumsuz etkilerin azaltılması amacıyla birçok pestisit kullanımına kısıtlama ya da yasaklama getirilmektedir. Bununla birlikte sürdürülebilir tarım uygulamalarının devamlılığının kimyasal pestisit tüketiminin azaltılarak çevre dostu alternatif tekniklerin geliştirilmesine bağlı olduğu da vurgulanmaktadır (Azizoğlu vd., 2012; Çelik vd., 2012). Bu amaçla insan ve çevre üzerine olumsuz etkileri olmayan, maliyeti düşük, geniş spektrumlu, sera ve tarla koşullarında hastalık ve zararlıların kontrol altına alınmasında kullanılabilecek biyoinsektisitlerin belirlenmesi gerekmektedir (Lenteren-Van, 1995; Rabasse ve Van, 1999). Biyoinsektisitlerin kullanımında başvuru olan mücadele yöntemleri “Entegre Mücadele” (Birleşik Zararlı Yönetimi) programı kapsamında ele alınmaktadır. Entegre mücadele yönteminde, kültür bitkileri ve ürünlerine ait hastalık, zararlı ve yabancı otların çevre ile ilişkileri göz önüne alınarak populasyon yoğunluklarının ekonomik ölçüler içinde korunması sağlanmaktadır. Bu yöntem birden fazla kimyasal, biyolojik ve fiziksel yöntemi içermekte ve kullanılan yöntemler birbirini tamamlayacak şekildedir. Bu yöntemin temel aldığı prensipler insan ve çevre sağlığının korunmasını, ürün miktar ve kalitesindeki kayıpların engellenmesini ve tüm girişimlerin ekonomik olmasını içermektedir (Özkan, 2012).

Entegre mücadele programlarında, biyolojik aktiviteleri ve doğada birikime uğramamaları gibi birçok sebeple doğal biyoaktif ürünlerin kullanımına yönelik çalışmalar artış göstermektedir. Bu durum ile ilgili olarak Avrupa Koruma Ajansı (EPA, Enviromental Protection Agency) tarafından bazı pestisitler düşük riskli ya da çevre dostu olarak nitelendirilmiştir. ABD ve birçok AB ülkesinde çevre dostu pestisitlerin ruhsatlandırılması kolaylaştırılmış ve kullanımları için bazı teşvikler getirilmiştir.

Benzer bir durum ülkemizde de son 5 yıllık süreçte değişerek Gıda -Tarım ve Havyancılık Bakanlığı 2013 - 2017 Stratejik Planı içerisinde kendine yer edinmiştir. Bu değişiklikler bitki ve hayvan sağlığı ile refahını sağlayacak yeni hizmetlerin geliştirilmesi ve entegre mücadele çalışmalarında çevreye en az zararı verecek pestisitlerin kullanılabileceğine yönelik yenilikleri içermektedir. Son yıllarda, bu çevre dostu insektisitler içerisinde, çeşitli insektisidal etkiye sahip aktif bileşenleri bulunan fitokimyasallar önem kazanmıştır. Bu çalışmadaki hipotez ise Gıda - Tarım ve Havyancılık Bakanlığı 2013 - 2017 Stratejik Planı ve zararlı böcekler ile yapılan entegre mücadele çalışmalarında fitokimyasalların kullanılması göz önüne alınarak oluşturulmuştur. Bu amaçla, önemli bir bitkisel metabolit ve fitokimyasal olan Juglonun entegre mücadele çalışmalarında doğal insektisit olarak kullanılıp kullanılamayacağı sorusu *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarında meydana gelen, biyokimyasal ve genotoksik etkilerin belirlenmesi ile araştırılmıştır.

Lepidoptera takımı özellikle Pyralidae familyasına ait türler, tarımsal ve endüstriyel açıdan önemli olan bitkilerde ciddi derecede ekonomik kayıplara neden olan zararlı organizmalar arasında yer almaktadır. Ülkemizde, ekonomik ve besinsel değeri yüksel olan bitkilerde ve hasat sonrası elde edilen tarımsal ürünlerde milyonlarca liralık kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle bu zararlı türler ile entegre mücadele çalışmalarında kullanılacak yeni yöntemlerin araştırılması ve geliştirmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. Zararlı Lepidoptera türlerinin laboratuvar koşullarında kültüre alınarak gözlenmesiyle elde edilen sonuçlar zararlı organizmalar ile mücadele çalışmalarına yardımcı olmaktadır (Al-izzi vd., 1987). Ayrıca kimyasal uygulamalar sonrası böceklerde gerçekleşen metabolik faaliyetlerin fizyolojik ve moleküler düzeyde aydınlatılmasına da olanak sağlamaktadır (Mandato vd., 1997; Pohlen ve Baldwin, 2001; Büyükgözel, 2002a, 2002b; Tinaz vd., 2002). Böylece laboratuvar ortamında yapılan analizler biyopestisit adayı olarak düşünülen doğal bileşiklerin böcekler üzerinde biyolojik, toksikolojik ve genotoksik etkilerinin değerlendirilebilmesini de mümkün kılmaktadır.

Zirai kazanç sağlayan meslek grupları arasında yer alan arıcılık ülkemizde de çalışmaları yoğun olarak yapılan ve bal arısı kolonilerinden hayvansal ürünlerin elde edilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Bal, polen, balmumu, arı sütü, propolis gibi bal arıları tarafından üretilen ürünler insan sağlığı, beslenme ve ekonomik açıdan oldukça

önemli bir yere sahiptir. Bununla birlikte arılar, bitkilerde tozlaşmaya yardımcı olarak ekolojik açıdan önemli bir görevi de yerine getirmektedir. Bu nedenle, bal üretimi, depolanması ve balmumu yapımı sürecinde karşılaşılan zararlı organizmalar ile mücadele edilmesi ekonomik ve ekolojik açıdan önemli bir olgudur. Bu çalışmada kullanılan model organizma, büyük balmumu güvesi *G. mellonella* arıcılık sektöründe büyük kayıplara neden olan arı zararlıları arasında ikinci sırada yer almaktadır (Selçukoğlu, 1999). Büyük balmumu güvesi ile mücadelede sıklıkla asetik asit, naftalin ve kükürt gibi çevre dostu olmayan kimyasallar kullanılmakta ve bu kimyasallar da insan ve hayvan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir (Kumova ve Korkmaz, 2002). Bu mücadelede sıklıkla kullanılan naftalin, zamanla balmumunda birikime uğrayarak kovanda yaşayan bal arılarında ve diğer canlılarda toksikolojik ve mutajenik etkilere neden olmaktadır (Moosbeckhofer vd., 1995; Uğurlu, 2000). Bu nedenle bal mumu zararlısı *G. mellonella*'ya karşı yapılan mücadele çalışmalarında insan dâhil diğer canlıları olumsuz yönde etkileyen kimyasalların yerine daha çevre dostu biyopestisitlerin kullanılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Juglon, Juglandaceae, Ebenaceae, Boraginaceae, Bignoniaceae, Droseraceae ve Nepenthaceae gibi bitkiler tarafından sentezlenen ve sekonder metabolitler içerisinde yer alan naftokinonlar ile benzer yapıya sahip sentetik aromatik bir hidrokarbon bileşiğidir (Babula vd., 2009). Naftokinonlar ve çeşitli bitki sekonder bileşiklerinin ve bitkisel ekstratların herbivor böcekler üzerinde, larval ölümlere, larval beslenmenin engellenmesine (antifeedant etki), büyümelerinin inhibe edilmesine ve çeşitli insektisidal etkilere neden olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Emam vd., 2009; Jeyasankar vd., 2010; Rattan ve Sharma, 2011; Şeref-Gün vd., 2011; Paul ve Sohkhlet, 2012). Daha önce yapılan bu çalışmalardan bazılarında fitokimyasallar içerisinde yer alan ve naftokinon özellikli bitki sekonder bileşiği olan Juglonun, çeşitli fitofag böceklerde toksik, beslenme engelleyici ve bu türlerin yumurta açılım oranları üzerinde olumsuz etkili olduğuna ait bilgiler verilmiştir (Gilbert vd., 1967; Yu, 1987; Lindroth vd., 1990; Sorokin ve Whitaker, 2008). Aynı zamanda, bazı herbivor lepidopter türleri üzerinde juglon ve bazı naftokinonların toksik etkili olduğunu gösteren az sayıda çalışma da bulunmaktadır (Yu, 1987; Thiboldeaux vd., 1994; Sun vd., 2007). Cespedes vd. (2016)'nin yaptığı bir çalışmada ise fasulyenin mahsülü ve depolanması sırasında zararlı olan *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) ve *Epilachna varivestis* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) türlerinde

juglonun metanollü ekstraktlarının pupal gelişim, beslenme ve büyüme regülatörleri üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenlerden dolayı, çevre dostu biyopestisitler için bir alternatif olabileceği düşünülen juglonun hem zararlı hem de model böcek olarak değerlendirilen *G. mellonella* türü üzerindeki oksidatif ve genotoksik etkileri tez çalışması kapsamında değerlendirildi.

Böceklerle ait immün savunma sistemleri ile böcek hemositlerinin morfolojik özellikleri, embriyonik orjinleri, ameboid hareketleri ve fagositik aktiviteleri memelilerin sistemleriyle büyük oranda benzerlik göstermektedir. Bu nedenle patojenik, genotoksik ve biyokimyasal çalışmaların *in vivo* ortamda gerçekleştirilmesinde bazı böcek türleri iyi bir fizyolojik model oluşturmaktadırlar (Jones, 1964; Kavanagh ve Reeves, 2007; Cook ve McArthur, 2013). Büyük bal mumu güvesi *G. mellonella* türü de laboratuvar şartlarında kolayca kültürü yapılabilmesi ve memeli hücre dizileri ile benzer biyokimyasal, fizyolojik ve immünolojik tepkiler vermesi nedeniyle birçok çalışmada model organizma olarak kullanılmaktadır (Altınçiçek vd., 2007; Kavanagh ve Fallon, 2010; Junqueira, 2012; Cook ve McArthur, 2013; Altuntaş, 2015a, 2016). Bu nedenle, çalışma kapsamında iyi bir model organizma olan *G. mellonella* türü tercih edildi.

Bu çalışmada, zararlı tür *G. mellonella*'nın birinci dönem larvalarına farklı dozlarda katı juglon uygulamaları yapılarak günlük takipleri gerçekleştirildi. Bu işlemler sonrasında larval ölüm oranlarına göre doz belirlenmesi çalışmaları istatistiksel olarak değerlendirildi. İstatistiksel analizler sonrasında belirlenen ortalama letal doza göre bu dozun altında kalan üç farklı juglon dozu etkin doz olarak belirlendi. Bu dozlara bağlı *G. mellonella*'da meydana gelen fizyolojik stresin belirlenmesi amacıyla larval hemolenfte antioksidan enzimlerden katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon-S-transferaz (GST) enzimlerinin analizleri ile lipid peroksidasyonu (malondialdehit) seviyeleri analiz edildi. Bununla birlikte larval hemositlerde juglon ilişkili genotoksik etkilerin belirlenmesi amacıyla Comet ve Mikronükleus analizleri yapıldı.

1.1. Allelokimyasallar ve Juglon

Canlı sistemler çevrelerinde bulunan düşmanlarına karşı çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmiştir. İnsan ve hayvanlar hareket yeteneğine sahip oldukları için tehlike durumlarında savunma ya da kaçma davranışı sergilerken, bitkiler ise bazı

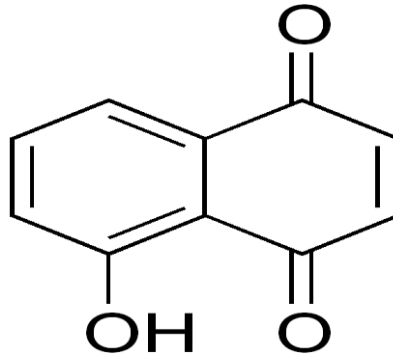
kimyasal maddeler sentezleyerek tepki göstermektedirler. Bitkiler tarafından sentezlenen bu kimyasal bileşikler primer ve sekonder bileşikler olarak iki temel sınıfa ayrılmaktadır. Bu bileşiklerden olan sekonder metabolitlerin bitkinin bulunduğu ortama adaptasyonu, üremeye yardımcı olması ve bitki savunması gibi durumlarda rol aldığı bilinmektedir. Primer metabolitler ile karşılaştırıldığında daha kompleks yapıda olan sekonder bileşikler bitkilerde kimyasal çeşitliliği de arttırmaktadırlar (Topçu ve Çöldeşen, 2015).

Bir bitki tarafından sentezlenen ve salıverilen bazı kimyasal maddelerin bitki türüne bağlı olarak komşu bitkileri olumlu veya olumsuz açıdan etkilemesi *allelopati* olarak tanımlanmaktadır. Allelopatik yönden etkili olan bu kimyasallara ise allelokimyasal madde denilmektedir. Rice (1984) bitki sekonder metabolitleri ve primer metabolik yollara ait yan ürünlerden oluşan allelokimyasalları şu şekilde sınıflandırmıştır;

1. Basit suda çözünebilir organik asitler (Düz zincirli alkoller, alifatik aldehytler),
2. Basit doymamış laktonlar,
3. Uzun zincirli yağ asitleri ve poliasetilenler,
4. Naftokinonlar, antrokinonlar ve kompleks kinonlar,
5. Basit fenoller, benzoik asit ve türevleri,
6. Sinnamik asit ve türevleri,
7. Flavonoidler,
8. Taninler,
9. Terpenoidler ve steroidler,
10. Amino asitler ve polipeptidler,
11. Alkoloidler ve siyanohidrinler,
12. Sülfidler ve glikozitler,
13. Pürinler ve nükleotidler.

Bitkilerde bulunan sekonder metabolitlerin, böceklerin uzaklaştırılması, beslenmelerinin engellemesi ya da durdurulması, üreme ve yumurta açılımının azaltılması gibi insektisidal etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Isman, 2000; Adeyemi, 2010; Rattan ve Sharma, 2011; Omar vd., 2012; Aydın ve Mammadov, 2017).

Juglon (5-hidroksi-1,4-naftokinon) ceviz ağaçlarının yeşil yapraklarında bol miktarda bulunan allelokimyasal özellikli bitki sekonder metabolitleri arasında yer almaktadır. Hidroksil ve keto grupları arasında molekül içi H- bağı içeren juglon bir benzokinon türevi olarak naftokinonlar, antrokinonlar ve kompleks kinonlar grubunda bulunmaktadır (Rice, 1984; Fila vd., 2008; Jin, 2010). Şekil 1.1’de kimyasal yapısı gösterilen Juglon ($C_{10}H_6O_3$; *moleküler ağırlık: 174,16 g·mol⁻¹*), ceviz türlerinin kök ve yaprak özütlerinden izole edilmiş ve cevizin latince ismine izafeten Juglon olarak isimlendirilmiştir (Rietveld, 1983).



Şekil 1.1. Juglonun kimyasal yapısı

Cevizin yeşil kabuk ve yapraklarında, oksidatif stresi indirgeyerek ve makromoleküler oksidasyonu engelleyerek dejeneratif hastalıklara karşı koruyucu etki sağlayan fenolik maddeler ve flavonoidlerin olduğu bilinmektedir. Bu maddeler içerisinde yer alan juglonun çeşitli organizmalarda sitotoksik, antiviral, antifungal, antiinflamatuvar, antikanserojenik ve genotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Inbaraj ve Chignell, 2004; Paulsen ve Ljungman, 2005; Clark vd. 2006; Yiğit vd. 2009; Im vd., 2010; Milind-Parle ve Deepa, 2011; Saling vd., 2011; Li vd., 2013).

Naftokinonlar ile benzer yapıya sahip sentetik aromatik bir hidrokarbon bileşiği olan Juglon, Juglandaceae, Ebenaceae, Boraginaceae, Bignoniaceae, Droseraceae ve Nepenthaceae gibi bitkiler tarafından da sentezlenmektedir (Babula vd., 2009). Naftokinonların da içinde bulunduğu çeşitli bitki sekonder bileşiklerinin ve bitki ekstratlarının herbivor böceklerde larval ölümlere, larval beslenmenin engellenmesine, büyümelerinin inhibe edilmesine ve çeşitli insektisidal etkilere neden olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Emam vd., 2009; Jeyasankar vd., 2010; Rattan ve Sharma, 2011; Şeref-Gün vd., 2011; Paul ve Sohkhet, 2012). Daha önce yapılan buna benzer çalışmaların bazılarında ise Juglonun çeşitli fitofag böceklerde toksik, beslenme

engelleyici ve bu türlerin yumurta açılım oranları üzerinde olumsuz etkili olduğu bildirilmiştir (Gilbert vd., 1967; Yu, 1987; Lindroth vd., 1990; Sorokin ve Whitaker, 2008).

Juglon ile yapılan bu çalışmalarda kabuk böceği *Scolytus multistriatus* (Coleoptera: Curculionidae)'da beslenmesinin engellenmesine, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)'da ise gelişiminin azalmasına ve mortalitenin artmasına neden olduğu gösterilmiştir (Gilbert vd., 1967; Yu, 1987). *S. multistriatus* ve *S. frugiperda*' da meydana gelen bu değişimler ise besin tüketimi ve sindirilme oranlarının azalmasıyla ilişkilendirilmiştir.

Juglonun toksik etkisiyle ilgili yapılan bir başka çalışmada ise bir Lepidoptera türü olan *Limantria dispar* (Lepidoptera: Erebidae)'ın besinine düşük dozlarda juglon uygulamasına bağlı olarak, güvenin yaşamsal ve büyüme aktivitesinde, besin tüketim oranlarında ve pupal ağırlığında önemli derecede azalmanın ve gelişme zamanında uzamanın olduğu bildirilmiştir (Lindroth vd., 1990).

Juglon ve bazı naftokinonların Lepidopter türleri üzerinde toksik etkili olduğunu gösteren diğer çalışmalarda ise bazı Saturnid türlerin ve *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) türünün doz artışına bağlı olarak larval gelişim sürecinde uzamayla birlikte besin tüketim oranları ile larval-pupal vücut ağırlıklarında azalmanın olduğu belirlenmiştir (Thiboldeaux vd., 1998; Piskorski vd., 2011).

Kabak zararlısı *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) ile yapılan başka bir çalışmada ise, larvalara uygulanan subletal dozlardaki Juglonun antifeedant etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Akhtar vd., 2012).

Cespedes vd. (2016)'nin yaptığı bir çalışmada ise Juglonun metanollü ekstraktlarının hasat ve depolanma sırasında fasulye zararlısı olan *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) ve *Epilachna varivestis* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) türlerinde pupal gelişimi, beslenmeyi ve böcek büyüme regülatörlerini olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir.

1.2. Böceklerde Antioksidan Sistem

Canlı organizmalar, canlılığın devamı için sürekli olarak anabolizma ve katabolizma reaksiyonları ile gerekli ihtiyaçlarını karşılamaktadır. Bu metabolik

reaksiyonların gerçekleşmesi sırasında gerekli olan enerji ATP molekülü tarafından sağlanmaktadır. Aeorobik organizmalarda solunum ile alınan oksijenin % 98'i son elektron alıcısı olmakta ve ATP üretiminde kullanılmaktadır. Geriye kalan oksijen molekülleri ise oksijenazlar tarafından serbest oksijen radikallerine (SOR) dönüştürülmektedir (Tülüce, 2005; Eren, 2008).

Atomik ya da moleküler yapıda eşleşmemiş elektronu bulunan, kısa ömürlü, kararsız ve oldukça reaktif özelliklere sahip organik veya inorganik moleküller serbest oksijen radikalleri olarak isimlendirilmektedir (Nordberg ve Arner, 2001; Yıldızdaş, 2003; Tülüce, 2005; Kara, 2009). Bir serbest radikal kararsız ve çiftleşmemiş elektronları nedeniyle radikal olmayan bir moleküle elektron verebilir ya da o molekülden elektron alabilir. Bu elektron alışverişi yeni bir serbest radikalın oluşmasına neden olmakta ve bu tepkime zincirleme olarak devam etmektedir (Kara, 2009).

SOR oluşumu endojen ve ekzojen kaynaklı etmenler sonucunda gerçekleşmektedir. Endojen kaynaklı SOR oluşumu metabolik olaylar sonucunda oksijene fazladan elektron eklenmesine bağlı olarak süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerinin ortaya çıkmasıyla oluşmaktadırlar. Tarımsal alanlarda zararlı organizmalar ile mücadele çalışmalarında kullanılan herbisitlerin, organofosforlu insektisitlerin, kimyasal karsinojenlerin, diğer organik ve inorganik çevresel kirleticilerin aşırı dozlarda, denetimsiz ve bilinçsizce kullanımları sonucunda oluşan SOR molekülleri ise ekzojen kaynaklıdır (Isman, 2006; Senthil-Nathan, 2013).

Ortaya çıkan SOR molekülleri hücre içerisindeki proteinler, lipitler ve diğer çeşitli moleküller ile etkileşime girerek hücre bütünlüğünün bozulmasına neden olmaktadır. Hidroksil ve peroksit radikallerinin hücre membranında bulunan fosfolipitler ile etkileşimi sonucunda membranın stabilitesini ortadan kaldırarak hücrelerin hızla bozulmasına neden olmaktadır (Cutler vd., 2005; Eren, 2008; Tekcan, 2009). Bununla birlikte üç veya daha fazla çift bağa sahip olan yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda malondialdehit (MDA) oluşmaktadır (Heinle ve Betz, 1994; Tülüce, 2005; Halliwell ve Gutteridge, 2007). Lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan MDA miktarındaki artış membran akışkanlığının, membranın stabilitesinin ve yapısal bütünlüğünün bozulmasına neden olmaktadır. Bu durum hücre membranında gerçekleşen iyon alışverişine etki ederek bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açmaktadır, bunun sonucunda da iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi

gibi olumsuzluklar ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, MDA DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebildiğinden hücreler için genotoksik ve karsinojenik bir özelliğe de sahiptir (Tülüce, 2005).

DNA molekülünün replikasyonu sırasında meydana gelen modifikasyonlar mutasyonlara ve genetik bozukluklara neden olmaktadır. Bununla birlikte SOR molekülleri çekirdek membranını etkileyerek nukleustaki genetik materyal üzerinde de etki etmektedir. Böylece DNA'nın kırılması ve mutasyonlara açık hale gelmesine neden olmaktadır. Hidroksil radikali gibi SOR molekülleri deoksiriboz ve bazlarla kolayca etkileşime girerek genetik materyal üzerinde değişikliklere yol açmaktadır. Bu nedenle SOR ile indüklenen hücresel modifikasyonların DNA hasarlarının en ciddi olduğu düşünülmektedir (Ardağ, 2008; Tekcan 2009).

Membran yapısında meydana gelen değişimlerin neden olduğu başka bir durum ise iyon transportunun, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun, enzimlerin, hormonların ve nörotransmitter maddelerin olumsuz yönde etkilenmesine sebep olmaktadır (Yıldızdaş, 2003; Eren, 2008; Kara 2009). Proteinlerde meydana gelen değişimler fragmentasyon, çapraz bağlanma, protein agregasyonu sonucunda konformasyon ve fonksiyon bozukluklarıdır (Yıldızdaş, 2003). Ayrıca proteinlerin aminoasit dizilimlerine, hücresel konumlarına ve serbest radikalın toksisite gücüne bağlı olarak oluşacak hasar boyutlarını değiştirmektedir (Tülüce, 2005). Proteinlerde görülen değişimlere ek olarak monosakkaritlerin otooksidasyonuna neden olan SOR molekülleri hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitlerin oluşmasına neden olmaktadır (Tülüce, 2005).

Artmış SOR'a bağlı meydana gelen zararlar şu şekilde özetlenebilir;

- Hücre organelleri ve membranındaki lipit ve protein yapısını bozarlar,
- Hücre içi yararlı enzimleri etkisizleştirirler,
- DNA'yı tahrip ederler,
- Mitokondrilerdeki aerobik solunumu bozarlar,
- Elastaz, proteaz, fosfolipaz, ksantinoksidaz, indolamin, galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktive ederler,
- Hücrenin potasyum kaybını arttırırlar,
- Trombosit agregasyonunu arttırırlar,

- Dokulara fagosit toplanmasını kolaylaştırırlar,
- Hücre dışındaki kollagen doku bileşenlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar (Özkaya, 2007),
- Bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sisteminin etkisini azaltırlar (Ardağ, 2008).

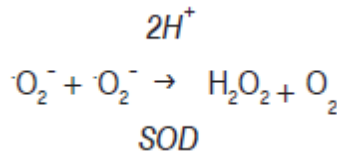
SOR moleküllerinin neden olduğu bu değişimler hücre tarafından telafi edilemediği takdirde hücrenin ölümüne sebep olmaktadır. Bu nedenle serbest radikallerin neden olduğu hasar organizmada meydana gelen fizyolojik onarım mekanizmaları ile onarılmaya çalışılmaktadır. Bu mekanizmaların başında ise antioksidan savunma sistemi yer almaktadır ve hücresel homeostazinin korunmasına yardımcı olmaktadır (Tülüce, 2005). Endojen ya da eksojen kaynaklı olan süperoksit radikalleri ile antioksidan savunma sistemi arasında bulunan denge, SOR moleküllerinin neden olduğu hasarı önleyemeyecek düzeye ulaştığında organizmanın oksidatif strese girmesine neden olmaktadır (Greathouse vd., 2005). SOR moleküllerine karşı görevli olan *antioksidan sistem elemanları*, yapılarında genellikle fenolik fonksiyonel gruplara sahip farklı oksidasyon reaksiyonlarının düzenlenmesinden sorumlu moleküllerdir (Cutler vd., 2005; Ardağ, 2008). Antioksidan sistem elemanları, kendi elektronlarını SOR moleküllerine aktarırken kendilerini reaktif forma dönüştürmeden kalabilen ve hücrenin korunmasında görev alan moleküllerdir (Özkaya, 2007).

Antioksidan sistem elemanları enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenlerden meydana gelmektedir. Enzimatik olmayan sistemde E vitamini (α tokoferol), C vitamini (askorbik asit), A Vitamini (retinol), selenyum, seruloplazmin, transferin, koenzim Q-10 bileşikleri tarafından oksidatif stres ile mücadele edilmektedir. Enzimatik sistemde ise katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksizdaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimler yer almaktadır (Meister ve Anderson, 1983; Diplock, 1998; Ou vd., 2002).

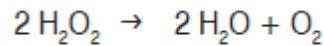
Antioksidan savunma sistemi elemanları SOR moleküllerini faz I (primer) ve faz II (sekonder) sürece ayırarak detoksifiye etmektedir. Primer savunmada oksidasyon, hidroliz ve indirgenme reaksiyonları meydana gelmektedir. Genellikle toksik olan maddenin biyolojik aktivitesinin azaltılmasından sorumlu faz I reaksiyonlarında yer alan enzimler, toksisiteyle ilgili sınırlandırılmış oranda bulunurlar. Bununla birlikte faz I metabolitleri toksik maddeyi vücuttan uzaklaştırılmak için yeterince polar yapıda

olabilirler, fakat genellikle faz II reaksiyonlarıyla daha ileriye dönüştürülmektedirler. Faz II reaksiyonlarında ise, polar ürünlere şeker, sülfat, fosfat, amino asit ya da glutatyon gibi çeşitli endojen maddelerin eklenmesiyle aktif moleküllerin uzaklaştırılması gerçekleştirilir (Grant, 1991; Timbrell, 1991).

Aerobik tüm hücrelerde hem sitozol hem de mitokondrilerde bulunan SOD enzimi, süperoksit radikallerini etkisizleştirerek, hücreleri süperoksit radikalının zararlı etkilerinden korumaktadır. İçeriğindeki metal iyonuna göre sitozolik dimerik Cu, Zn-SOD ve mitokondriyal tetramerik Mn-SOD olarak adlandırılan SOD enzimi, süperoksit anyonunun ($\cdot O_2^-$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijen molekülüne dönüşümünü katalize etmektedir (Şekil 1.2; Fang vd., 2002). H_2O_2 molekülü, biyolojik önemi olan moleküllerin çoğu ile spesifik olarak reaksiyona girmemesine rağmen daha reaktif oksidanların oluşumunda öncül madde olarak rol oynamaktadır. Bu molekül “katalaz” enzimi etkisiyle su ve oksijene dönüştürülmektedir (Şekil 1.3; Duthie vd., 1989). Peroksizomlarda ve sitozolde bulunan katalaz ise, yapısında hem içeren bir metalloproteinaz enzimi olarak redoks reaksiyonunu teşvik eden en etkili protein katalizörleri arasında yer almaktadır (Larson, 1988). Bununla birlikte metil hidroperoksit ve etil hidroperoksit gibi küçük moleküllerin indirgenmesini de sağlamaktadır.



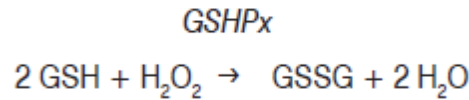
Şekil 1.2. Süperoksit dismutaz enzim reaksiyonu



Şekil 1.3. Katalaz enzim reaksiyonu

Serbest radikallerin yakalanmasında görevli olan enzimatik antioksidanlar arasında tiyol grupları içeren moleküller de bulunmaktadır. Birçok hücrede yüksek konsantrasyonlarda bulunan ve suda çözünebilir glutatyon, SOR moleküllerinin etkisini önleyen veya azaltan transferazlar ve peroksidazlar gibi birçok enzimin substratı olarak rol oynamaktadır. Aynı zamanda bir tiyol olan glutatyon, biyolojik membranları lipid

peroksidasyonuna karşı enzimatik reaksiyonlar ile korumaktadır (Di Mascio vd., 1991). Glutasyonun indirgenmiş formunu (GSH), oksitlenmiş hale (GSSG) dönüştürmekte görevli olan GPx (GSHPx) enzimi, yapısında tetramerik yapıda selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Bu enzim hidrojen peroksit ve hidroperoksitlerin indirgesini sağlamaktadır (Şekil 1.4). Bununla birlikte GSH ile birleşerek endojen ve ekzojen kaynaklı, elektrofilik ve hidrofobik toksik maddelerin daha az toksik olan ve suda çözünebilen ürünlere dönüştürülmesini katalizleyen GST enzimi bulunmaktadır. GST enzimi, birçok gen bölgesi tarafından ifade edilen homodimerik ya da heterodimerik yapıda olan Faz II detoksifikasyon enzim ailesinin bir üyesidir (Dagget vd., 1998; Casalino vd., 2004; Baş, 2006). GST enzimi antioksidan aktivitelerine ek olarak çok önemli başka biyokimyasal fonksiyonlara da sahiptir; hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak; ksenobiyotiklere indirgenmiş glutatyondaki sisteine ait –SH grubu bağlayarak, onların elektrofilik bölgelerini nötralize ederler ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlar. Böylece oluşan bu GSH konjugatları organizmadan atılmakta veya daha ileri metabolitik yollar için substrat olarak kullanılmaktadır (Habig vd., 1974; Tülüce, 2005; Baş, 2006). Ayrıca besinlerle alınan toksik maddelerin, metabolik işlemleri sırasında, alınan besinlerin besinsel değerlerini kaybettirmeksizin eliminasyonuna da yardımcı olmaktadır (Baş, 2006).



Şekil 1.4. Glutasyon peroksidaz enzim reaksiyonu

Diğer canlılarda olduğu gibi böceklerde de endojen ve ekzojen kaynaklı oksidatif stres ajanlarının etkilerini ortadan kaldırmak ya da azaltmak için antioksidan savunma sistemi bulunmaktadır (Ahmad, 1992; Felton ve Summers, 1995; Barbehenn vd., 2001; Nordberg ve Arner, 2001; Krishnan ve Sehna, 2006; Fahmy, 2012). Bu savunma sistemi de enzimatik ve enzimatik olmayan sistem olarak ikiye ayrılmaktadır. Enzimatik savunma sisteminde başlıca yer alan CAT, SOD, GPx, GST gibi enzimlerle birlikte (Ahmad vd., 2005; Krishnan ve Kodrik, 2006), sadece böceklerde bulunan bazı enzimlerde keşfedilmiştir. Bunlar, *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) türünün larva evresinde antioksidant enzim askorbat peroksidaz ve *Drosophila melanogaster*

(Diptera: Drosophilidae)'da ise tiyoredoksin peroksidaz enzimleridir (Mathews vd., 1997; Missirlis vd., 2003). Bununla birlikte, SOR moleküllerinin neden olduğu hücre zarında ve diğer hücresel lipid yapılarında, doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen atomunun çıkarılmasıyla başlayan lipid peroksidasyonu sonucu malondialdehit gibi (MDA) aldehit türevlerinin oluşumu da görülmektedir. Bu nedenle, lipid peroksidasyonun bir göstergesi olarak MDA miktarındaki değişimler de belirlenmektedir (Ahmad vd., 1995; Mano vd., 1995; Krishnan vd., 2009).

Böceklerde antioksidan ve detoksifikasyon enzimleri aracılığıyla fenolik ve kinonlar gibi bitkisel allelokimyasalların detoksifikasyonu sağlanmaktadır (Kaur vd., 2014). Özellikle de herbivor böceklerin allelokimyasallara karşı primer adaptasyonlarının enzimatik detoksifikasyonların gerçekleşmesi ile sağlandığı bilinmektedir (Ahmad vd., 1986). Çünkü juglon gibi bitkisel fenolik bileşikler orta bağırsaktaki yüksek pH ya da bitki polifenol oksidazlar nedeniyle böcek vücudunda okside edilirler. Bu okside bileşikler ise canlıda reaktif oksijen türlerinin artmasına neden olarak antioksidan sistemi etkileyebilir (Felton vd., 1989; Felton ve Duffey, 1991; Thiboldeaux vd., 1998). Bu konuyla ilgili yapılan bir çalışmada, Lepidoptera türü *L. dispar*'ın doğal besinine uygulanan düşük dozlardaki juglona karşı uyum sağladığı ve bu uyumda kinin redüktaz ile GST enzimlerinin rol oynadığı ifade edilmiştir (Lindroth vd., 1990). Bununla birlikte bazı bitkisel fenollerin böceklerdeki GST aktivitesini inhibe ettiği de bildirilmiştir (Lee, 1991; Wheeler vd., 1993; Yu ve Abo-Elghar, 2000; Yu ve Huang, 2000). Başka bir çalışmada ise 1,4-Naftokinonlara karşı birçok Lepidopter türünün dirençli olmamasına rağmen sadece pervane böceği *Actias luna* (Lepidoptera: Saturniidae) türünün yüksek konsantrasyonlarda bile direnç kazandığı belirlenmiştir. Bu dirençliliğin nedeni ise juglonun detoksifikasyonunun sağlanması amacıyla kinon redüktaz aktivitesinin yükselmesiyle ilişkisi olabileceği şeklinde bildirilmiştir (Thiboldeaux vd., 1994).

Böceklerde allelokimyasallara karşı meydana gelen antioksidan değişimlerle ilişkili daha önce yapılan bu çalışmalar göz önüne alınarak, bu çalışmada da juglonun böceğin antioksidan sistemi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. *G. mellonella* larvalarında antioksidan sistem üzerindeki etkiler, CAT, SOD, GPx ve GST enzim aktivitelerindeki değişimler ile belirlenirken, hücre lipid yapılarında meydana gelen değişiklikler ise Malondialdehit (MDA) miktarındaki değişimler ile analiz edilmiştir.

1.3. Genotoksisite

Canlı sistemler çeşitli kimyasal, fiziksel ya da çevresel stresörlere maruz kaldıklarında genetik yapılarında da önemli değişiklikler meydana gelmektedir. Bu stres ajanlarının genetik materyal üzerinde oluşturdukları toksikolojik etkiler genotoksik etki olarak bilinmektedir (Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010). Genotoksisite, DNA’da yapısal değişiklikler oluşturarak ya da DNA sarmalında kırılmalara yol açarak hasara neden olan her türlü ajan için kullanılabilen bir terimdir (Ündeğer ve Başaran, 2005). Bu nedenle genotoksisite DNA yapısında değişiklikler oluşturabilen ya da kırıklara neden olabilen çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanların bu yolla oluşturdukları hücresel disfonksiyonları kapsar. Bununla birlikte bu ajanların neden olduğu fizyolojik, biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerin genetik yapıyla da ilişkili olduğu laboratuvar ya da doğal ortamda gözlemlenebilmektedir (Gichner vd., 2009; Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010). Bu nedenle kimyasal ajanların DNA’da meydana getirmiş oldukları hasarın belirlenmesiyle ilgili çalışmalar son yıllarda önem kazanmıştır (Çavaş ve Könen, 2007; Yılayaz, 2008; Muranlı-Gökalp ve Güner, 2011; Eskandari vd., 2012; Pavela, 2013; Packiam vd., 2015).

1970’lerden başlayarak günümüze kadar mutajenik ve genotoksik maddelerin karsinojenik potansiyellerini ölçebilmek için birçok genotoksisite testi geliştirilmiştir (Bedir vd., 2004). *In vitro* ve *in vivo* olarak geliştirilmiş olan bu testler, çeşitli mekanizmalarla doğrudan ya da dolaylı olarak genetik materyalde meydana gelen hasarları saptamaktadır (Choy, 2001; Zeiger, 2004; Vural, 2005). DNA hasarının belirlenmesi ile ilgili çok sayıda teknik kullanılmasına rağmen bunların birçoğunun zaman ve maliyet gerektirmesi nedeniyle, aynı zamanda bazı çalışmalarda radyoaktif maddelerin kullanılması ve çalışmadan elde edilen sonuçların beklenildiği gibi başarılı olmaması bu alanda yapılan çalışmalar için bir dezavantajdır (Tice vd., 2000; Gichner vd., 2009). Son 10 yıl içinde ise DNA’da hasar olup olmadığını, varsa hasar seviyelerinin anlaşılmasını sağlayan “tek hücre jel elektroforez” veya “COMET Analizi” isimli yeni bir moleküler test geliştirilmiş ve bahsedilen sorunlara cevap olarak tıp ve biyoloji alanlarında yapılan çalışmalara yeni bir boyut kazandırmıştır (Koçyiğit vd., 2005; Lin vd., 2007; Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010; Şekeroğlu-Atlı ve Şekeroğlu, 2011).

COMET analizi, kimyasal ve fiziksel mutajenlerin, bazı kalıtsal hastlıkların ve kanserin neden olduğu DNA’da meydana gelen tek ve çift zincir kırıklarının tespitinde kullanılan hassas, güvenilir ve hızlı bir yöntemdir (Şekeroğlu-Atlı ve Şekeroğlu, 2011). Bununla birlikte COMET analizinde kullanılacak hücrelerin mitotik olarak aktif olmaları gerekmediğinden DNA hasarının tespitinde kullanılan diğer sitogenetik yöntemlere göre daha avantajlıdır (Hayashi vd., 1998). Bu yöntemde ökaryotik canlıdan izole edilen DNA, düşük kaynama dereceli agaroz süspansiyonu ile önceden fikse edilerek elektroforetik ortamda yürütülür. Hasara uğramış DNA moleküllerinin tek veya çift DNA zincirlerinde meydana gelen kırılmalar ise farklı molekül ağırlıkları ve elektrik yüklerine göre farklı hızlarda göç ederler. DNA spesifik boyalar ile boyanan slaytlar görüntülendiklerinde ise hasarlı hücrelerde kuyruklu yıldız benzer DNA kırıkları görülmektedir (Sing vd., 1988).

Canlılarda çevresel kimyasallara bağlı ortaya çıkan DNA hasar seviyesinin COMET yöntemi ile belirlenmesi genellikle insan veya memeli hücrelerinde gerçekleştirilmektedir (Collins vd., 1995; Duthie ve Collins, 1997; Van-Goethem vd., 1997; Cotellet ve Ferard, 1999; McNamee vd., 2000). Bu çalışmalarla birlikte bazı omurgasız hayvanlarda özellikle de sucul organizmaların hemositlerinde COMET yöntemi ile genotoksik hasar tespiti yapılmıştır (Siu vd., 2004a; Woźnicki vd., 2004; Türkez vd., 2010; Martínez-Paz vd., 2013; Kurt ve Kayış, 2015). *Drosophila melanogaster* ile yapılan bir çalışmada ise insektisit olan “cypermethrine”e maruz kalan larvaların beyin gangliyonlarında ve ön bağırsaklarında doz artışına bağlı olarak DNA hasarında önemli derecede artış olduğu COMET analizi ile gösterilmiştir (Mukhopadhyay vd.,2004). Benzer bir çalışma mutajenik ve genotoksik özellikleri bilinen, etil metanosülfanat, metil metanosülfonat, N-etil N- nitrosetura ve siklofosfamid gibi alkilleyici ajanların da *D. melanogaster*’de DNA hasarına neden olduğu COMET analizi ile bildirilmiştir (Siddique vd., 2005). Bir başka çalışmada ise *Chorthippus (Glyptobothrus) brunneus* larvalarından elde edilen hücrelerin hidrojen peroksit ile muamele edilmesi sonrası DNA hasarına neden olduğu da aynı analiz ile değerlendirilmiştir (Augustyniak vd., 2014).

Bitki sekonder bileşiği olan juglonun memeli hücrelerde çeşitli dozlarının apoptoziye, nekroziye, DNA parçalanması için DNA topoizomera II’nin uyarılmasına, p53 protein seviyelerinin azalmasına, transkripsiyonun inhibisyonu ile hücrel

ölümünün indüklenmesine neden olduğu gösterilmiştir (Sugie, 1998; Paulsen ve Ljungman, 2005; Montenegro, 2010). Yapılan bu çalışmalar da juglonun genotoksik hasara neden olduğu görülmektedir. Bu nedenle çalışma kapsamında juglonun *G. mellonella* hemositlerinde meydana gelen DNA hasarı tespit edilmiştir. Ayrıca omurgasızlarda, özellikle böceklerde DNA hasarının belirlenmesi için COMET analizlerinin de kullanılabilmesi için destek oluşturmaktadır.

Sitogenetik hasarın tespit edilmesinde sıklıkla kullanılan yöntemlerden bir diğeri ise mikronükleus (MN) analizidir. Mikronükleuslar, mitoz bölünmenin anafaz evresi sırasında bazı kromozomlar ya da kromozomal fragmentlerin nükleus dışında kalarak hücrenin tüm yaşam döngüsü süresince sitoplazmada bulunmasıyla ortaya çıkmaktadır (Siu vd., 2004a). Yapılan son çalışmalarda kimyasal bir ajana maruz kalan canlının ekotoksikolojik risk değerleri için COMET ile MN analizlerinin birlikte değerlendirildiği görülmektedir (Zang vd., 2000; Woźnicki vd., 2004; Çavaş ve Könen, 2007; Eskandari vd., 2012). Ayrıca böcek hemositlerinde çevresel kimyasallara bağlı olarak yapısal anomali artışının veya sayısal değişikliklerin görüldüğü de bilinmektedir (Yeh vd., 2005). Bu nedenle hemositlerde görülen değişimler, çevresel risk değerlendirme çalışmalarında, özellikle de genotoksik etkilerin ortaya çıkarılmasında biomarker olarak değerlendirilebilirler. Bazı çalışmalarda böceklere uygulanan pestisitlerin genotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde, mikronükleus analizinin kullanıldığı görülmektedir (Siu vd., 2004b; Bolognesi vd., 2011). Ancak omurgasız hayvanlarda özellikle de böceklerde MN analizi ile sitogenetik hasar belirleme çalışmaları sınırlı sayıdadır ve bu çalışmalar genellikle Mollusca filumunda bulunan canlılarda çevresel kirliliğin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir (Burgeot vd., 1995; Venier vd., 1997; Carvalho Pinto-Silva vd., 2003). Uçkan ve Sak (2010) tarafından yapılan bir çalışmada ise konak *G. mellonella*'nın larval besinine farklı dozlarda cypermethrin uygulanmıştır. Bu insektiside maruz kalan konak larvalarından elde edilen puplar endoparazitoid *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae)'ye sunularak, parazitoidin konak yoluyla insektiside maruz kalması sağlanmıştır. Böylece parazitoid larval hemositlerinde MN analizi yapılmıştır. Çalışmada cypermethrinin doz artışına bağlı olarak MN sayısının parazitoid hemositlerinde arttığı belirlenmiştir (Uçkan ve Sak, 2010). Bu bilgiler ışığında, çalışma kapsamında larval hemositlerde mikronükleus (MN) sayımı yapılarak, juglonun sitogenetik etkileri belirlendi. Ekotoksikolojik analizlerde DNA hasarının ve MN

oluşumunun birlikte analizlenmesi genotoksik materyalin uygulandığı canlıda zamana ve doza bağlı değişimlerin karşılaştırılmasına da olanak sağlamaktadır. Heddle vd. (1983)'ne göre MN oluşumuna neden olan kromozomal fragmantasyondan önce DNA kırılmaları ortaya çıkabilir.

Sonuç olarak daha önce yapılan bu çalışmalar Juglonun Lepidopter grupları içerisinde yer alan ve depo zararlısı olan *G. mellonella* üzerinde toksik ve genetik açıdan değişikliğe neden olabileceği hipotezinin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Bu nedenle, çevre dostu biyopestisitler için bir alternatif olarak düşünülen Juglonun hem zararlı hem de model böcek olarak değerlendirilen *G. mellonella* türü üzerindeki oksidatif ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. Aynı zamanda bu çalışma TÜBİTAK 214Z282 no'lu proje ile biyolojik verilerin, total karbonhidrat, total protein, total lipid miktarlarının ve larval homojenatta antioksidan enzimlerin araştırılması ile detaylandırılmıştır.

1.4. *Galleria mellonella* Linnaeus, 1758 (Büyük Balmumu Güvesi)

Büyük balmumu güvesi *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) tipik anatomik ve fizyolojik özelliklere, yüksek çoğalma yeteneğine sahip olması ve laboratuvar koşullarında kolayca kültürü yapılan bir tür olması nedeniyle birçok çalışma için model organizma olarak değerlendirilmektedir. *G. mellonella* larval dönemde zararlı olan bir kelebek türüdür. Arı bulunan her bölgede yaşamlarını sürdüren böceğin yumurtadan çıkan larvaları bal, bal peteği ve bal mumu ile beslenmektedirler. Larvaların beslenme amacıyla kullandığı bal peteklerinin tahrip olması ise arıcılık sektöründe büyük ekonomik zararlara neden olmaktadır. Ayrıca bu zararlı, peteklerde tünel açarak ve ağ örerek zayıf kovanların çökmesine dolayısıyla arı kolonisinin dağılmasına neden olmaktadır. *G. mellonella* tarafından, arı kovanlarına verilen bu zarar özellikle Ege, Marmara ve Karadeniz Bölgelerinde rakımı düşük ve nemi yüksek olan yerlerde sıklıkla karşılaşılan bir durumdur (Özer, 1961; Akçelik, 1987; Kwadha vd., 2017).

G. mellonella'nın gelişim süresi optimal koşullarda (30 °C, düşük larva yoğunluğu, kaliteli ve bol besin) yaklaşık 40 gün sürmektedir. Genellikle akşamüzeri ergin dişiler kovanlara girerek bal arılarının ulaşamayacakları yarık ve deliklere yumurta bırakırlar. Yumurtalar pembemsi krem veya beyazımtırak renkte olup 24-26

°C’de inkübasyon süresi ortalama 5-9 gündür. *G. mellonella* larvaları yumurtadan yeni çıktıklarında sarımtırak beyaz renkte olup oldukça hareketlidir. Gelişimini tamamlayan larva beyazımtırak kül renginde ve dorsal yüzeyi daha çok sarımtırak siyah renktedir. Larvalar polen, bal mumu, bal arısı, larval gömlekleri ve bal arısı atıkları ile beslenmektedirler. Beslendikleri besinin miktarına ve kalitesine göre boyutları ve ağırlıkları değişmektedir. Larvalarda 3 çift ön üye ve bir takım yalancı abdominal üye vardır. Sıcaklık ve besin varlığına bağlı olarak larval gelişim 1-5 ay arasında gerçekleşmekte ve bu süreçte larva pup oluncaya kadar yedi gömlek değişimi geçirmektedir. Larval gelişimin arkasından başlayan pupal dönemde, puplar öncelikle sarımsı veya açık kestane renginde olup, pupal dönemin sonuna doğru koyulaşmaktadırlar. Pupun dorsal düzlemin ortasında belirgin olan çizgi ergin çıkışında yırtılmaktadır. Pupun ventral yüzeyinde kanat, anten, hortum ve kopulasyon organları ayırt edilebilmektedir. Ayrıca V. ve VI. segmentler üzerinde yalancı abdomen üyeleri de görülmektedir. Pupal dönem sıcaklık ve neme bağlı olarak 8-14 gün sürmektedir. Pupadan yeni çıkış yapan ergin bireyler, kanatları henüz tam kurumamış ve kıvrık halde olduğundan uçmazlar. Kanatların uçmak için uygun hale gelmesi, kuruması erginin bulunduğu ortamın ısisına bağlı olarak iki saat içerisinde gerçekleşmektedir. Pupadan çıkış yapan ve geceleri aktif olan ergin dişi ve erkek bireyler 24 saat içinde çiftleşirler. Dişi bireyler çiftleştikten sonra yumurtlamaya başlarlar. Bir dişi tek seferde paketler halinde yaklaşık 100 yumurta bırakabilir ve hayatları süresince bıraktıkları yumurta sayısı 300- 600 arasında değişmektedir. Ergin dönemde beslenmeyen bireyler yaklaşık olarak 3-30 gün yaşayabilirler ve çiftleşen dişiler yumurtalarını bıraktıktan sonra 7 gün içerisinde ölürler (Özer, 1961; Akçelik, 1987; Kwadha vd., 2017).

1.4.1. Sistematikteki yeri

Alem: Animalia

Şube: Arthropoda

Sınıf: Insecta

Takım: Lepidoptera

Üstfamilya: Pyraloidea

Familya: Pyralidae

Altfamilya: Galleriinae

Cins: *Galleria* Fabricius, 1798

Tür: *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758)



Görsel 1.1. *Galleria mellonella* larva (a-b), pup (c), ergin bireyi (d)

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. *Galleria mellonella* Stok ve Süksesif Kültürlerinin Kurulması

Galleria mellonella'ya ait stok ve süksesif kültürlerinin yetiştirilmesi, Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Hayvan Fizyolojisi laboratuvarında yer alan D51-41 no.'lu iklim odasında gerçekleştirildi. İklim odası 28 ± 2 °C sıcaklık, % 60 $\pm$ 5 bağıl nem ve sürekli karanlık ortam koşullarına ayarlanarak stok ve süksesif kültürlerin devamlılığı sağlandı.

Stok kültürlerin oluşturulması amacıyla *G. mellonella*'ya ait 5 adet dişi ve erkek ergin bireyler içerisinde tablo 2.1'de içeriği verilen yarısentetik besiyeri (100 g) bulunan 1 litrelik cam kavanozlar içerisine alındı. Kavanozların üzerleri kültür ortamındaki havalandırmayı engellemeyecek şekilde gazlı bezlerle ve delikli kapaklar (larvaların bezi delerek kaçışını önlemek için) ile kapatıldı. Stok kültür kavanozuna alınan dişi ve erkek ergin bireylerin çiftleşmesinin ardından (5 gün sonra) ergin bireyler ortamdan uzaklaştırıldı. Yumurtadan çıkan larvaların besin ihtiyaçlarının giderilmesi ve atıkların uzaklaştırılması için haftada üç kez kültür bakımları yapıldı. Haftalık bakımlar sırasında son döneme ulaşan larvalar, içerisinde katlanmış kağıt bulunan 0,5 litrelik kavanozlara alınarak pupa girmeleri kolaylaştırıldı. Pup kavanozları 7-10 gün sonra kontrol edildi ve pupa giren larvalar ile kültürün devamlılığının sağlanması için ergin birey oluşumuna kadar takip edildi. Ergin bireyler ise stok kültürün devamlılığının sağlanması amacıyla kullanıldı. Stok kültürler sürekli olarak D51-41 no.'lu iklim odasında yukarıda bahsedilen fotoperyot koşullarında yetiştirildiler.

Deneyisel çalışmalarda kullanılmak üzere hazırlanan süksesif kültürler için yumurtadan çıkan birinci dönem *G. mellonella* larvaları kullanıldı. Bu amaçla stok kültürden alınan 1 adet dişi ve erkek ergin bireyler içerisinde 40 g steril edilmiş yarısentetik besiyeri (Tablo 2.1) bulunan 1 litrelik kavanozlar içerisinde çiftleştirildi. Ergin bireyler 5 gün sonra kavanozlardan uzaklaştırıldı. Kavanozlara bırakılan yumurtaların açılıp açılmadığı kontrol edildi ve yumurtadan çıkan larvalar ile deney setleri oluşturuldu. Süksesif kültür, stok kültür ile aynı fotoperyot ve sıcaklığın bulunduğu D51-41 no.'lu iklim odasında yetiştirildi.

Tablo 2.1. *Galleria mellonella* yarısentetik besiyeri bileşenleri

Besin Bileşimi	Miktar
Petek	100 g
Kepek	250 g
Polen	20 g
Bal	75 ml
Gliserin	150 ml
Safsu	75 ml

2.2. *G. mellonella* Larval Besinine Juglon Uygulanması ve İnsektisidal Dozun Belirlenmesi

Deneyisel çalışmalarda kullanılacak olan saf Juglon (Sigma) katı olarak kullanıldı. Ticari olarak elde edilen Juglon, tablo 2.1’de verilen steril edilmiş yarısentetik besiyeri içerisine mg/g oranında eklendi. Bu işlemler için her bir larvaya ait 2 g besinde 0.5, 1, 2, 3, 4 ve 5 mg juglon bulunan 50 ml’lik örnek kaplarında deney setleri oluşturuldu. Deney setlerinde bulunan birinci dönem larvalar süksesif kültürden elde edildi. Hazırlanan deney grupları D51-41 no.’lu ortam koşullarında larval gelişimleri tamamlanana kadar günlük olarak takip edildi. Tüm dozlar ve kontrol grubu için her tekrarında 20 adet larva kullanılan deney setleri 3 kez tekrar edildi (n= 60). Tüm tekrarlardan elde edilen larval ölüm oranları, juglonun LD₉₉ ve LD₅₀ değerlerinin belirlenmesi amacıyla Probit analizinde kullanıldı (Windows versiyon 18.0, SPSS, Chicago, IL).

Toksikolojik araştırmalarda canlıya uygulanacak olan maddenin dozlarının LD₅₀ değeri ve bunun altında kalan miktarlara göre yapılması gerektiği bilinmektedir (Piskorski vd., 2011; Dere vd., 2015; Altuntaş vd. 2016). Bu nedenle Juglonun *G. mellonella* üzerindeki oksidatif ve genotoksik etkilerinin belirlenmesinde probit analizi sonucunda belirlenen larval LD₅₀ değeri 2,309 mg/larva ($x^2= 10,676$, df= 5, P= 0,058) dikkate alınmıştır. Bu değer in öncülüğünde 0.5, 1 ve 2 mg/ 2g’lık juglon dozları oksidatif ve genotoksik etkilerin belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Bu analizlerde de juglon uygulaması insektisidal dozun belirlenmesinde olduğu gibi birinci dönem larvaların besinine katılarak sağlandı. Juglon uygulanan larvalar son döneme ulaşana kadar günlük olarak takip edildi ve son döneme ulaşan larvalar antioksidan enzim analizlerinde ve genotoksisite testlerinde kullanıldı.

2.3. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

2.3.1. Homojenizasyon

Juglonun LD₅₀ dozu dikkate alınarak, antioksidan enzim aktivite analizlerinde 0.5, 1 ve 2 mg/ 2g'lık dozları tablo 2.1'de verilen değerlere göre hazırlanmış yarisentetik ve steril edilmiş besiyeri içerisine katı olarak uygulandı. İçerisinde juglon bulunan besiyeri 50 ml'lik plastik örnek kaplarına alınarak süksesif kültürden elde edilen birinci dönem larvalar bu besiyerlerine konuldu ve hava sirkülasyonunun sağlanması için üzerileri gazlı bezler ve delikli kapaklar ile kapatıldı. Stok kültür ile aynı fotoperyot ve sıcaklık koşullarının bulunduğu ortamda yetiştirilen deney gruplarındaki larvalar son döneme ($0,17 \pm 0,02$ g) ulaşmaya kadar günlük olarak takip edildi. Son döneme ulaşan larvalar deney ortamından alındı ve antioksidan enzim analizlerinde kullanılmak üzere hemolenf toplama işlemleri gerçekleştirildi. Son döneme ulaşan larvaların yüzeyleri alkol ile temizlenerek buz üzerinde hareketlerinin yavaşlaması sağlandı. Hareketleri yavaşlayan larvaların 2. ön ekstremiteleri kesilerek her bir larvadan 10 µl hemolenf içerisinde 1 mg feniltiüre bulunan soğutulmuş mini santrifüj tüplerine alındı. Her bir tüpte 10 adet larvadan elde edilmiş 100 µl hemolenf bulunan mini santrifüj tüpleri antioksidan enzim analizleri yapılmaya kadar -80 °C'de depolandı. Antioksidan enzim analizlerinin aktivite kaybının olmaması amacıyla toplanan hemolenf örnekleri bir ay içinde çalışıldı.

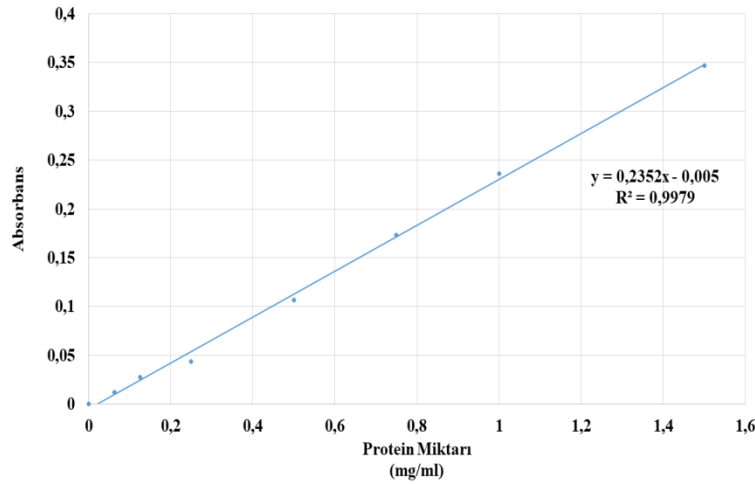
Juglonun *G. mellonella* üzerindeki antioksidan sistem üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla CAT, SOD, GPx ve GST enzimlerine ait aktiviteler belirlendi. Bu enzimlere ait aktivitelerin belirlenmesi amacıyla öncelikli olarak hemolenf örnekleri homojenize edildi. Homojenizasyon işlemi için 1:1 oranında soğuk homojenizasyon tamponu (50 mM fosfat tamponu, pH: 7,4) ve hemolenf örneği santrifüj tüpü içerisine alındı. Elde edilen bu karışım 10,000 g +4°C'de 15 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonrası elde edilen süpernatant enzim aktivite deneylerinde kullanıldı.

Lipit preoksidasyonunun bir belirteci olan MDA miktarının belirlenmesinde ise kullanılacak olan hemolenf örneklerinin homojenizasyonu için 30 µl hemolenf örnekleri 700 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant MDA miktar tayininde kullanıldı.

Antioksidan enzim aktive analizleri ve MDA miktar tayini için tüm işlemler her tekrarda 20 larva olacak şekilde 3 defa tekrar edildi (n= 60).

2.3.2. Protein miktarlarının belirlenmesi

G. mellonella larvalarında spesifik antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla hemolenfteki total protein analizi yapıldı. Bu amaçla Bradford (1976) yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde standart eğri grafiğinin oluşturulması için bovin serum albümünden (BSA) hazırlanan 0,2 - 1,5 mg/ml'lik aralığındaki standart solüsyonları hazırlandı. Hazırlanan standart solüsyonlarından 5 µl alınarak her biri üzerine 250 µl Bradford boyası eklendi. Bu işlemler mikropate içerisinde gerçekleştirildi ve her bir standart 3 kez tekrar edildi. Boya eklendikten 5 dakika sonra BIO-TEK Marka EPOCH Elisa Okuyucu cihazında - Gen 5 programında protein miktarları 595 nm'de okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden içerisinde homojenizasyon tamponu bulunan kör değeri çıkarılarak gerçek absorbans değerleri elde edildi. Gerçek absorbans değerleri kullanılarak oluşturulan standart grafiğine ait $y = 0,2352x - 0,005$ ($R^2 = 0,9979$) formülü elde edildi ve bu formül deney gruplarına ait hemolenfte bulunan protein miktarlarının belirlenmesi amacıyla kullanıldı.



Şekil 2.1. Protein standart grafiği

Juglon uygulanan ve uygulanmayan hemolenf örneklerine ait protein miktarlarının belirlenmesinde ise homojenize hemolenf örnekleri kullanıldı. Homojenize hemolenf örneklerinin standart grafiğinin aralığına girmesi için 50 kat homojenizasyon tamponu ile sulandırması gerçekleştirildi. Elde edilen absorbans değerlerinden standart doğru denklemi kullanılarak protein miktarları hesaplandı. Hemolenf içerisinde bulunan protein miktarları mg/ml cinsinden hesaplandı ve enzimlere ait spesifik aktivite hesaplamalarında kullanıldı.

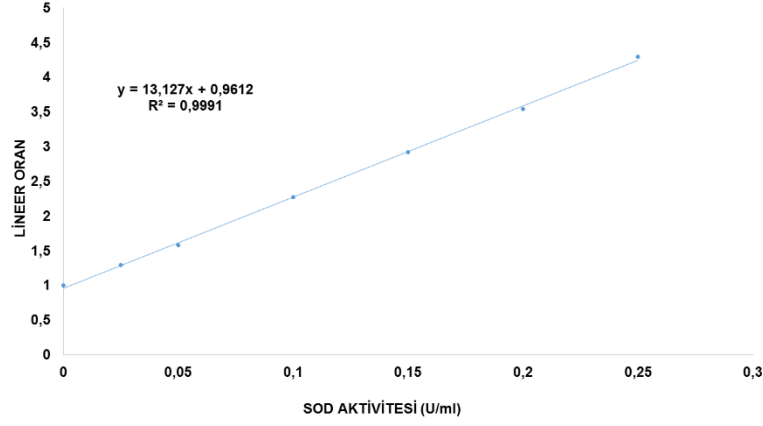
2.3.3. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin belirlenmesi

Juglon uygulanan ve uygulanmayan *G. mellonella* hemolenfinde SOD (EC 1.15.1.1.) enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Mccord ve Fridovic (1969) tarafından geliştirilen yöntemin esas alındığı ticari kit kullanıldı. Bu yöntem, SOD enziminin, süperoksit radikallerinin, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dismutasyonunu hızlandırması esasına dayanmaktadır. Böylece ksantin ve ksantinoksidaz (XOD) kullanılarak 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorür (INT) ile tepkimeye giren ve kırmızı renkli formazon boyası oluşturan süperoksit radikalleri ölçüldü.

SOD aktivitesinin belirlenmesinden önce ticari kit (CAYMAN, 706002) içerisinde verilen stok SOD enzimi kullanılarak standart çözelti ler çözelti ler (0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 ve 0.25 U/ml) hazırlandı. Standart çözelti ler kitte verilen oranlara göre (Tablo 2.2) mikrop late içerisinde standart grafiğinin oluşturulması amacıyla ölçüldü. Bu işlemler sırasında hazırlanan standart analiz karışımları oda sıcaklığında (karanlıkta) 20 dak inkübe edildi. İnkübasyon işleminin ardından 460 nm’de BIO-TEK Marka EPOCH Elisa Okuyucu cihazında - Gen 5 programında ölçüm yapıldı. Elde edilen absorbans değ erleri kitte verilen formüle göre lineer oran hesaplanmasında kullanıldı. Lineer oran hesaplaması ise, içerisinde enzim bulunmayan standart çözeltisine (0 U/ml = standart A) ait absorbans değ erinin sırayla diğ er standartlara ait absorbans değ erlerine bölünmesi ile elde edildi. Lineer oranlar ve SOD aktivitesi standart doğru denkleminin oluşturulmasında kullanıldı ve $y = 13,127x + 0,9612$ ($R^2 = 0,9991$) formülü elde edildi (Şekil 2.2).

Kontrol ve deney gruplarına ait SOD enzim aktivitesinin belirlenmesinde ise homojenize edilen hemolenf örnekleri kullanıldı. Hemolenf örneklerine ait absorbans değ erlerinin standart grafiğ in aralığına girmesini sağlamak için 1 µl homojenat, 114 µl kite ait örnek tamponu ile dilüe edildi. Bu işlemin ardından standartlara uygulanan ve tablo 2.2’de verilen değ erlere göre analiz karışımı mikrop late içerisinde oluşturuldu. 20 dakikalık karanlıktaki inkübasyonun ardından 460 nm’de BIO-TEK Marka EPOCH Elisa Okuyucu cihazında okuma yapıldı. Kontrol ve deney gruplarından elde edilen absorbans değ erleri lineer oranların belirlenmesinde kullanıldı. Örnekler için oluşturulan lineer oranlar, standart A absorbansının örnek absorbansına bölünmesi ile elde edildi. Lineer oran/ SOD aktivitesi doğru denklemi aracılığıyla örneklere ait enzim

aktiviteleri U/ml olarak hesaplandı. Örneklere ait spesifik enzim aktivitesinin belirlenmesi ise Bradford yöntemi ile elde edilen protein miktarları kullanılarak nmol/mg protein birimi olarak hesaplandı.



Şekil 2.2. SOD standart eğri grafiği

Tablo 2.2. Süperoksit dismutaz aktive ölçümü bileşenleri (1 adet mikropate kuyucuğu için)

	STANDART	NUMUNE
Radikal dedektör	200 µl	200 µl
Standart çözelti	10 µl	---
Enzim kaynağı	---	10 µl
Ksantinoksidaz	20 µl	20 µl

2.3.4. Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi

Juglon uygulamasına bağlı olarak *G. mellonella* larval hemolenfinde CAT (EC 1.11.1.6) enzim aktivitesinin belirlenmesi Chance ve Maehly (1955) tarafından belirlenen yöntemle göre gerçekleştirildi. Katalazın hidrojen peroksidi su ve moleküler oksijene yıkım hızının hesaplandığı bu yöntemde, *G. mellonella* hemolenfinde bulunan CAT enzim aktivitesinin belirlenmesi için enzim analizi kuvars küvet içerisinde gerçekleştirildi. Analiz karışımı tablo 2.3'te verilen oranlarda kuvars küvet içerisine konuldu. Reaksiyonun başlaması için son olarak enzim kaynağı olan homojenat karışımın içerisine eklenerek hızlı bir şekilde okuma gerçekleştirildi. Katalaz enzim aktivitesinde azalan hidrojen peroksit miktarının belirlenmesine bağlı olarak 3 dak boyunca azalan absorban değerlerine ait eğri 240 nm'de BIO-TEK Marka EPOCH Elisa Okuyucu cihazında - Gen 5 programında ölçüldü.

Elisa cihazının tekli ışık yoluna sahip olması nedeniyle örnekler ait okuma yapılmadan önce fosfat tamponu ile kör okuması yapıldı. Köre ait absorbands değeri, örnekler ait absorbands değerlerinden çıkarılarak gerçek absorbands değerleri elde edildi. Kontrol ve deney gruplarına ait elde edilen gerçek absorbands değerlerinden birim zaman başına azalan absorbands değişimleri tespit edildi. Elde edilen azalış miktarları ve sabit sayı (ϵ_{240} : $0,0394 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) kullanılarak katalaz enzim aktivitesi U/mg protein olarak hesaplandı.

Tablo 2.3. Katalaz aktivite ölçümü bileşenleri

	KÖR	NUMUNE
Fosfat tamponu (pH: 7,0)	1350 μl	1350 μl
Hidrojen peroksit (30 mM)	150 μl	150 μl
Fosfat tamponu (pH: 7,0)	10 μl	---
Enzim kaynağı	---	10 μl

2.3.5. Glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesinin belirlenmesi

Juglon uygulanan ve uygulanmayan *G. mellonella* larvalarına ait hemolenfte meydana gelen GPx (EC 1.11.1.9) enzim aktivitesindeki değişimler ticari deney kiti (CAYMAN, 703102) kullanılarak belirlendi. GPx enzimi, glutasyonun kümen hidroperoksit tarafından oksidasyonunu kataliz etmektedir. Okside glutasyon ise, glutasyon redüktaz ve NADPH varlığında hemen redükte olurken NADPH, NADP'ye okside olmaktadır ve NADPH miktarında azalma meydana gelmektedir. Paglia ve Valentine (1967) tarafından geliştirilen bu yöntemde de, GPx ile t-bütilhidroperoksit varlığında glutasyonun indirgenmesi tepkimesinde NADP'ye oksitlenen NADPH'nin 340 nm'de azalan absorbands değerinin zamana karşı okunmasına dayanmaktadır.

G. mellonella hemolenfinde Juglon maruziyetine bağlı GPx enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler için, ticari kitte verilen prosedürdeki gibi analiz tamponu (100 μl) (pH: 7,6 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA), co-substrat karışımı (50 μl) (NADPH, Glutasyon, GlutasyonRedüktaz) ve homojenat (20 μl) mikropate kuyucuklarına konuldu. Bu karışıma reaksiyonun başlaması için kümen hidroperoksit (20 μl) eklendi ve hemen ardından BIO-TEK Marka EPOCH Elisa Okuyucu cihazında - Gen 5 programında 340 nm dalga boyunda, 5 dakika süresince okuma yapıldı. Azalan

NADPH'nin absorbans değerleri ile ϵ_{340} : 0,00373 mM/cm katsayısı kullanılarak GPx enzim aktivitesi belirlendi. Enzime ait spesifik aktivitesinin belirlenmesi ise mg/ml protein miktarları kullanılarak nmol/mg protein/ dak cinsinden hesaplandı.

2.3.6. Glutasyon S transferaz (GST) aktivitesinin belirlenmesi

G. mellonella besinine uygulanan Juglon sonrası lavalarda görülen GST (EC 2.5.1.18) enzim aktivitesindeki değişimler Habig vd., 1974 tarafından geliştirilen, 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)'nin redükte glutasyon ile konjügasyonunu katalize eden toplam GST (mikrozomal ve sitozolik) aktivitesinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde konjuge CDNB'nin ölçülmesi amacıyla 100 mM CDNB (100 μ l), 100 mM GSH (*glutasyon*) (100 μ l) ve pH: 6,5 PBS (*fosfat buffer saline*) (9,800 ml) kullanılarak analiz kokteyli hazırlandı. Enzim kaynağı olarak kullanılacak olan homojenat ve analiz kokteyli tablo 3.4'te verilen oranlarda mikrolate kuyucuklarına eklendi. Bu işlemlerden sonra reaksiyon başladığı için hızlı bir şekilde mikrolate BIO-TEK Marka EPOCH Elisa Okuyucu cihazına konuldu ve 340 nm'de 5 dakika süresince okuma yapıldı. CDNB'nin redükte glutasyon ile reaksiyona girmesine bağlı olarak oluşan tioether yapısının yükselen absorbans değerleri elde edildi. Elde edilen absorbans değerlerinden ϵ_{340} : 0,00503 μ M⁻¹ katsayısı kullanılarak birimi μ mol/mg protein/dak olan enzim spesifik aktivitesi hesaplandı. Kör ve homojenatların dilüsyonunda ise fosfat tamponu (PBS) (pH: 6,5) kullandı.

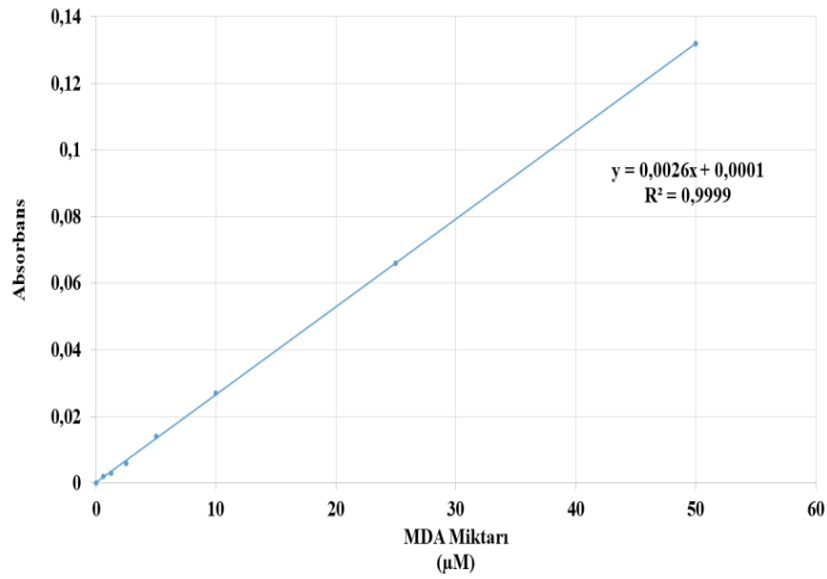
Tablo 2.4. *Glutasyon-S-transferaz aktivite ölçümü bileşenleri*

	KÖR	NUMUNE
Kokteyl	180 μ l	180 μ l
Fosfat tamponu (pH: 6,5)	20 μ l	---
Enzim kaynağı	---	20 μ l

2.3.7. Malondialdehid miktar tayini

Juglon uygulamasına bağlı olarak *G. mellonella* larvalarında ortaya çıkan oksidatif stresin belirlenmesi amacıyla lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA miktarının tayininde Yagi (1998)'nin geliştirmiş olduğu metoda bağlı ticari kit (CAYMAN 10009055) kullanıldı. MDA miktar tayinin yapılabilmesi için ilk olarak kitte verilen aralıkta (0-50 μ M) standart grafiği oluşturuldu (Şekil 2.3) ve bu grafiğe ait doğru denklemi elde edildi. Lipid peroksidasyonunu gösteren MDA'nın miktar tayini için ticari kit içerisinde verilen standart, homojenat, SDS ve renklendirme reaktifleri

(TBA asetik asit, TBA sodyum hidroksit) tablo 2.5’te verilen miktarlarda santrifüj tüpü içerisine alındı. Elde edilen bu karışım ilk olarak 1 saat su banyosunda 100 °C’de, ardından 10 dak buz üzerinde inkübe edilerek MDA’nın hücre dışına çıkarılması sağlandı. Bu işlemin ardından diğer hücre komponentlerin uzaklaştırılması amacıyla santrifüj edilen örnekler ait süpernatantlar (pembe renkli) elde edildi. Okumadan önce oda sıcaklığında 30 dak boyunca ikinci bir inkübasyon gerçekleştirildi. Bu işlemin ardından her bir örneğe ait solüsyondan 150 µl mikropate içerisine alındı ve BIO-TEK Marka EPOCH Elisa Okuyucu cihazında - Gen 5 programında 535 nm’de okuma yapıldı. *G. mellonella* larval hemolenfinde bulunan MDA miktarlarının hesaplanması amacıyla standart doğru grafiğinden elde edilen $y = 0,0026x + 0,0001$ ($R^2 = 0,999$) formülü kullanılarak ortaya çıkan sonuçlar nmol/mg olarak hesaplandı.



Şekil 2.3. MDA standart grafiği

Tablo 2.5. *Malondialdehid miktar tayini bileşenleri*

	KÖR	STANDART	NUMUNE
SDS	25 µl	25 µl	25 µl
Colorreagent	1 ml	1 ml	1 ml
Distile su	25 µl	---	---
MDA	---	25 µl	---
Homojenat	---	---	25 µl
İnkübasyon		1 saat 100°C	
		10 dak 4°C	
Santrifüj		1600 g, 10 dak 4°C	
İnkübasyon (süpernatant)		30 dak 25°C	
Okuma	535 nm		

2.4. COMET Analizi (Tek Hücre Jel Elektrofrezisi) ile DNA Hasarının Belirlenmesi

G. melloenella hemositlerinde DNA hasarının belirlenmesi için COMET analizi yapıldı. Singh vd. (1988) tarafından belirlenen bu yöntemde, tek hücrede meydana gelen DNA kırıklarının belirlenmesi için alkali ortamda elektroforetik olarak gerçekleştirilen yürütme işlemi *G. mellonella* hemositlerindeki hasarın görüntülenmesi için modifiye edilmiştir. Juglona bağlı meydana gelen DNA hasarının belirlenmesinde probit analizi sonucunda elde edilen subletal doz öncülüğünde ve antioksidan enzim analizlerinde de kullanılan 0,5, 1 ve 2 mg/ 2g'lık dozlar kullanıldı. Uygulama sonrası DNA hasarının tespit edilmesi için son dönem larvalara ait hemolenf kullanıldı.

Juglon uygulamasına bağlı olarak *G. mellonella* hemositlerinde ortaya çıkan DNA kırıklarının belirlenmesinde son döneme ulaşan larvalardan elde edilen hemolenf örnekleri kullanıldı. Deney ve kontrol gruplarına ait son dönem larvaların her birinin toraks ekstremite kaidelerinden mikrokapiller tüp yardımıyla 5 µl hemolenf alındı. Alınan hemolenf örnekleri içerisinde 95 µl (% 1'lik) düşük kaynama dereceli agaroz (LMPA) bulunan tüplere alınarak fiksasyon işlemi için üzeri önceden % 1'lik normal kaynama dereceli agaroz (NMA) ile kaplanmış özel lamlara yerleştirildi. Agaroz jele

gömülen bu karışımdaki hemositlerin hücre membranları, sitoplazma, nükleoplazma gibi yapılarının uzaklaştırılarak nükleozomların çözünmesi için hipertonic bir lizis (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCL, % 1'lik TritonX-100 ve % 10'luk dimetilsülfoksit (DMSO), pH: 10,0) solüsyonu ile muamele edildi. Geriye kalan nükleoidlerden DNA'nın süperkoil yapısının gevşetilerek kırık bölgeler olan apürinik/apirimidinik bölgelerin açığa çıkarılması gerekmektedir. Bu bölgelerin ortaya çıkarılması ve görüntülenmesi amacıyla yüksek alkali özelliğindeki bir tampon (10N NaOH ve 200 mM EDTA, pH: 13) kullanıldı. Bu işlemler için hemolenf örneklerinin yüklendiği lamalar, elektroforez tankı içerisine alınarak tamponun bulunduğu bu ortamda 45 dak boyunca bekletildi. Bu işlemin ardından elektrotlar bağlanarak kırıkların görünür hale gelmesi 20 Volt ve 300 mA'de anoda doğru göç ettirilmesiyle gerçekleştirildi. Yürütme işleminin ardından 4 °C'de 15 dak 0,4 M Tris-HCl (pH: 7,4) içerisine alınan lamalar nötralize edildi. DNA kırıklarının görüntülenmesinde ise floresan bir boya olan SYBR Green kullanılarak boyama işlemi gerçekleştirildi. Tüm işlemler karanlık ortamda ve 4° C'de gerçekleştirildi. SYBR Green ile boyanan DNA kırıklarının mikroskopik görüntülerinin elde edilmesi 40X'lik objektifde floresan mikroskopta (Leica DM6000 B, GreenFilter, 540 - 550 eksitasyon dalga boyu, 575 - 625 emisyon dalga boyu) gerçekleştirildi.

DNA kırıklarına ait elde edilen görüntülerin değerlendirilmesi COMET analiz programında (CometAssay IV; Perceptive Instruments Ltd, UK-İtalya) gerçekleştirildi. Genotoksik etkinin belirlenmesi amacıyla Comet Assay IV programında otomatik ölçüm yapılarak % DNA Tail (Tail Intensity, Kuyruk Yoğunluğu), Tail Moment (Kuyruk Momenti) ve Tail Migration (Kuyruk Göçü) parametreleri kullanıldı. Kuyruk momenti Olive vd. (1990)'in tanımına göre, kuyruk uzunluğunun kuyruktaki floresan yoğunluğu veya göç bölgesindeki DNA yüzdesi ile çarpımı olarak formüle edilmiştir. DNA hasar tespiti için her bir dozda 3 tekrarlı ve 15 larvadan elde edilen toplam 500 hücre analiz edildi.

$$\text{Kuyruk Momenti} = \text{Kuyruk uzunluğu} \times \left[\begin{array}{c} \text{Kuyruktaki floresan yoğunluğu} \\ \text{veya} \\ \text{Göç bölgesindeki DNA yüzdesi} \end{array} \right]$$

2.5. Mikronükleus Testi

Juglon uygulamasına bağlı olarak meydana gelen genotoksik etkinin belirlenmesinde kullanılan bir diğer yöntem ise hemositlerde ortaya çıkan mikronükleus frekanslarının belirlenmesiyle değerlendirilmiştir. Bu amaçla Venier vd. (1997)'nın belirlemiş olduğu mikronükleus testi deney ve kontrol gruplarına ait larvaların hemolenfleri kullanılarak gerçekleştirildi. Juglon uygulamasına maruz kalan son dönem larvaları insektisidal etkinin belirlenmesi için oluşturulan deney grupları ile benzer şekilde hazırlandı. Son döneme ulaşan larvaların her birinden mikropiller tüp yardımıyla toraks ekstremite kaidelerinden 20 µl hemolenf alındı. Alınan hemolenf örnekleri ile yayma preparatlar hazırlandı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Yayma preparatların kurumasının ardından hemositlerin fiksasyon işlemi için glasiyel asetik asit: metanol (1:3) karışımı kullanıldı. Fiksasyon işleminin ardından hemositlerde meydana gelen mikronükleusların görünür hale gelmesi için Giemsa boyası ile 20 dak boyunca boyama işlemi gerçekleştirildi. Bu işlemin hemen ardından fazla boyanın uzaklaştırılması için lamalar hızlı bir şekilde distile su ile yıkandı. Mikronükleusların görüntülenmesi amacıyla 100X büyütme ile ışık mikroskopunda (Leica DM6000 B) inceleme ve mikronükleus sayımları gerçekleştirildi. Hemositlerinde ana çekirdek ile aynı renkte, fakat ondan 5 kat daha küçük olan mikronükleusların sayımları yapıldı. Her bir doz için 15 larva kullanılarak 3 tekrar yapıldı ve her larvada toplam 1000 hücre sayımı yapıldı.

2.6. İstatistiksel Analiz

Juglonun *G. mellonella* larvalarına uygulanması sonrasında ortaya çıkan oksidatif ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan tüm analizlerden elde edilen verilerin normal dağılım gösterdiği tespit edildi. Bu nedenle analiz sonuçlarımıza parametrik bir test olan One-Way Anova uygulanarak, LSD (Least Significant Difference) testi ile güvenilirlik analizleri yapıldı (Windows versiyon 18.0, SPSS,

Chicago, IL). Deneylerde elde edilen sonuçların % 95 güven aralığında istatistiksel olarak anlamlı olup olmadıkları sınıandı ve $P < 0,05$ düzeyinde ise anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. İnsektisidal Etki

Juglonun *G. mellonella* besinine uygulanması sonrasında görülen larval ölüm sonuçları ve bu sonuçla ile yapılan Probit analizi aracılığıyla letal dozlar (LD₁₀, LD₂₀, LD₃₀, LD₄₀, LD₅₀, LD₉₅ ve LD₉₉) elde edilmiştir (Tablo 3.1). Bu analiz kontrol ve her bir deney setinde 20 larva olacak şekilde 3 tekrarlı olarak, her bir dozda toplam 60 birey kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Juglonun *G. mellonella* larvaları üzerindeki insektisidal etkili olduğu ve ortalama letal doz (LD₅₀) değerinin 2,309 mg/larva (% 95 güven aralığında, 2,075 – 2,554 mg/larva) olduğu belirlendi ($\chi^2 = 10,676$, $df = 5$, $P = 0,000$).

Tablo 3.1. Farklı dozlarda Juglon uygulanan *G. mellonella*'nın larval evresinde letal dozlar (LD₁₀, LD₂₀, LD₃₀, LD₄₀, LD₅₀, LD₉₅ ve LD₉₉)

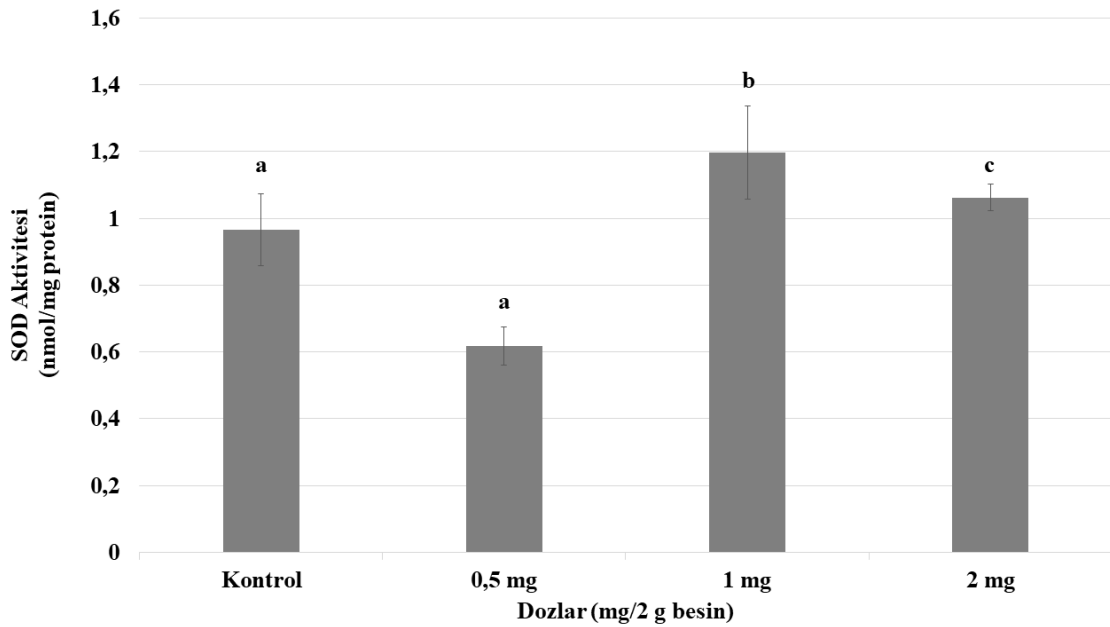
Letal Doz Seviyesi (mg/larva)					% 95 Güven Aralığı*	
Juglon Dozları (mg/larva)	Uygulama Yapılan Larva Sayısı	Ölen Larva Sayısı	Letal Dozlar (LD)	Muhtemel Dozlar	Alt Sınır	Üst Sınır
Kontrol	60	2	LD ₁₀ (% 95 CL)	0,222	0,221	0,564
0,5	60	10	LD ₂₀ (% 95 CL)	0,938	0,600	1,214
1	60	18	LD ₃₀ (% 95 CL)	1,455	1,176	1,699
2	60	24	LD ₄₀ (% 95 CL)	1,897	1,650	2,131
3	60	35	LD ₅₀ (% 95 CL)	2,309	2,075	2,554
4	60	49	LD ₉₅ (% 95 CL)	4,989	4,535	5,595
5	60	60	LD ₉₉ (% 95 CL)	6,099	5,506	6,903

* % 95 alt ve üst güven sınırları ile birlikte gösterildi (2,075 – 2,554 mg/ 2g besin) ($\chi^2 = 10,676$, $df = 5$, $P = 0,058$).

3.2. Antioksidan Enzim Aktiviteleri ve MDA Miktarı

3.2.1. SOD enzim aktivitesi

Juglon uygulanan ve uygulanmayan *G. mellonella* larval hemolenfinde SOD enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar belirlendi ($F = 6,77$; $df = 3, 16$; $P = 0,004$; Şekil 3.1). SOD enzim aktivitesi 1 ve 2 mg'lık juglon dozlarında $0,96 \pm 0,02$ ve $1,15 \pm 0,07$ nmol/mg protein olarak belirlenirken, $0,79 \pm 0,05$ nmol/mg protein olan kontrol grubu ile kıyaslandığında sırasıyla yaklaşık % 22 ve % 46 oranında artış gösterdi. 0,5 mg'lık juglon dozunda ise $0,65 \pm 0,05$ nmol/mg protein olan SOD enzimi aktivitesinin kontrol grubu ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı tespit edildi (Tablo 3.2, Şekil 3.1).

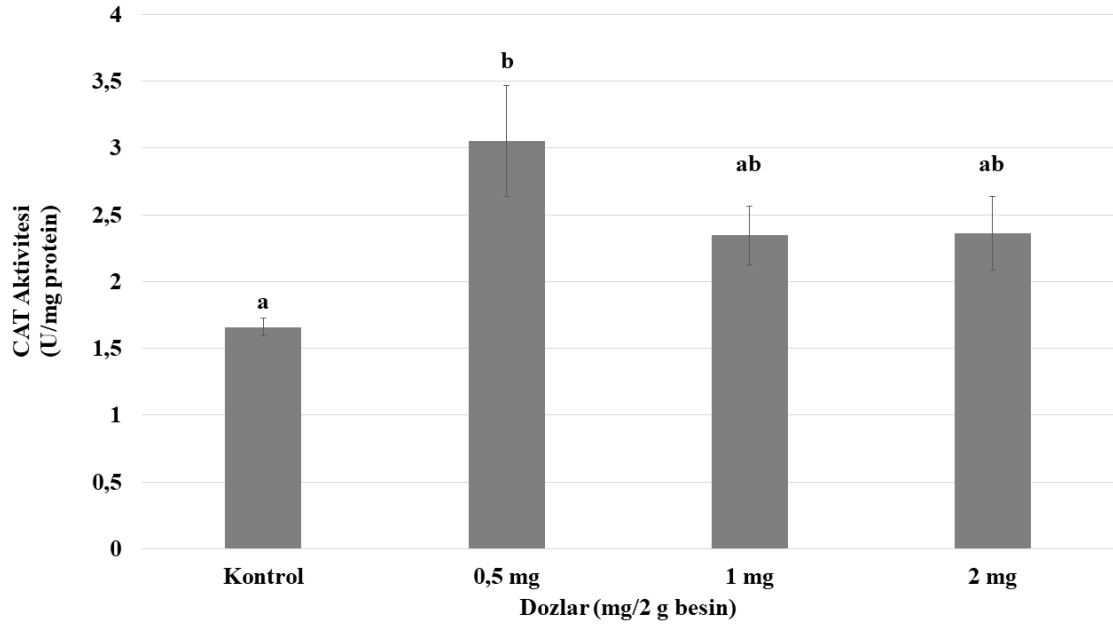


Şekil 3.1. Juglonun *G. mellonella*'nın son evre larval hemolenfindeki SOD aktivitesine etkileri. Sütunlar üç tekrarın ortalamasını, çubuklar ise standart hata verilerini göstermektedir. Sütunlar üzerindeki farklı harfler (a-c) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD)

3.2.2. CAT enzim aktivitesi

Juglon uygulamasına bağlı olarak *G. mellonella* larvalarına ait CAT enzim aktivitesinde dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler olduğu belirlendi ($F = 4,283$; $df = 3, 16$; $P = 0,021$; Şekil 3.2). Kontrol grubunda $1,66 \pm 0,07$ U/mg protein olarak belirlenen CAT enzim aktivitesinin 0,5 mg'lık juglon dozunda yaklaşık % 84 oranında artarak $3,05 \pm 0,42$ U/mg protein olduğu belirlendi. Bununla

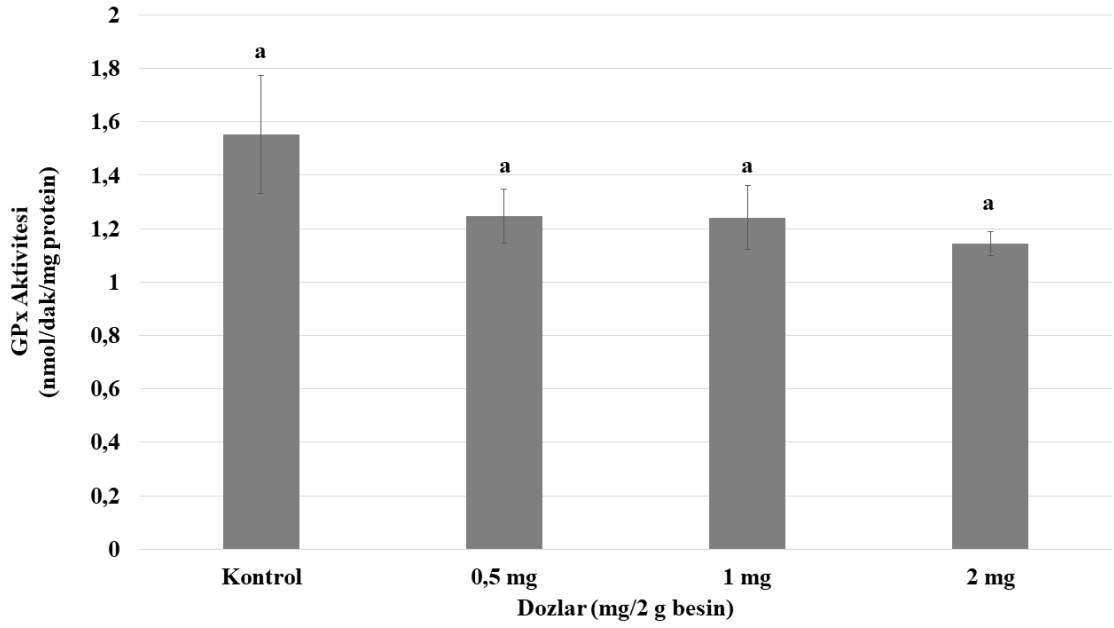
birlikte, 1 ve 2 mg'lık juglon dozlarında görülen CAT enzim aktivitelerinin kontrole göre her iki dozda da yaklaşık % 42 oranında artış göstererek sırasıyla $2,35 \pm 0,22$ ve $2,36 \pm 0,28$ U/mg protein değerinde olduğu ve her iki dozda da 0,5 mg'lık doza göre azalma olduğu, ancak istatistiksel olarak kontrol ve 0,5 mg'lık doz arasında farklılık olmadığı belirlendi (Tablo 3.2, Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Juglonun *G. mellonella*'nın son evre larval hemolenfteki CAT aktivitesine etkileri. Sütunlar üç tekrarın ortalamasını, çubuklar ise standart hata verilerini göstermektedir. Sütunlar üzerindeki farklı harfler (a-b) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD)

3.2.3. GPx enzim aktivitesi

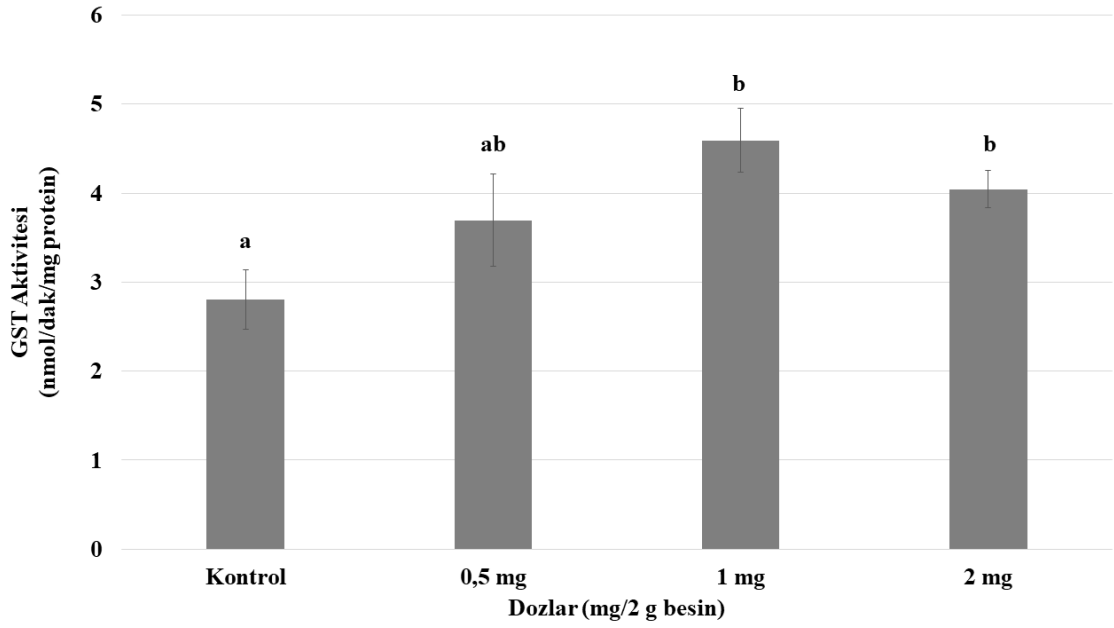
Juglon uygulanan deney gruplarında ve uygulanmayan kontrol gruplarında bulunan larvalara ait hemolenflerde GPx enzim aktivitesinin tüm dozlarda aynı olduğu, dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı değişimlerin olmadığı tespit edildi ($F = 1,668$; $df = 3, 16$; $P = 0,214$; Şekil 3.3). Kontrol grubunda $1,55 \pm 0,22$ nmol/mg protein olan GPx enzim aktivitesinin, 0,5, 1 ve 2 mg'lık dozlarda sırasıyla $1,25 \pm 0,10$, $1,24 \pm 0,12$ ve $1,14 \pm 0,05$ nmol/mg protein olduğu belirlendi (Tablo 3.2, Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Juglonun *G. mellonella*'nın son evre larval hemolenfteki GPx aktivitesine etkileri. Sütunları üç tekrarın ortalamasını, çubuklar ise standart hata verilerini göstermektedir. Sütunlar üzerindeki aynı harfler (a) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p \geq 0,05$, ANOVA, LSD)

3.2.4. GST enzim aktivitesi

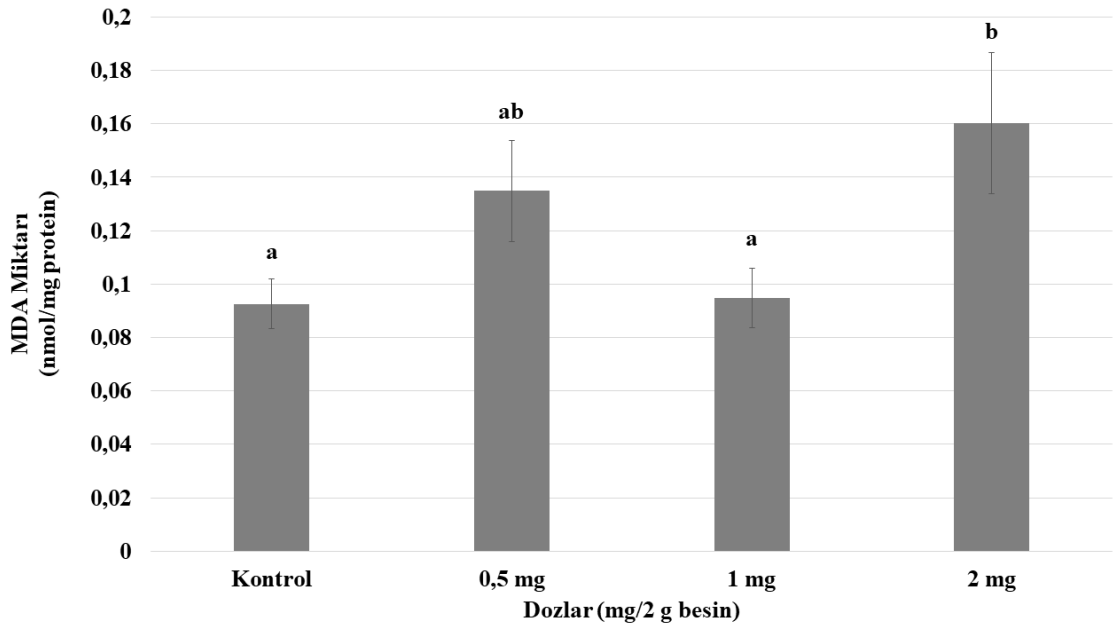
Juglon uygulamasına bağlı olarak *G. mellonella* larval hemolenfinde GST enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu belirlendi ($F = 4,095$; $df = 3, 16$; $P = 0,025$; Şekil 3.4). Bu farklılığın $2,80 \pm 0,33$ nmol/mg protein/ dak olan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 0,5, 1 ve 2 mg'lık dozlarda sırasıyla yaklaşık % 32, % 64 ve % 44 oranında artışa bağlı olduğu belirlendi. Ancak, $3,69 \pm 0,52$ nmol/mg protein/ dak olarak belirlenen 0,5 mg'lık juglon dozunda görülen GST enzim aktivitesinde görülen artışın istatistiksel olarak hem kontrolle hem de diğer dozlar ile farklı olmadığı tespit edildi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında en fazla artışın görüldüğü 1 mg'lık doz ($4,59 \pm 0,36$ nmol/mg protein/ dak) ile 2 mg'lık dozdaki GST aktivitesi ($4,04 \pm 0,21$ nmol/mg protein/ dak) arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi (Tablo 3.2, Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Juglonun *G. mellonella*'nın son evre larval hemolenfteki GST aktivitesine etkileri. Sütunları üç tekrarın ortalamasını, çubuklar ise standart hata verilerini göstermektedir. Sütunlar üzerindeki farklı harfler (a-b) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD)

3.2.5. MDA miktar analizi

Juglon uygulamasına bağlı olarak *G. mellonella* larval hemolenfinde görülen, lipid peroksidasyon ürünü olan MDA miktarının uygulanan doza bağlı olarak farklı seviyelerde olduğu belirlendi ($F = 3,398$; $df = 3, 16$; $P = 0,044$; Şekil 3.5). Kontrol grubunda $0,09 \pm 0,01$ nmol/mg protein olarak belirlenen MDA miktarının, 0,5 ve 2 mg'lık dozlarda sırasıyla $0,13 \pm 0,02$ ve $0,16 \pm 0,03$ nmol/mg protein olduğu ve yaklaşık olarak sırasıyla % 44 ve % 77 oranında artış olduğu tespit edildi. Aynı zamanda 1 mg'lık dozunda görülen MDA miktarının ($0,09 \pm 0,01$ nmol/mg protein) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında farklılık olmadığı ve diğer dozlara göre azalma olduğu tespit edildi (Tablo 3.2, Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Juglonun *G. mellonella*'nın son evre larval hemolenfteki MDA miktarına etkileri. Sütunlar üç tekrarın ortalamasını, çubuklar ise standart hata verilerini göstermektedir. Sütunlar üzerindeki farklı harfler (a-b) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD)

Tablo 3.2. *Galleria mellonella* larval besinine farklı dozlarda uygulanan Juglona bağlı olarak antioksidan enzim aktiviteleri ve MDA miktarındaki değişimler

Juglon (mg/2g)	SOD (nmol/ mg protein) ORT $\pm$ SH*	CAT (U/ mg protein) ORT $\pm$ SH*	GPx (nmol/ mg protein/ dak) ORT $\pm$ SH*	GST (nmol/ mg protein/ dak) ORT $\pm$ SH*	MDA (nmol/mg protein) ORT $\pm$ SH*
Kontrol	0,79 $\pm$ 0,05a	1,66 $\pm$ 0,07 a	1,55 $\pm$ 0,22 a	2,80 $\pm$ 0,33 a	0,09 $\pm$ 0,01 a
0,5	0,65 $\pm$ 0,05 a	3,05 $\pm$ 0,42 b	1,25 $\pm$ 0,10 a	3,69 $\pm$ 0,52 ab	0,13 $\pm$ 0,02 ab
1	0,96 $\pm$ 0,02 b	2,35 $\pm$ 0,22 ab	1,24 $\pm$ 0,12 a	4,59 $\pm$ 0,36 b	0,09 $\pm$ 0,01 a
2	1,15 $\pm$ 0,07 c	2,36 $\pm$ 0,28 ab	1,14 $\pm$ 0,05 a	4,04 $\pm$ 0,21 b	0,16 $\pm$ 0,03 b

*Aynı satırda farklı harfle (a-d) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD). ORT: Ortalama; SH: Standart Hata.

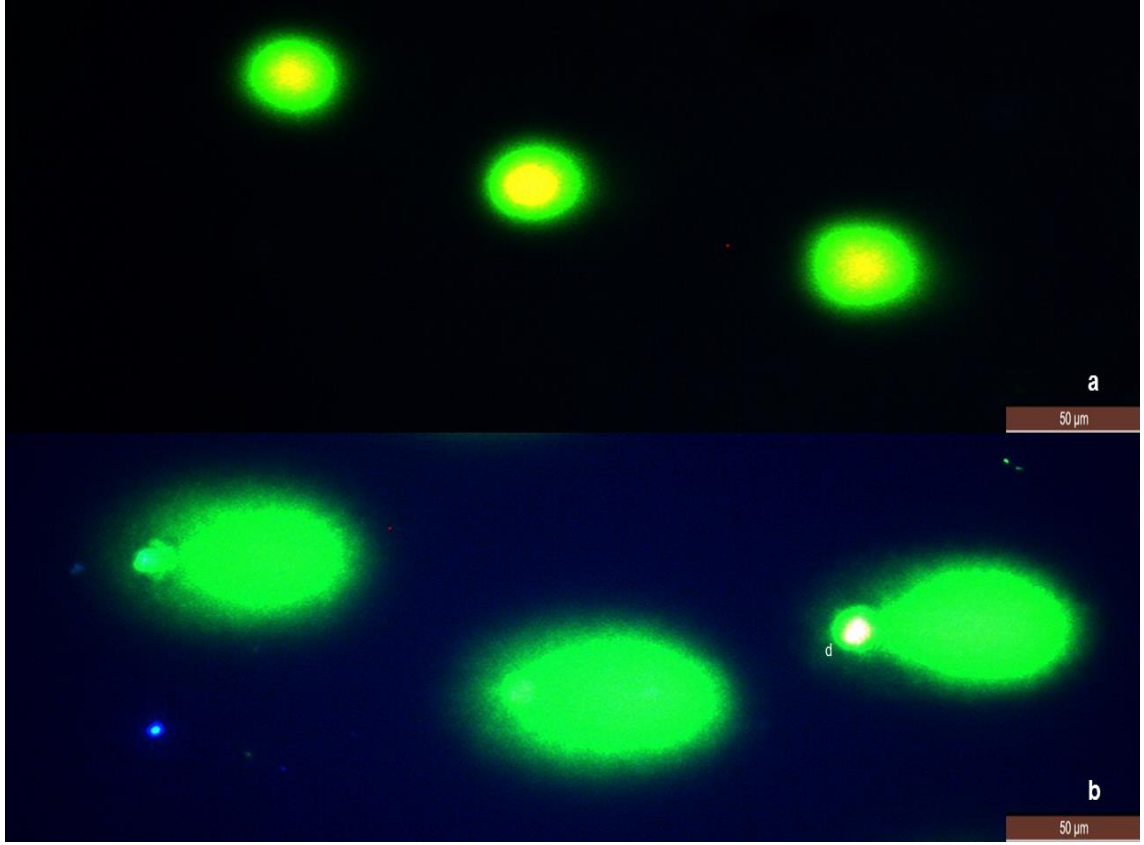
3.3. Juglonun *G. mellonella* Hemositleri Üzerine DNA Hasar Tespiti

Juglon uygulamasına bağlı olarak DNA hasarının belirlenmesinde Comet Assay IV (Perceptive Instruments Ltd, UK-İtalya) programı ile analiz edilen örneklerde kuyruk yoğunluğu (% DNA Tail), kuyruk momenti (Tail Moment) ve kuyruk göçü (Tail

Migration) parametreleri belirlendi. Elde edilen sonuçlarda juglon uygulamasına bağlı olarak kontrol grubu ile dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edildi (Tablo 3.3, Görsel 3.1).

Juglon uygulanmayan kontrol grubundaki kuyruk yoğunluğu $\% 5,22 \pm 0,23$ iken 0,5, 1 ve 2 mg'lık dozlarda sırasıyla $\% 13,75 \pm 0,49$, $\% 26,24 \pm 0,64$ ve $\% 15,83 \pm 0,55$ olarak artış göstermektedir ($F = 298,083$; $df = 3, 1996$; $P = 0,000$, Şekil 3.6). Bu artışın 0,5 ve 1 mg juglon uygulamasında doz artışıyla doğru orantılı olduğu, fakat 2 mg'lık juglon dozunda elde edilen kuyruk yoğunluğunun 1 mg'lık dozdakine göre daha az olduğu görüldü. Bununla birlikte juglon dozlarındaki kuyruk göçü miktarlarının kontrol grubuna kıyasla artmış olduğu ve tüm dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi ($F = 2310,266$; $df = 3, 1996$; $P = 0,000$). Juglon uygulanan larvalara ait hemositlerdeki kuyruk göçündeki artış 0,5 ve 1 mg'lık dozlarında sırasıyla $9,22 \pm 0,27$ ve $31,46 \pm 0,42$ μm olarak görülmektedir. Ancak 2 mg'lık doza ait kuyruk göçünde kontrole göre artış görülürken, diğer dozlar ile kıyaslandığında azalma olduğu tespit edildi (Tablo 3.3, Şekil 3.6).

Kuyruk momenti için yapılan analizlerde ise kontrol grubu ve dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların olduğu belirlendi ($F = 1082,415$; $df = 3, 1996$; $P = 0,000$). Kuyruk momentinde elde edilen bu verilerin ise kuyruk yoğunluğu ve kuyruk göçüyle doğru orantılı olduğu ve diğer parametrelerde de olduğu gibi özellikle 0,5 mg ve 1 mg'lık juglon uygulamalarında doza bağlı olarak artış göstermektedir (Tablo 3.3, Şekil 3.6).

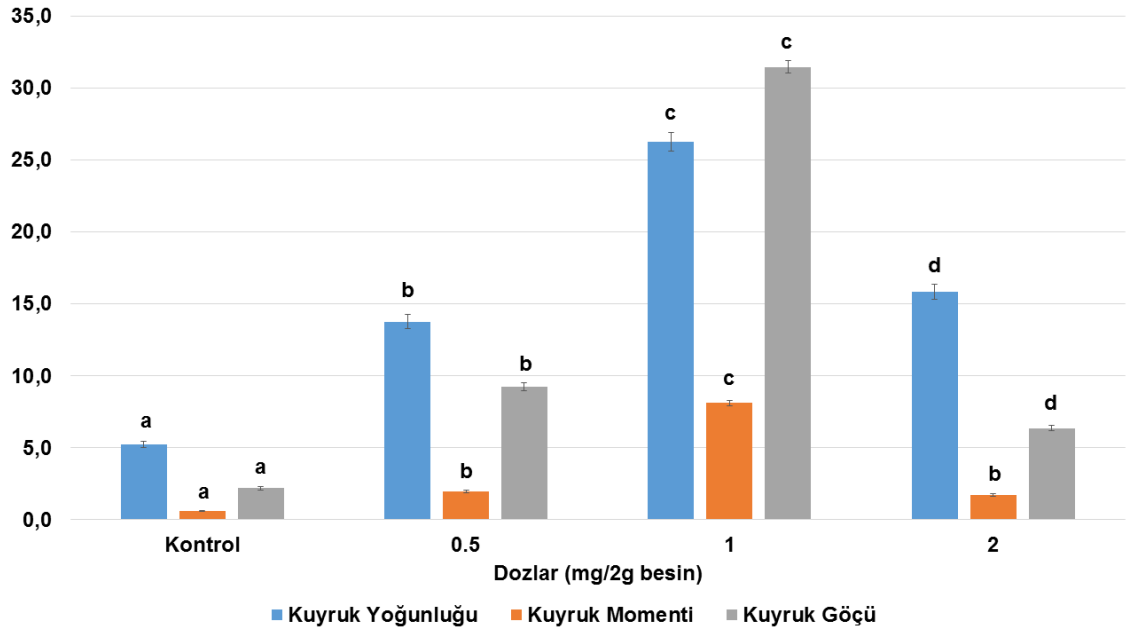


Görsel 3.1. COMET analizine ait SYBR Green ile boyanmış *G. mellonella* larval hemositlerinin floresans mikroskobu görüntüleri, a: DNA hasarı olmayan hemositler, b: DNA hasarı olan hemositler

Tablo 3.3. *Galleria mellonella* larvalarına farklı dozlarda uygulanan Juglona bağlı olarak hemositlerde belirlenen DNA hasarının oranları ve istatistiksel değerlendirmesi

Juglon (mg/2g)	Kuyruk Yoğunluğu (% DNA Tail) ORT $\pm$ SH*	Kuyruk Momenti (Tail Moment) ORT $\pm$ SH*	Kuyruk Göçü (μ m) (Tail Migration) ORT $\pm$ SH*
Kontrol	5,22 $\pm$ 0,23 a	0,59 $\pm$ 0,03 a	2,19 $\pm$ 0,12 a
0,5	13,75 $\pm$ 0,49 b	1,96 $\pm$ 0,08 b	9,22 $\pm$ 0,27 b
1	26,24 $\pm$ 0,64 c	8,10 $\pm$ 0,17 c	31,46 $\pm$ 0,42 c
2	15,83 $\pm$ 0,55 d	1,72 $\pm$ 0,07 b	6,37 $\pm$ 0,18 d

*Aynı satırda farklı harfle (a-d) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD). ORT: Ortalama; SH: Standart Hata.



Şekil 3.6. Besinsel juglonun etkin dozlarının *G. mellonella* larval hemositlerinde oluşturduğu DNA hasarının kuyruk yoğunluğu (% DNA Tail), kuyruk momenti (Tail Moment) ve kuyruk göçü (Tail Migration) ortalamasının karşılaştırılması

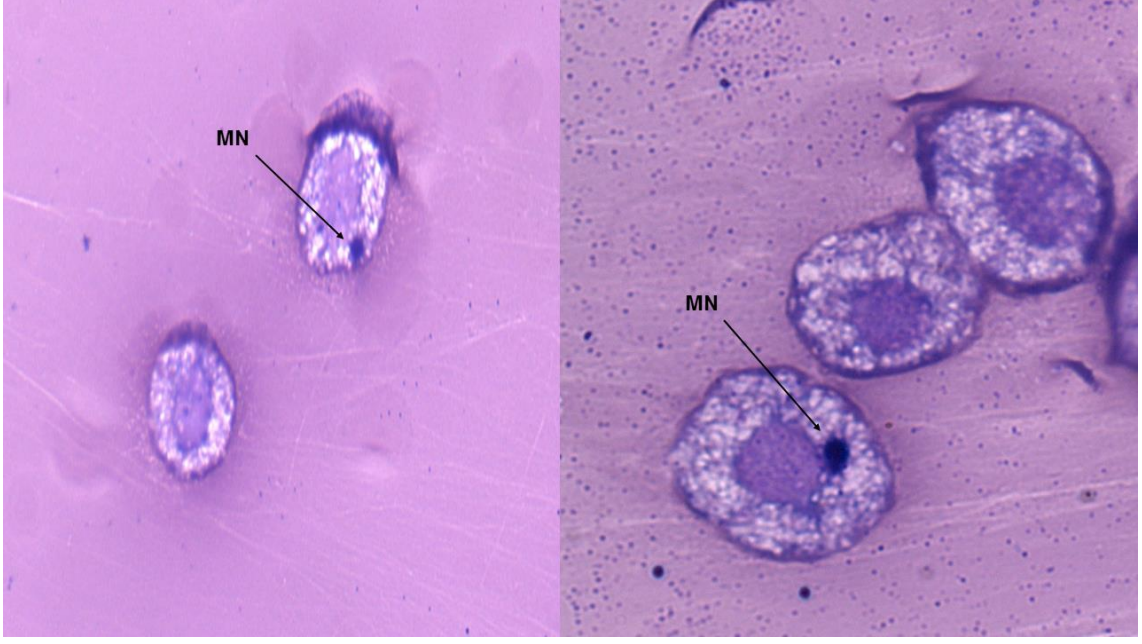
3.4. Juglonun *G. mellonella* Hemositlerinde Mikronükleus Analizi

Juglon uygulamasına bağlı olarak *G. mellonella* son dönem larvalarından elde edilen hemositlerdeki mikronükleus sayılarının doza bağlı olarak artış gösterdiği istatistiksel olarak belirlendi ($F = 601,067$; $df = 3, 176$; $P = 0,000$). Kontrol grubunda $\% 16,78 \pm 1,44$ olarak bulunan MN oranı 0.5, 1 ve 2 mg'lık dozlarda sırasıyla $\% 98,16 \pm 2,45$, $\% 132,44 \pm 2,37$ ve $\% 139,45 \pm 2,71$ olarak belirlendi (Tablo 3.4, Görsel 3.2).

Tablo 3.4. *Galleria mellonella* larvalarına farklı dozlarda uygulanan Juglona bağlı olarak hemositlerde mikronükleus oluşumunda görülen değişimler

Juglon (mg/2g besin)	Mikronükleus (‰) ORT $\pm$ SH*
Kontrol	16,78 $\pm$ 1,44 a
0,5	98,16 $\pm$ 2,45 b
1	132,44 $\pm$ 2,37 c
2	139,45 $\pm$ 2,71 d

*Aynı satırda farklı harfle (a-d) gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p \leq 0,05$, ANOVA, LSD). ORT: Ortalama; SH: Standart Hata.



Görsel 3.2. *Giemsa boyama yöntemi ile boyanan hemositler ve mikronükleusların mikroskopik görüntüsü (100X objektif)*

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tarımsal alanlarda ve depolanan ürünlerde zararlı böcekler ile mücadele ekolojik ve ekonomik bir olgudur. Zararlı böcekler ile mücadele yöntemlerinde yaygın olarak kullanılan kimyasal insektisitler zararlı türlerin dayanıklılık kazanmasına, besin zincirine ve insan sağlığına etki ederek ekolojik dengenin bozulmasına sebep olmaktadır (Cox, 1996; Lee vd., 1996; Ahmad vd., 1997; Rick ve Relyea, 2005; Szatkowska vd., 2012; Mineau ve Whiteside, 2013). Entegre mücadele yöntemi ve organik tarım anlayışının geliştiği son yirmi yılda ise bitkisel kökenli sekonder metabolitler, kısa zamanda dekompoze olmaları, çevre kirliliğine yol açmamaları ve ürünler üzerinde kalıntı oluşturmamaları nedeniyle kimyasal insektisitlerin yerini almaktadır (Isman, 1997). Bitki sekonder metabolitleri, bitkinin temel yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkili olmasa da primer metabolitler (protein, yağ, karbonhidrat) kadar önemlidirler. Bitkilerde bulunan bu bileşikler hastalıklara karşı direnç oluşumu (virüsler, mikoplazma, bakteri ve mantar), herbivorlardan korunma, kendileriyle rekabet halinde olan diğer bitki türlerinden kaçınma (allelokimyasal etki) ve abiyotik stresten korunma (UV Işığı vb) gibi önemli rollere sahiptirler (Aydın ve Mammadov, 2017). Bununla birlikte, bu doğal ürünler uzun süredir yabancı otların, bitki hastalıkları ve herbivor zararlılarının kontrolünde de kullanılmaktadır (Isman, 1997; Ujvary, 2001). Fitokimyasallar içinde değerlendirilen ve böceklerde insektisidal veya beslenme engelleyici ya da kaçırıcı gibi ekotoksik etkilere neden olan önemli sekonder metabolitler ise alkaloidler, fenolikler, terpenoidler ve naftokinonlar olarak bilinmektedirler (Isman, 2002). Bu nedenle naftokinonlar gibi önemli sekonder metabolitlerin biyoinsektisidal potansiyellerinin belirlenmesine yönelik araştırmalar giderek önem kazanmaktadır. Çeşitli bitkilerden elde edilen ekstraktların kromatografik olarak ayrımı ile elde edilen naftokinon ve kinon yapısındaki çeşitli organik bileşiklerin bazı fitofag böceklerde insektisidal veya antifeedant (beslenme engelleyici) özelliğe sahip olduğu, aynı zamanda da antifungal ve antimikrobiyal karakterde olduklarını gösteren veriler literatürde sunulmuştur (Krishnakumari vd., 2001; Simmonds vd., 2002; Khambay vd., 2003; Ganapaty vd., 2004; Park vd., 2005; Burgueno-Tapia vd., 2008; Pavunraj vd., 2011). Bu çalışmada kullanılan juglon (5-hidroxy-1,4-naphthoquinone) ise, bir naftokinon ve sekonder metabolit olup, ceviz ağaçlarının yapraklarından ve meyvalarının yeşil kabuklarından elde edilen allelokimyasal bir

bileşiktir. Ayrıca juglonun herbisidal, pestisidal ve repellent etkilere sahip olabileceği Duke ve Ayensu (1985) tarafından ilk kez önerilmiştir. Bu nedenle bazı herbivor Lepidopter türlerinde juglonun ve diğer naftokinonların toksitesine ait çalışmalar yapılmıştır (Yu, 1987; Thiboldeaux vd., 1994; Sun vd., 2007). Bu çalışmalarda böceklerin besininde bulunan juglonun doz artışına bağlı olarak zehirleyici ya da antifeedant etki göstererek ölümlere neden olduğu bildirilmiştir. Mısır güvesi *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae) ve lahana yaprak güvesi *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) türleri ile ilgili bir çalışmada ise besine uygulanan juglonun doza bağlı olarak orta bağırsaktaki emilimi inhibe ettiği ve larval ölümlere neden olduğu tespit edilmiştir (Zhai vd., 2003a, 2003b). Buna karşılık, luna güvesi *Actias luna* (Lepidoptera: Saturniidae) ve keten güvesi *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) gibi bazı böcek türleri, doğal besinlerinde naftokinonlara maruz kalırlar. Bu türlerin yüksek konsantrasyonlarda bile naftokinonları verimli bir şekilde metabolize ettikleri ve toksik etkisini tolere edebilecek dirençliliğe sahip oldukları çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Lindroth, 1989; Piskorski ve Dorn, 2011). Ancak Piskorski ve Dorn (2011) tarafından yapılan bir çalışmada sentetik besinine 5, 25 ve 50 mg/g juglon uygulanan *C. pomonella*'nın birinci evre larvalarında sadece 50 mg/g'lık dozda tamamen ölüm olduğu, diğer dozlarda ise larval gelişim sürecinin uzadığı belirlenmiştir. Aynı zamanda araştırmacılar larvaları direkt ceviz ile beslendiklerinde de toplam gelişim sürecinin elma ile beslenenlere göre uzadığını tespit etmişlerdir (Piskorski ve Dorn, 2011). Fitofag zararlı böcekler olan *Limantria dispar* (Lepidoptera: Erebidae) ve *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) türleri üzerinde yapılan çalışmalarda ise juglonun 2 mg/g gibi cevizlerde bulunan değerinden daha düşük dozlarda bile öldürücü olduğu belirlenmiştir (Yu, 1987; Lindroth vd., 1990). Bu çalışmalara benzer olarak bu çalışmada da besinle birlikte verilen farklı dozlardaki juglonun bir depo zararlısı ve model böcek olan *G. mellonella*'nın larval gelişimi üzerinde düşük dozlarda bile (LD₅₀ 2.3 mg/ 2g besin) öldürücü etkiye sahip olduğu belirlendi. Bununla birlikte, bu çalışmada LD₅₀ üzerindeki juglon dozlarına (3, 4, 5 mg/ 2g besin) maruz kalan birinci evre larvalarının erken evrelerde ölümlerinin gerçekleştiği gözlemlendi. Daha önce yapılan bir çalışmada da, kabak zararlısı *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) larvalarına uygulanan subletal dozlardaki juglonun antifeedant etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Akhtar vd., 2012). Bu nedenle besinle birlikte yüksek dozlarda juglona maruz kalan *G. mellonella* larvalarında erken evrelerde ölüm olmasının nedeni

antifeedant etki ile ilişkilendirilebilir. Elde edilen bu verilere göre antifeedant etkinin kesinliğe kavuşturulması için ileride histopatolojik çalışmaların yapılması gerekmektedir. Aynı zamanda Piskorski ve Dorn (2011), besin yoluyla juglonu alarak bağırsak ortamında toksik olmayan 1,4,5-trihidroksinaftaline dönüştürebilecek metabolizmaya sahip böceklerde, juglonun toksitesinin olmadığını bildirmişlerdir. Sonuç olarak, gerek elde edilen bu veriler gerekse de daha önce yapılan çalışmalar juglonun böceğin fizyolojik kapasitesine bağlı olarak insektisidal etkiye sahip olduğuna işaret etmektedir. Böylece arı yetiştiricileri tarafından kullanılan, ancak bilimsel bir özelliği araştırılmamış olan ceviz yaprak veya meyvalarının kovanlarda *G. mellonella* üzerinde olumsuz etkili olduğuna ait bilimsel veriler bu çalışma kapsamında ilk kez literatüre sunulmuş olmaktadır.

Biyolojik sistemlerde endojen ve ekzojen kökenli stres faktörleri nedeniyle sürekli olarak serbest radikaller ve diğer oksijen kökenli türler üretildiğinden, hücre bu stres faktörlerine maruz kalmayı sınırlamak için güçlü ve kompleks enzimatik ve moleküler antioksidan savunma sistemleri geliştirmiştir. Bu serbest radikaller; katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz gibi radikal süpürücü enzimleri ve A, E ve C vitaminleri, glutatyon, ubikinon, lipoik asit ve flavonoidler dâhil olmak üzere çok sayıda non-enzimatik antioksidanları içeren ayrıntılı bir antioksidan savunma sistemi tarafından etkisiz hale getirilmektedir. (Urso ve Clarkson, 2003; Greathouse vd, 2005; Özkaya, 2007). Diğer tüm canlılarda olduğu gibi böcekler de reaktif oksijen türevlerinin zararlı etkilerinin ortadan kaldırılması için özelleşmiş, küçük moleküler ağırlığa sahip bileşikler ve enzimlere sahiptir (Grubor-Lajsic vd., 1997). Fenolik bileşikler ve kinonlar gibi bitkisel allelokimyasalların detoksifikasyonu amacıyla böceklerdeki bu antioksidant ve detoksifikasyon enzimleri önemli rol oynamaktadırlar (Kaur vd., 2014). Özellikle de herbivor böceklerin allelokimyasallara karşı primer adaptasyonlarının enzimatik detoksifikasyonların gerçekleşmesi ile sağlandığı bilinmektedir (Felton vd., 1989). Çünkü juglon gibi bitkisel fenolik bileşiklerin orta bağırsaktaki yüksek pH ya da bitki polifenol oksidazlar nedeniyle böcek vücudunda okside edildikleri bilinmektedir. Bu okside bileşikler ise canlıda reaktif oksijen türlerinin artmasına neden olarak antioksidan sistemi etkileyebilir (Felton vd., 1989; Felton ve Duffey, 1991; Thiboldeaux vd., 1998).

Antioksidant enzimlerden birisi olan SOD, reaktif oksijen türlerine karşı geliştirilen antioksidan savunmada faz 1 enzimi olarak rol oynamaktadır (Zenkov vd., 2001; Gaeta vd., 2002). Normal koşullarda SOD, aerobik reaksiyonlarda ortaya çıkan süperoksit anyonunun hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşmesini katalizleyerek hücrenin oksidatif strese girmesini engellemektedir (Sun vd., 1988; Sankarapandi ve Zweier, 1999). Bununla birlikte SOD enziminin, böceklerin çevresel ajanlar ve bitkisel metabolitlere maruz kaldığında da rol aldığı bilinmektedir (Krishnan ve Kodrik, 2006; Altuntaş, 2015a, 2015b). Omurgalı hayvanlarda yapılan çalışmalarda juglonun aerobik koşullarda metabolize edilmesine bağlı olarak vücutta reaktif oksijen türlerini (ROS) arttırdığı bildirilmiştir (Bhuyan vd., 1991; Babich ve Stern, 1993). Bu çalışmada 1 ve 2 mg'lık juglon uygulanan *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde görülen SOD enzim aktivitesindeki artışın nedeni juglonun metabolize edilmesinde ortaya çıkan süperoksit anyonu radikallerinin giderilmesi amacıyla olabilir. Ayrıca, SOD enziminin, hücreleri süperoksit radikallerine karşı savunurken lipid peroksidasyonunun başlamasını da engellediği bilinmektedir (Çelik, 2001). Bu yüzden 0,5 mg juglon uygulanan dozda SOD aktivitesinde herhangi bir değişim olmasının nedeni ise aynı dozda MDA miktarında meydana gelen artışla ilgili olduğu düşünülebilir. Bu durum ise larvalarda juglon maruziyeti arttıkça oksidatif stresin giderilmeye çalışıldığını göstermektedir.

Antioksidan savunma sisteminde görevli olan enzimlerden bir diğeri de CAT enzimidir. Katalaz, hidrojen peroksit radikalının aşırı miktarda arttığı ortamlarda aktivite göstermekte ve hücrede hidrojen peroksit artışına neden olan reaktif molekülün detoksifikasyonunu sağlamaktadır (Tekcan, 2009). Ayrıca, SOD enzim aktivitesi sonucunda üretilen hidrojen peroksinin parçalanması için antioksidan savunma mekanizmalarında ikinci kademede rol almaktadır (Gaeta vd., 2002). Bu çalışmada 1 ve 2 mg'lık juglon uygulamasına bağlı olarak larvalarının hemolenfinde hem SOD hem de CAT aktivitelerinin artması *G. mellonella* larvalarında fizyolojik bir dirençliliğin ortaya çıktığını göstermektedir. Bazı çalışmalarda da lipid peroksidasyonu sonucu meydana gelen subletal oksidatif hasarın giderilmesi için CAT aktivitesinin yükseldiği bildirilmiştir (Kazzaz vd., 1996; Tan vd., 1998). Bu nedenle, 0,5 mg'lık juglon dozunda larval hemolenfte CAT aktivitesinin artması ve SOD aktivitesinin azalması aynı dozdaki lipid peroksidasyonunda meydana gelen artışla ilişkili olduğu şeklinde açıklanabilir. Sonuçta, CAT enzim aktivitesinin tüm dozlarda artmış olmasının nedeni

de artan juglon dozuna bağılı olarak larvalarda gelişen oksidatif stresle ilişkili olabilir. Çünkü çeşitli çevresel kimyasalların ya da bitkisel ürünlerin böceklerde neden olduğu oksidatif strese bağılı olarak canlıda antioksidan savunma mekanizmasının teşvik edildiğı ve dirençliliğın sağılandığı bilinmektedir (Krishnan ve Kodrik, 2006; Aslantürk vd., 2011; Büyükgüzel vd., 2013; Altuntaş, 2015a, 2015b).

Böceklerde stres koşulları altında hücresele detoksifikasyonun sağılanmasında rol oynayan bir enzim olan GST enzimi, faz II detoksifikasyon enzimi olarak da bilinmektedir (Hyrsl vd., 2007; Oruç, 2011; Altuntaş, 2015a). Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada bitkisel kökenli kinon moleküllerine bağılı olarak karaciğerdeki GST enziminin geri dönüşümsüz inhibisyon gösterdiği ve hepatosit hücrelerinde glutatyonun tüketilerek oksidatif strese neden olduğu bildirilmiştir (Bellomo vd., 1987; Van-Ommen vd., 1991). Böceklerde ise juglon gibi bitkisel fenollerin GST aktivitesini inhibe ettiği bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Lee, 1991; Wheeler vd., 1993; Yu ve Abo-Elghar, 2000; Yu ve Huang, 2000). Yu ve Abo-Elghar (2000)'ın yaptıkları çalışmada ise bitkisel fenol ve flavonoidlerin pamuk yaprak kurdu *S. frugiperda* larvalarında GST aktivitesinin engellendiğı gösterilmiştir. Bir lepidopter türü olan sünger örücüsü *L. dispar* ile yapılan bir çalışmada da besinsel juglonun detoksifikasyonunda kinin redüktaz ve GST enzimlerinin kilit rol oynadığı belirlenirken, böceğın doğal besininde düşük dozlarda bulunan juglona karşı uyum sağılamasının bu enzimler sayesinde olduğu ifade edilmiştir (Lindroth vd., 1990). Bunun yanında 1,4-Naftokinonlara karşı birçok Lepidopter türünün dirençli olmamasına rağmen sadece pervane böceğı *Actias luna* (Lepidoptera: Saturniidae) türünün yüksek konsantrasyonlarda bile direnç kazandığı bildirilmiştir. Bu durumun nedeni ise naftokinonların detoksifikasyonu için böcekte yüksek kinon redüktaz aktivitesinin bulunmasıyla ilişkili olabileceğı şeklinde yorumlanmıştır (Thiboldeaux vd., 1994). Ayrıca bir Saturniid güvesi olan *Calloseamia prometha* larvalarında juglonla beslenmeye bağılı olarak orta bağırsakta glutatyan seviyesinin azaldığı, glutatyon disülfat (GSSH) seviyesinde ve GSSG/GSH oranında artışın olduğu belirlenmiştir. Bu durum ise hücresele redoks dengesinin korunmasını sağılamıştır (Thiboldeaux vd., 1998). Böylece doğal besinlerinde juglon ve diğer naftokinonlara maruz kalan böceklerde görülen dirençliliğın biyokimyasal nedenleri daha önce yapılan bu çalışmalara ile açıklanmıştır. Bununla birlikte, birçok bitkisel allelokimyasalların fitofag böceklerde GST aktiviteörleri veya GST substratları olarak etki ettikleri ve bu böceklerin primer detoksifikasyon metabolizmalarında GST

enziminin rol oynadığı da çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Scheline, 1978; Yu, 1982, 1983; Wadleigh ve Yu, 1988). Bu çalışmada ise daha önce yapılan çalışmalara benzer olarak depo zararlısı *G. mellonella* larvalarına düşük doz juglon uygulandığında GST aktivitesinde artış meydana gelirken, doz yükseldikçe aktivitenin değişmediği belirlendi. Elde edilen sonuçlar juglonun düşük dozlarında fitofag böceklerde olduğu gibi depo zararlısı böceklerde de fizyolojik dirençliliğin sağlanması için önce primer detoksifikasyon metabolizmasının teşvik edildiğini göstermektedir. Yu ve Abo-Elghar (2000)'ın *S. frugiperda* türü üzerinde yaptıkları çalışmada açıklandığı gibi juglonuda içeren birçok allelokimyasal bileşen, doz arttıkça böcekteki GST aktivitesinin geri dönüşümsüz inhibisyonuna neden olan inhibitör olarak etki etmektedirler. Bu çalışmada ise *G. mellonella* larvalarına uygulanan subletal juglon dozlarında GST enzim aktivitesinde meydana gelen artışın 1 ve 2 mg'lık dozlarda aynı olduğu belirlendi. Bu nedenle *S. frugiperda* türünde meydana gelen GST enzim inhibisyonu gibi juglonun *G. mellonella* larval hemolenfinde enzim inhibisyonuna neden olabileceğini göstermek için LD₅₀ değerinin üzerindeki dozlarda enzim aktivitesinin belirlenmesi ile kesinleştirilebilir.

Böceklerde bulunan antioksidan enzimlerden bir diğeri ise hidrojen peroksit ile hidroperoksitlerin indirgenmesini sağlayan glutatyon peroksidaz enzimidir. Genel olarak vücut sıvılarında süperoksit radikal üretiminin artması SOD aktivitesindeki yükselişi tetiklerken GPx aktivitesinin de azalmasına neden olmaktadır (Gaeta vd., 2002). GPx aktivitesindeki azalma ise, hidrojen peroksit birikmesine ve hücre hasarına yol açar. Bu nedenle GPx, hem lipid peroksidasyonunun başlamasını önler, hem de lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerinin detoksifikasyonunu sağlamaktadır (Peric'-Mataruga vd., 1997). Bu çalışmada *G. mellonella* besinine uygulanan juglonun larval hemolefte GPx enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi. Bu durum juglona bağlı ortaya çıkan lipid peroksidasyonunun CAT enzimi ile giderildiğine işaret etmektedir. Çünkü 0,5 mg'lık dozda CAT aktivitesi ve MDA miktarı kontrole kıyasla artmıştır. Elde edilen tüm veriler juglonun artan dozuna bağlı olarak larval toleransın azaldığını ve lipid peroksidasyonunun yükselerek oksidatif stresin meydana geldiğini göstermektedir. Bu durum juglona bağlı lipid peroksidasyonunun değerlendirildiği MDA miktar analizinde, 2 mg'lık dozda görülen artış ile açıklanabilir. Ayrıca bu verilerle uyumlu olarak, lipid peroksidasyonu sonucu meydana gelen subletal oksidatif hasarın giderilmesi için CAT

enziminin aktive olduğu daha önce yapılan bazı çalışmalarda bildirilmiştir (Kazzaz vd., 1996; Tan vd., 1998). Bununla birlikte CAT ve GST gibi enzimlerdeki aktivite değişimleri, düşük dozlarda canlıda fizyolojik dirençliliğin sağlanması için onarım mekanizmalarının teşvik edilmiş olabileceğini göstermektedir (Picot vd., 1992; Kazzaz vd., 1996; Tekcan, 2009). Bu durum ise, 0,5 mg’lık dozda görülen MDA miktarındaki artışın 1 mg’lık dozda azalmasıyla açıklanabilir. Ancak, MDA miktarındaki artışın 2 mg’lık juglon dozunda devam etmesi, hücresel membran yapılarında meydana gelen deformasyonlar sonucu larval hemolenfte fizyolojik uyum kapasitesinin aşılarak onarım mekanizmalarının yetersiz kaldığına işaret etmektedir. Sonuç olarak, antioksidan enzim aktivitelerinde ve MDA miktarında doza bağlı olarak belirlediğimiz bu değişimler, besinsel juglon maruziyetinin LD₅₀ dozlarına yaklařtıķķa larval dirençliliği azalttığını ve oksidatif hasarı arttırdığını göstermektedir.

Çalışma kapsamında hedeflenen bir diğer temel amaç ise juglonun bir anlamda fitokimyasalların böcek hemositlerinde yapısal anormalliklere veya değişikliklere neden olup olmadığını belirlemektir. Çünkü hemositlerde gözlemlenen yapısal anormallikler toksik kimyasalların neden olduğu sitogenetik hasarı göstermek için sıklıkla kullanılmaktadır (Yeh vd., 2005; Wessel vd., 2007). Bu nedenle genotoksitite biyobelirteçlerinin ekotoksikolojik araştırmalarda kullanılması önemli bir çalışmadır. Özellikle, pestisit maruziyetinin genotoksik etkilerini değerlendirmek için yapılan biyolojik izlem çalışmalarında MN testinin uygun ve hızlı bir teknik olduğu bilinmektedir (Siu vd., 2004a; Bolognesi vd., 2011; Kurt ve Kayış, 2015). Tosun vd. (2001)’leri yüksek konsantrasyonda uygulanan pestisitlerin hemositlerde kromozomal delesyon ve anormalliklere, mutasyonlara ve mikronükleus oluşumuna neden olduklarını bildirmişlerdir. Ayrıca toksik, mutajenik ve kanserojen bileşiklerin dolaylı göstergeleri olarak artmış mikronükleus sayısı oldukça önemli bir olgudur (Rencuzoğulları ve Topaktaş, 2000; şekeroğlu-Atlı ve şekeroğlu, 2011). Daha önce yapılan bazı çalışmalarda da farklı özelliklerdeki pestisitlerin canlı organizmalarda MN oluşumunu teşvik ettiği gösterilmiştir (Rencuzoğulları ve Topaktaş, 2000; elik vd., 2005; Uçkan ve Sak, 2010; Kurt ve Kayış, 2015). MN sayısında görülen bu değişimler ise çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu kromozom düzensizliklerinin ve somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın indirekt göstergesi olarak değerlendirilebilir. Uçkan ve Sak (2010) tarafından yapılan bir çalışmada konak tür, *G. mellonella*’nın larval besinine verilen farklı dozlardaki cypermethrin’in pup parazitoiti, *Pimpla turionellae*

hemositlerindeki MN sayısı doza bağılı olarak artmasına neden olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada da daha önce yapılan çalışmalara benzer olarak juglon uygulaması larval hemositlerdeki MN oluşumunu arttırmıştır. Özellikle de MN oluşumunun uygulanan juglon dozlarının artışına bağılı olarak giderek yükselmesi pestisitlerle ilişkili çalışmalara benzerlik göstermektedir (Uçkan ve Sak, 2010, Kurt ve Kayış, 2015). Böylece elde edilen sonuçlar juglonun sitogenetik hasara neden olduğuna ve *G. mellonella* larvaları için genotoksik bir ajan olduğuna işaret etmektedir.

DNA’da meydana gelen hasarın belirlenmesi amacıyla ekotoksikoloji, moleküler epidemiyoloji, biyoizleme ve genotoksisite çalışmalarında kullanılan standart metodlardan bir diğeri ise “Tek hücre jel elektrofozi (COMET)”dir (Packiam vd., 2015). Bununla birlikte çevresel kirleticilerin genotoksik etkilerinin izlenmesinde Mikronükleus testi (MN) ve COMET yönteminin birlikte kullanılması gittikçe popüler hale gelmektedir (Andrade vd., 2004; Ateeq vd., 2005; Çavaş ve Ergene-Gözükara, 2003a, 2003b, 2005). Literatürde çeşitli kimyasalların ekotoksikolojik ve çevresel biyoizleme ile ilgili araştırmalarda bu yöntemlerin birlikte kullanılmasına yönelik bir çok çalışma yer almaktadır (Woźnicki vd., 2004; Siu vd., 2004a; Çavaş ve Könen, 2007; Yılayaz, 2008; Muranlı-Gökalt ve Güner, 2011; Muangphra ve Gooneratne, 2011; Eskandari vd., 2012). Bu çalışmalarda uygulanan genotoksik bileşiklerin kuyruk DNA yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve Olive kuyruk momentleri parametreleriyle belirlenen DNA hasarında ve MN frekansında artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Siu vd., 2004a; Woźnicki vd., 2004). Çavaş ve Könen (2007)’in yaptığı bir çalışmada ise herbisit olarak kullanılan glyphosate’a maruz kalan japon balığı *Carassius auratus* eritrositlerinde DNA hasarının ve MN frekansının doza (5, 10 ve 15 ppm) ve zamana (2, 4 ve 6. gün) bağılı olarak artış göstererek genotoksik ve sitogenetik etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Çevre kirliliğinin izlenmesi amacıyla yapılan bir başka çalışmada ise bir midye türü olan *Anodonta cygnea* hemolenfinde ve solungaç hücrelerinde çeşitli dozlardaki ham petrolün DNA hasarını ve MN sayısını arttırdığı COMET ve MN analizleri ile gösterilmiştir (Eskandari vd., 2012). Toprak kirliliğinin belirlenmesinde kullanılan en iyi organizmanın toprak solucanları olduğu bilinmektedir (Bouche, 1992). Bu amaçla Zang vd. (2000)’nin toprak solucanı *Eisenia fetida* ile yapmış oldukları çalışmada afidlere ve lepidopterlere karşı kullanılan imadokloroplorid ve RH-5849 insektisitlerinin genotoksik ve sitogenetik etkilerinin olduğunu yine COMET ve MN analizleri ile belirlemişlerdir. Muangphra ve Gooneratne (2011) tarafından yapılan

başka bir çalışma da ise ticari neem ekstratına (sekonder bileşik olan azadirachtin içeren) ait LD₅₀ (3,79 ve 3,33 µg cm⁻²) dozlarının toprak solucanı *Pheretima peguana* üzerindeki genotoksik ve sitotoksik etkileri COMET ve MN analizleri ile belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda neem ekstratının toprak solucanı sölomisetleri üzerinde sitotoksik etkili olduğu MN analizi ile belirlenirken, COMET analizi sonrası DNA kırıklarının olmadığı ve genotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Çalışma sonucunda ise, önerilen LD₅₀ dozlarında bir insektisit olarak kullanılmasının toprak solucanı açısından güvenli olduğu bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmalar genetik hasarın belirlenmesinde COMET yönteminin ve mikronükleus testlerinin birlikte değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. Bu nedenle bu çalışmada da juglon ilişkili genetik hasarın analiz edilmesi için COMET ve MN testleri gerçekleştirildi. Böylece farklı dozlarda besinsel juglona maruz kalan *G. mellonella* larval hemositlerinde COMET analizi yapılarak, bulguların değerlendirmesinde ise literatürde de sıklıkla kullanılan Kuyruk Yoğunluğu (% DNA Tail, Tail Intensity) ve Kuyruk Momenti (Tail Moment) parametreleri kullanıldı (Kumaravel ve Jha, 2006). Bununla birlikte kuyruk momenti ile kuyruktaki migrasyon arasındaki paralel ilişki göz önüne alınarak kuyruk migrasyonunda meydana gelen değişimler de analiz edildi.

Yeşil kurt olarakda bilinen *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) ile yapılan bir çalışmada fitopestisit olarak kullanılan PONNEEM'in 5, 10 ve 20 ppm'lik dozlarının 3. dönem larvaların bağırsak hücreleri üzerindeki genotoksik etkileri araştırılmıştır. Söz konusu çalışmada kuyruk momenti, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu parametrelerinde doza bağlı artış olduğu bildirilmiştir (Packiam vd., 2015). Ayrıca daha önce yapılan az sayıdaki çalışmalarda bazı kimyasalların *Drosophila melanogaster* türü üzerinde de benzer toksikolojik etkilere neden oldukları COMET analizleri ile tespit edilmiştir (Gaivao vd., 1999; Kar-Chowdhuri vd., 2001; Nazir vd., 2003). Bu çalışmalara benzer olarak bu çalışmada da juglon uygulamasına bağlı olarak 0,5 ve 1 mg'lık dozlarda kontrol grubuna göre kuyruk yoğunluğunda, kuyruk momentinde ve kuyruk migrasyonunda artış olduğu belirlendi. Ayrıca DNA hasarının, 2 mg'lık juglon dozunda da kontrole göre arttığı, fakat 1 mg'lık doz ile kıyaslandığında daha az olduğu tespit edildi.

Bir hücrede yüksek miktarda DNA hasarı meydana geldiğinde iki yol mevcuttur. Hücre apoptoz mekanizmalarını aktif hale getirerek ölüme gider ya da değişikliğe

uğramış bir genomla hayatta kalır. Hasara karşı toleranstaki artış, yüksek mutasyon oranına sahip bir genomla yaşamını sürdürmek anlamına gelmektedir. Bu çalışmada 0,5 ve 1 mg'lık dozlarda DNA hasarının kontrol grubuna oranla anlamlı seviyede arttığı görülmektedir. Bu artış kontrol grubu ile kıyaslandığında 0,5 mg'lık dozda % 13,75, 1 mg'lık dozda ise % 26,24 oranında belirlendi. DNA hasarındaki artışın uygulanan dozla doğru orantılı olmayışı, DNA onarım mekanizmalarının doz artışına bağlı olarak daha etkili işlev gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte hasarın tamamen onarılamamış olması, hücrelerin yüksek DNA hasarına sahip bir genomla yaşamayı tercih ettiğinin göstergesidir. Bu durum, 1 ve 2 mg'lık dozlar kıyaslandığında DNA hasarında görülen azalmayı da (% 10,41) açıklamaktadır. Bununla birlikte, 2 mg'lık doz uygulanan hücreler için olası bir diğer mekanizmanın apoptoza giden hücre sayısındaki artış olduğu düşünülebilir. Yüksek düzeyde DNA hasarına sahip hücrelerin bir bölümünün apoptoza uğraması bir bölümünün ise kalıcı kromozom hasarlarıyla yaşamaya devam etmesi sonucunda 2 mg'lık dozda daha düşük seviyede DNA hasarı tespit edilmiştir. Bu düşüncüyü mikronükleus testinden elde edilen sonuçlar desteklemektedir. Bu testten elde edilen sonuçlara göre kromozomal hasar doza bağlı olarak artış göstermektedir. Daha önceki çalışmalardan elde edilen veriler, kümelenmiş çoklu DNA hasarının zamanla onarımı mümkün olmayan kromozomal kırıklara dönüştüğünü ortaya koymaktadır (Asaithamby ve Chen, 2012). Bununla birlikte önceki çalışmaların sonuçları, apoptik hücrelerin sayısındaki artış ile mikronükleus testi ile tespit edilen kromozom hasarındaki artışın doğru orantılı olduğunu ortaya koymaktadır (Simko vd., 1998; Meintieres vd., 2001).

Ekotoksikolojik analizlerde DNA hasarını ve MN oluşumunu birlikte analizlemek genotoksik materyalin uygulandığı canlıda zamana ve doza bağlı değişimlerin karşılaştırılmasına da olanak sağlamaktadır. Böylece bu çalışmanın kapsamında MN ve DNA hasarına ait verilerimizin apoptotik mekanizmalarla olan ilişkisinin ileride yapılacak çalışmalarla kesinliğe kavuşturulması gerektiği düşünülebilir. Ayrıca bir fitokimyasal olan juglonun mutajenite ve toksititesi ile ilgili potansiyel ekotoksik risklerinin değerlendirilmesinde *in vitro* genotoksisite testlerin biyolojik izlenmesi faydalı olabilir.

Sonuç olarak, tez çalışması kapsamında sunulan bulgular juglonun model böcek ve depo zararlısı olan büyük balmumu güvesi *G. mellonella*'nın zararlı evresi üzerinde

oksidatif ve genotoksik açıdan etkili olduğunu göstermektedir. Bu nedenle juglonun ya da ceviz yaprak ve meyvalarından elde edilen bitki ekstraktlarının biyopestisit olarak depo zararlıları ile entegre mücadele çalışmalarında kullanımı önerilebilir. Bu amaçla ticari olarak geliştirilmiş olan juglon, tez çalışması ve 214Z282 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında belirlenen dozlara bağlı kalmak koşuluyla balmumu yapımı sırasında toz halinde karışım içine katılabilir. Böylece güve ile mücadelede balmumuna katılan ve kalıntı düzeyi yüksek olan naftalin ve benzeri kimyasallara göre juglon kullanımının daha güvenli olabileceği düşünülmektedir. Juglonun bitkisel pestisit olarak zararlı mücadelesinde kullanılabilmesi ile ilgili bir diğer alternatif ise saf juglonun bu çalışmalarda belirlenen letal dozlara göre uçucu çözücüler (metanol, etanol, aseton) içinde sıvı formülasyonlarının hazırlanması ve kovanların bekletileceği depolara ya da boş kovanlara, balı süzölmüş ve depolanmış çerçevelere uygulanması olabilir. Ancak sıvı formülasyon formunda kullanım sonrasında juglonun kalıntı sorunu olmadığı belirlenmesi için yeni çalışmaların yapılmasını ve çözücülerin uzaklaştırılması için uygulama alanlarının havalandırılması önerilebilir. Bu bilgilere ilaveten kullanılacak juglon ülkemizde de yaygın bulunan *Juglans* cinsine ait ceviz türlerinin yaprak ve meyvalarından ekstrakte edilerek ilgili kromatografik analizler ile saflaştırılıp doğal ürün olarak da elde edilebilir. Bu ekstraktların diğer bileşenlerinin de zararlı ve yararlı böcekler üzerindeki fizyolojik ve biyokimyasal etkilerinin ileride yapılacak çalışmalarda araştırılması önerilmektedir. Böylece çalışma kapsamında elde edilen bulgular göz önünde tutularak saf juglonun veya doğal ekstraktlarının biyopestisit olarak kullanılabilirliğinin kesinleştirilmesi için, kullanım sonrasında etkinlik sürelerinin ve kullanım izni olan diğer pestisitler ile oluşabilecek reaksiyonlarının belirlenmesine yönelik yeni çalışmaların oluşturulması gerekmektedir. Aynı zamanda tez kapsamında yapılan tüm analizlerin çevre dostu yeni bitkisel pestisitlerin toksikolojik analizlerinde *G. mellonella* türünün model organizma olarak kullanılmasının elverişli olacağını, SOD ve GST aktivitelerindeki değişimlerin ve DNA hasarının, çevresel toksikoloji ve biyomonitörleme çalışmalarında biyolojik belirteç olarak kullanılabileceği önerilmektedir.

KAYNAKÇA

- Adeyemi, M. M. H. (2010). The potential of secondary metabolites in plant material as deterrents against insect pests: a review. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 4 (11), 243-246.
- Ahmad, M., Arif, M. I. and Attique, M. R. (1997). Pyrethroid resistance of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan. *Bulletin of Entomological Research*, 87, 343-347.
- Ahmad, S. (1992). Biochemical defence of pro-oxidant plant allelochemicals by herbivorous insects. *Biochemical Systematics and Ecology*, 20, 269-296.
- Ahmad, S., Brattsten, L. B., Mullin, C. A. and Yu, S. J. (1986). Enzymes involved in the metabolism of plant allelochemicals. *Molecular Aspects of Insect-Plant Associations*, Plenum Press, 73-151.
- Ahmad, S., Pritsos, C. A., Bowen, S. M., Heisler, C. R., Blomquist, G. J. and Pardini, R. S. (2005). Subcellular distribution and activities of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in the southern armyworm, *Spodoptera eridania*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 7, 173-18.
- Ahmad, S., Zaman, K., MacGill, R. S., Batcabe, J. P. and Pardini, R. (1995). Dichloro-induced oxidative stress in a model insect species, *Spodoptera eridania*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 29, 442-448.
- Akçelik, M. (1987). Büyük Mum Güvesi (*Galleria mellonella* L.)'ya Etkili *Bacillus thuringiensis* Suşları ve Bunların Plazmid İçerikleri Üzerine Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Akhtar, Y., Isman, M. B., Niehaus, L. A., Lee, C. H. and Lee, H. S. (2012). Antifeedant and toxic effects of naturally occurring and synthetic quinones to the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Crop Protection*, 31, 8-14.
- Al-Izzi, M. A. J., Al-Maliky, S. K. and Jabbo, N. F. (1987). Culturing the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) (Lep., Pyralidae), on an artificial diet. *Journal of Economic Entomology*, 80 (1), 277-280.
- Altınçipek, B., Lindner, M., Linder, D., Preissner, K., Vilcinskas, A. (2007). Microbial

- metalloproteinases mediate sensing of invading pathogens and activate innate immune responses in the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *Infection and Immunity*, 75, 175-183.
- Altuntaş, H. (2015a). Determination of gibberellic acid (GA3)-induced oxidative stress in a model organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental Entomology (Physiology)*, 44 (1), 100-105.
- Altuntaş, H. (2015b). Effects of ethephon on the hemolymph metabolites of the greater wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Physica Polonica A*, 128, 182-183.
- Altuntaş, H., Duman, E., Şanal-Demirci, S. N. and Ergin, E. (2016). Toxicological and physiological effects of ethephon on the model organism, *Galleria mellonella* L. 1758 (Lepidoptera: Pyralidae). *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 40 (4), 413-423.
- Andrade, V. M., Freitas, T. R. and Silva, J. (2004). Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutation Research*, 560, 57-67.
- Ardağ, A. (2008). Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemlerinin Analitik Açıdan Karşılaştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Asaithamby, A. and Chen, D. J. (2012). Mechanism of Cluster DNA Damage Repair in Response to High-Atomic Number and Energy Particles Radiation. *Mutation Research*, 711 (1-2), 87-99.
- Aslantürk, A., Kalender, S., Uzunhisarcıklı, M. and Kalender, Y. (2011). Effects of methidathion on antioxidant enzyme activities and malondialdehyde level in midgut tissues of *Lymantria dispar* (Lepidoptera) larvae. *Journal of the Entomological Research Society*, 13 (3), 27-38.
- Ateeq, B., Abul-Farah, M. and Ahmad, W. (2005). Detection of DNA damage by alkaline single cell gel electrophoresis in 2,4-dichlorophenoxyacetic-acid- and butachlor-exposed erythrocytes of *Clarias batrachus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62, 348-354.

- Augustyniak, M., Orzechowska, H., Kedzierski, A., Sawczyn, T. and Dolezych, B. (2014). DNA damage in grasshoppers' larvae – Comet assay in environmental approach. *Chemosphere*, 96, 180-187.
- Aydın, Ç. And Mammadov, R. (2017). İnsektisit Aktivite Gösteren Bitkisel Sekonder Metabolitler ve Etki Mekanizması. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21, 30-37.
- Azizoğlu, U., Sancar, B. and Yılmaz, S. (2012). Organik tarımda biyolojik mücadele; entomopatojen biyoinsektisitler. Erciyes Üniversitesi, *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 28 (5), 375-381.
- Babich, H. and Stern, A. (1993). In vitro cytotoxicities of 1,4-naphthoquinone and hydroxylated 1,4-naphthoquinones to replicating cells. *Journal of Applied Toxicology*, 13, 353-380.
- Babula, P., Adam, V., Havel, L. and Kizek, R. (2009). Noteworthy Secondary Metabolites Naphthoquinones - their Occurrence, Pharmacological Properties and Analysis. *Current Pharmaceutical Analysis*, 5, 47-68.
- Barbehenn, R. V., Bumgarner, S. L., Roosen, E. F. and Martin, M. M. (2001). Antioxidant defenses in caterpillars: role of the ascorbate-recycling system in the midgut lumen. *Journal of Insect Physiology*, 47, 349-357.
- Baş, O. (2006). Dinitrocresol'ün (Rat Rattus Norvegicus) Sıçan Glutasyon-S-Transferaz Enzim Aktivitesine Etkisi. *Yüksek Lisans Tezi*, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, B. Ş. and Alvur, M. (2004). DNA hasarı analizinde μ -FADU ve Comet yöntemlerinin karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2 (3), 97-103.
- Bellomo, G., Mirabelli, F., DiMonte, D., Richelmi, P., Thor, H., Orrenius, C. and Orrenius, S. (1987). Formation and reduction of glutathione-protein mixed disulfides during oxidative stress. A study with isolated hepatocytes and menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone). *Biochemical Pharmacology*, 36, 1313-1320.

- Bhuyan, K. C., Bhuyan, D. K. and Podos, S. M. (1991). Free radical enhancer xenobiotic is an inducer of cataract in rabbit. *Free Radical Research Communications*, 12 (13), 609-620.
- Bolognesi, C., Creus, A., Ostrosky-Wegman, P. and Marcos, R. (2011). Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis*, 26, 19-26.
- Bouche, M. B. (1992). Earthworm species and ecotoxicological studies. In: Greig-Smith, P. W., Becker, H., Edwards, P. J., Heimbach(Eds.), *Ecotoxicology of Earthworms*, Intercept, Andover, UK, 2-6.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Annu. Biochem.*, 72, 248-254.
- Burgeot, T., His, E. and Galgani, F. (1995). The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. *Mutation Research*, 342, 125-140.
- Burgueno-Tapia, E., Castillo, L., Gonzalez-Coloma, A. and Joseph-Nathen, P., (2008). Antifeedant and phytotoxic activity of the sesquiterpene r-benzoquinone perezone and some of its derivatives. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 766-771.
- Büyükgüzel, E., Büyükgüzel, K., Snela, M., Erdem, M., Radtke, K., Ziemnicki, K. and Adamski, Z. (2013). Effect of boric acid on antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation and ultrastructure of midgut and fat body of *Galleria mellonella*. *Cell Biology and Toxicology*, 29, 117-129.
- Büyükgüzel, K. (2002a). Effects of Some Antimicrobial Agents on the Total Protein Content of the Endoparasitoid *Pimpla turionellae* (L.) (Hym., Ichneumonida). *Turkish Jorunal of Zoology*, 26, 101-109.
- Büyükgüzel, K. (2002b). Antimicrobial Agents: Their Combined Effects on Total Protein Content of the Endoparasitoid *Pimpla turionellae* (L.) (Hym., Ichneumonidae). *Turkish Jorunal of Zoology*, 26, 229-237.

- Carvalho Pinto-Silvaa, C. R., Ferreirab, J. F., Costaa, R. H. R., Belli-Filhoa, P., Creppyc, E. E. and Matiasa, W. G. (2003). Micronucleus induction in mussels exposed to okadaic acid. *Toxicon*, 41, 93-97.
- Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, V., Calzaretto, G. and Landriscina, C. (2004). Rat Liver Glutathione-S-Transferase Activity Stimulation Following Acute Cadmium or Manganese Intoxication. *Toxicology*, 200, 29-38.
- Cespedes, C. L., Lina-Garcia, L., Kubo, I., Salazar, J. R., Ariza-castolo, A., Alarcon, J., Aqueveque, P., Werner, E. and Seigler, D. S. (2016). *Calceolaria integrifolia* s. l. complex, reduces feeding and growth of *Acanthoscelides obtectus*, and *Epilachna varivestis*. A new source of bioactive compounds against dry bean pests. *Industrial Crops & Products*, 89, 257-267.
- Chance, B. and Maehly, A. C. (1955). Assay of catalase and peroxidases. *Methods Enzymology*, 2, 764-775.
- Choy, W. N. (2001). Genetic toxicology and cancer risk assessment. *Marcel Dekker*, New York, 29-187.
- Clark, A. M., Jurgens, T. M. and Hufford, C. D. (2006). Antimicrobial activity of juglone. *Phytotherapy Research*, 4, 11-14.
- Collins, A. R., Ma, A. G. and Duthie, S. J. (1995). The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks) and oxidized pyrimidines in human cells. *Mutation Research*, 336, 69-77.
- Cook, S. M. and McArthur, J. D. (2013). Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence*, 4, 350-353.
- Cotelle, S. and Ferard, J. F. (1999). Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34, 246-255.
- Cox, C. (1996). Insecticide Factsheet Cypermethrin. *Journal of Pesticide Reform*, 16 (2), 15-20.
- Cutler, R. G., Plummer, J., Chowdhury, K. and Heward, C. (2005). Oxidative Stress Profiling: Part II. Theory, Technology, and Practice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1055, 136-58.

- Çavaş, T. and Ergene-Gözükar, S. (2003a). Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. *Mutation Research*, 534, 93-99.
- Çavaş, T. and Ergene-Gözükar, S. (2003b). Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research*, 538, 81-91.
- Çavaş, T. and Ergene-Gözükar, S. (2005). Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46, 64-70.
- Çavaş, T. and Könen, S. (2007). Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*, 22 (4), 263-268.
- Çelik, A., Mazmancı, B., Çamlıca, Y., Aşkın, A. and Çömelekoğlu, U. (2005). Induction of micronuclei by lambda-cyhalothrin in Wistar rat bone marrow and gut epithelial cells. *Mutagenesis* 20, 125-129.
- Çelik, K., Çoşkun, B., Kalmış, H., Demir, E., İleri, C., Benek, S. Timmers, B., Lansipuro, J., Mucsi, I., Deconinck, K., Verdyt, S., Canalicchio, M., Amoroso, W., Gardı, T., Dymacz, M. and Czerantowicz, W. (2012). Arıcılık El Kitabı. Beekeeping European Environmental Sustainability ‘Bees’ projesi, <http://issuu.com/tudas-alapitvany/docs/bees-turkish>, Son erişim tarihi: 01 Ekim 2017.
- Çelik, S. (2001). APS ile opere edilen tavşanların kan ve karaciğer dokularındaki serbest oksijen radikalleri ve antioksidan enzim düzeylerinin tayini. *Yüksek Lisans Tezi*, Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Daggett, D. A., Oberley, D. T., Nelson, S. A., Wright S. L., Kornguth, S. E. and Siegel, F. L. (1998). Effects of Lead on Rat Kidney And Liver: GST Expression and Oxidative Stress. *Toxicology*, 128, 191-206.

- Dere, B., Altuntaş, H. and Nurulloğlu, Z. U. (2015). Insecticidal And Oxidative Effects Of Azadirachtin On The Model Organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Archives Of Insect Biochemistry And Physiology*, 0, 1-15.
- Di Mascio, P. Murphy, M. E. and Sies, H. (1991). Antioxidan defense system: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 194-200.
- Dikilitaş, M. ve Koçyiğit, A. (2010). Canlılarda “Tek hücre jel elektroforez” yöntemi ile DNA hasar analizi (Teknik Not): Comet Analiz Yöntemi. *Journal of Agricultural Faculty HR.U*, 14 (2), 77-89.
- Diplock, A. (1998). Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. *ILSI Europe concise monograph series*, 59 p., Belgium.
- Duke, J. and Ayensu, E. S. (1985). Medicinal plants of China. *Reference Publications Inc. Algonac, MI*.
- Duthie, G. G., Wahle, K. W. J. and James, W. P. T. (1989). Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. *Nutr. Res. Rev.*, 2, 51-62.
- Duthie, S. J. and Collins, A. R. (1997). The influence of cell growth, detoxifying enzymes and DNA repair on hydrogen peroxide-mediated DNA damage (measured using the Comet assay) in human cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 22, 717-724.
- Emam, A. M., Swelam, E. S. and Megally, N. Y. (2009). Furocoumarin and quinolone alkaloid with larvicidal and antifeedant activities isolated from *Ruta chalepensis* leaves. *Journal of Natural Products*, 2, 10-22.
- Eren, S. H. (2008). Sıçanlarda Melatonin Desteğinin Akut (Hafif ve Ağır) Egzersizle Çeşitli Dokularda Oluşan Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Durum Üzerine Etkileri. *Yüksek Lisans Tezi*, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Selçuk Üniversitesi, Konya.
- Eskandari, S., Mozdarani, H., Mashinchian-Moradi, A. and Shahhosseiny, M. H. (2012). Cytogenetic damage induced by crude oil in *Anodonta cygnea* (mollusca,

- bivalvia) assessed by the comet assay and micronucleus test. *International Journal of Marine Science and Engineering*, 2 (4), 215-224.
- Fahmy, N. M. (2012). Impact of two insect growth regulators on the enhancement of oxidative stress and antioxidant efficiency of the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, 5 (1), 137-149.
- Fang, Y. Z., Yang, S. and Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*, 18, 872- 879.
- Felton, G. W. and Duffey, S. S. (1991). Protective action of midgut catalase in lepidopteran larvae against oxidative plant defenses. *Journal of Chemical Ecology*, 17, 1715-1732.
- Felton, G. W. and Summers, C. B. (1995). Antioxidant systems in insects. *Archives of Insects Biochemistry and Physiology*, 29 (2), 187-197.
- Felton, G. W., Donato, K. K., Del-Vecchio, R. J. and Duffey, S. S. (1989). Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 15, 2667-2694.
- Fila, C., Metz, C. and Sluijs, P. (2008). Juglone Inactivates Cysteine-rich Proteins Required for Progression through Mitosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 283 (31), 21714-21724.
- Gaeta, L. M., Tozzi, G., Pastore, A., Federici, G. and Piemonte, F. (2002). Determination of superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in blood of healthy pediatric subjects. *Clinica Chimica Acta*, 322, 117-120.
- Gaivao, I., Sierra, L. M. and Comendador, M. A. (1999). The w/w+ SMART assay of *Drosophila melanogaster* detects the genotoxic effects of reactive oxygen species inducing compounds. *Mutation Research*, 440, 139-145.
- Ganapaty, S., Thomas, P. S., Fotso, S. and Laatsch, H. (2004). Antitermitic quinones from *Diospyros sylvatica*. *Phytochemistry*, 65, 1265-1271.

- Gichner, T., Znidar, I., Wagner, E. D. and Plewa, M. J. (2009). The use of higher plants in the comet assay. In: *The Comet Assay in Toxicology* Edited by Alok Dhawan and Diana Anderson. *Royal Society of Chemistry*, 98-119.
- Gilbert, B. L., Baker, J. E. and Norris, D. M. (1967). Juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) from *Carya ovata*, a deterrent to feeding by *Scolytus multistriatus*. *Journal of Insect Physiology*, 13, 1453-1459.
- Grant, D. (1991). Detoxification pathways in the liver. *J Inher Metab Dis.*, 14, 421-430.
- Greathouse, K. L., Samuels, M., DiMarco, N. M. and Criswell, D. S. (2005). Effects of Increased Dietary Fat and Exercise on Skeletal Muscle Lipid Peroxidation and Antioxidant Capacity in Male Rats. *European Journal of Nutrition*, 44 (7), 429-35.
- Grubor-Lajsic, G., Block, W., Telesmanic, M., Jovanovic, A., Stevanovic, D. and Baca F. (1997). Effect of Cold Acclimation on the Antioxidant Defense System of Two Larval Lepidoptera (Noctuidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 36, 1-10.
- Habig, W. B., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130-7139.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York, A.B.D.
- Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K., Wada, K., Kinae, N. and Saotome, K. (1998). Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutation Research*, 399, 125-33.
- Heddle, J. A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. T., Newell, G. W. and Salamone, M. F. (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency, gene-tox program. *Mutation Research*, 123, 61-118.
- Heinle, H. and Betz, E. (1994). Effects of dietary garlic supplementantation in rat model of atherosclerosis. *Arznei For*, 44, 614-617.

- Hill, T. A. and Foster, R. E. (2000). Effect of insecticides on the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) and its parasitoid *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Economical Entomology*, 93 (3), 763-768.
- Hyrsl, P., Büyükgüzel, E. and Büyükgüzel, K. (2007). The effects of boric acid-induced oxidative stress on antioxidant enzymes and survivorship in *Galleria mellonella*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 66, 23-31.
- Im, Y. S., Chung, Y., Won, D. Y., Kwon, S. H., Kim, H. R., Lee, D. G., Kim, S. R., Park, K. D., Lee, H. K. and Choi, J. K. (2010). Apoptotic effect of Naphthoquinone derivatives on HCT116 colon cancer cells. *Genes & Genomics*, 32, 592-598.
- Inbaraj, J. J. and Chignell, C. F. (2004). Cytotoxic action of juglone and plumbagin: a mechanistic study using HaCaT keratinocytes. *Chemical Research Toxicology*, 17, 55-62.
- Isman, M. B. (1997). Neem and other botanical insecticides banlers to commercialization. *Phytoparasitica*, 25, 339-344.
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19, 603-608.
- Isman, M. B. (2002). Insect antifeedants. *Pestic, Outlook*, 13, 129-176.
- Isman, M. B. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Reviews of Entomology*, 51, 45-66.
- Jeyasankar, A., Raja, N. and Ignacimuthu, S. (2010). Antifeedant and growth inhibitory activities of *Syzygium lineare* Wall (Myrtaceae) against *Spodoptera litura* Fab (Lepidoptera: Noctuidae). *Current Research Journal of Biological Sciences*, 2 (3), 173-177.
- Jin, R. (2010). A DFT study on the radical scavenging activity of juglone and its derivatives. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 939, 9-13.
- Jones, J. C. (1964). Differential haemocyte counts from unfixed last stage *Galleria mellonella*. *American Zoologist*, 4, 337-346.

- Junqueira, J. C. (2012). *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: Recent studies and new perspectives. *Virulence*, 3 (6), 474-476.
- Kara, A. (2009). Yeni Doğan Ratlarda Amikazine Bağlı Deneysel Böbrek Hasarı ve Antioksidanların Rolü. *Uzmanlık Tezi*, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Isparta.
- Kar-Chowdhuri, D., Nazir, A. and Saxena, D. K. (2001). Effect of three chlorinated pesticides on hsrw stress gene in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 15, 173-186.
- Kaur, A., Sohal, S. K., Arora, S., Kaur, H. and Kaur, A. P. (2014). Effect of plant extracts on biochemistry of *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2 (3), 86-92.
- Kavanagh, K. and Fallon, J. (2010). *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. *Fungal Biology Reviews*, 24, 79-83.
- Kavanagh, K. and Reeves, P. E. (2007). Insects and mammalian innate immune responses are much alike. *Microbe*, 2, 596-599.
- Kazzaz, J. A., Xu, J., Palaia, T. A., Mantell, L., Fein, A. M. and Stuart-Horowitz, S. (1996). Cellular Oxygen Toxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 (25), 15182-15186.
- Khambay, B. P. S., Batty, D., Jewess, P. J., Bateman, G. L. and Hollomon, D. W. (2003). Mode of action and pesticidal activity of the natural product dunnione and of some analogues. *Pest Management Science*, 59, 174-182.
- Koçyiğit, A., Keleş, H., Selek, S., Güzel, S., Çelik, H. and Erel, O. (2005). Increased DNA damage and oxidative stress in patients with Cutaneous leishmaniasis. *Mutation Research*, 585, 71-78.
- Krishnakumari, G., Bhuvaneswari, N. and Swapna, I. R. (2001). Antifeedant activity of quinones from *Ventilago madaraspatana*. *Fitoterapia*, 72, 672-675.
- Krishnan, N. and Kodrik, D. (2006). Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): Are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress. *Journal of Insect Physiology*, 52, 11-20.

- Krishnan, N. and Sehnal, F. (2006). Compartmentalization of oxidative stress and antioxidant defense in the larval gut of *Spodoptera littoralis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 63, 1-10.
- Krishnan, N., Kodr k, D., K udkiewicz, B. and Sehnal, F. (2009). Glutathione-ascorbic acid redox cycle and thioredoxin reductase activity in the digestive tract of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39, 180-188.
- Kudon, L. H., Berisford, C. W. and Dalusky, M. J. (1988). Refinement of a spray timing technique for the Nantucket pine tip moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Entomological Science*, 23 (2), 180-186.
- Kumaravel, T. S. and Jha, A. N. (2006). Reliable comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals. *Mutation Research*, 605, 7-16.
- Kumova, U. ve Korkmaz, A. (2002). Peteklerin büyük bal mumu güvesi (*Galleria mellonella* L.)'ne kar s  korunması üzerine bir ara tırma. Türkiye 3. Arıcılık Kongresi, Adana.
- Kurt, D. and Kayı , T. (2015). Effects of the pyrethroid insecticide deltamethrin on the hemocytes of *Galleria mellonella*. *Turkish Journal of Zoology*, 39, 452-457.
- Kwadha, C. A., Ong'amo, G. O., Ndegwa, P. N., Raina, S. K. and Fombong, A. T. (2017). The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. *Insects*, 8, 61.
- Larson, R. A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*. 27 (4), 969-978.
- Lee, C. Y., Yap, H. H. and Chong, N. L. (1996). Insecticide resistance and synergism in field collected *German cockroache* (Dictyoptera: Blattellidae) in Peninsular Malaysia. *Bulletin of Entomological Research*, 86, 675-682.
- Lee, K. (1991). Glutathione S-transferase activities in phytophagous insects: Induction and inhibition by plant phototoxins and phenols. *Insect Biochemistry*, 21, 353.

- Lenteren-Van, J. C. (1995). Integrated pest management in protected crops. D. Dent (ed.) *Integrated Pest Management*, 311-343, Chapman & Hall, London.
- Li, Q., Zhao, X. L., Sun, J., Jiang, S. G. and Gong, X. F. (2013). Anti-proliferative and apoptosis-inducing activities of juglone in LS-174T cells. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 8, 65-72.
- Lin, A., Zhang, X., Chen, M. and Cao, Q. (2007). Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *Journal of Environmental Science*, 19, 596-602.
- Lindroth, R. L. (1989). Chemical ecology of luna moth: effects of host plant on detoxification enzyme activity. *Journal of Chemical Ecology*, 15, 2019-2029.
- Lindroth, R. L., Anson, B. D. and Weisbrod, A. V. (1990). Effects of protein and Juglone on Gypsy moths: Growth performance and detoxification enzyme activity. *Journal of Chemical Ecology*, 16 (8), 2533-2547.
- Mandato, C. A., Diehl-Jones, W. L., Moore, S. J. and Downer, R. G. H. (1997). The effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on prophenoloxidase activation, phagocytosis and cell spreading in *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology*, 43,1-8.
- Mano, T., Sinohara, R., Sawai, Y., Oda, N., Nishida, Y., Mokuno, T., Kotake, M., Hamada, M., Masanuga, R., Nakai, A. and Nagasaka, A. (1995). Effects of thyroid hormone on coenzyme Q and other free radical scavengers in rat heart muscle. *Journal of Endocrinology*, 145, 131-136.
- Martínez-Paz, P., Morales, M., Martínez-Guitarte, J. L. and Morcillo, G. (2013). Genotoxic effects of environmental endocrine disruptors on the aquatic insect *Chironomus riparius* evaluated using the comet assay. *Mutation Research*, 758, 41-47.
- Mathews, M. C., Summers, C. B. and Felton, G. W. (1997). Ascorbate peroxidase: a novel antioxidant enzyme in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 34, 57-68.

- McCord, J. M. and Fridovich, I. (1969). Superoxide dimutase an enzymatic function for erythrocyte. *The Journal of Biological Chemistry*, 244, 6049-6055.
- McNamee, J. P., McLean, J. R. N., Ferrarotto, C. L. and Bellier, P. V. (2000). Comet assay: rapid processing of multiple samples. *Mutation Research*, 466, 63-69.
- Meintieres, S., Biola, A., Pallardy, M. and Marzin, D. (2001). Apoptosis can be a confusing factor in in vitro clastogenic assays. *Mutagenesis*, 16 (3), 243-250.
- Meister, A. and Anderson, M. E. (1983). *Annual Review of Biochemistry*, 52, 711-760.
- Milind-Parle, M. and Deepa, K. (2011). Walnut: Not a hard nut to crack. *International Research Journal of Pharmacy*, 2 (5), 8-17.
- Mineau, P. and Whiteside, M. (2013). Pesticide Acute Toxicity Is a Better Correlate of U.S. Grassland Bird Declines than Agricultural Intensification. *PLOS ONE*, 8 (2), 57457.
- Missirlis, F., Rahlfs, S., Dimopoulos, N., Bauer, H., Becker, K., Hilliker, A. and Phillips, J. P. (2003). A putative glutathione peroxidase of *Drosophila* encodes thioredoxin peroxidase that provides resistance against oxidative stress but fails to complement a lack of catalase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 384 (3), 463-472.
- Montenegro, R. C. (2010). Cytotoxic activity of naphthoquinones with special emphasis on juglone and its 5-O-methyl derivative. *Chemico-Biological Interactions*, 184, 439-448.
- Moosbeckhofer, R., Wallner, K., Pechhacker, H., Luh, M. and Womastek, R. (1995). Residue level in honey. wax and propolis after ten years of Varroa treatment in Austria. The XXXIVth International Apicultural Congress, 15-19, Lausanne, Switzerland.
- Muangphra, P. and Gooneratne, R. (2011). Toxicity of Commercial Neem Extract to Earthworms (*Pheretima peguana*). *Applied and Environmental Soil Science*, Article ID 925950.

- Mukhopadhyay, I., Chowdhuri, D. K., Bajpayee, M. and Dhawan, A. (2004). Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 19 (2), 85-90.
- Muranlı-Gökalp, F. D. and Güner, U. (2011). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 726 (2), 104-108.
- Nazir, A., Mukhopadhyay, I., Saxena, D. K. and Chowdhuri, D. (2003). Evaluation of toxic potential of captan: Induction of hsp70 and tissue damage in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ) Bg9. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17, 98-107.
- Nordberg, J. and Arner, E. S. (2001). Reactive Oxygen Species Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 1287-1312.
- Nowak, J. T., Fettig, C. J, Mc Cravy, K. W. and Berisford, C. W. (2000). Efficacy tests and determination of optimal spray timing values to control Nantucket pine tip moth (Lepidoptera: Tortricidae) infestations. *Journal of Economical Entomology*, 93 (6), 1708-1713.
- Olive, P. L., Banath, J. P. and Durand, R. E. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. *Radiation Research*, 122 (1), 86-94.
- Omar, K., Faraj, N. M., Malik, S. A. and Al-Farhani, I. M. (2012). Effect of some medicinal plants extracts and cypermethrin against khapra beetle (*Trogoderma granarium* Everts). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24 (2), 120-127.
- Oruç, E. (2011). Effects of diazinon on antioxidant defense system and lipid peroxidation in the liver of *Cyprinus carpio* (L.). *Environmental Toxicology*, 26, 571-578.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A. and Deemer, E. K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP)

- assays: A comparative study. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (11), 3122-3128.
- Özer, M. (1961). Arı Kovanlarında Önemli Zarar Yapan Balmumu Güvesi (*Galleria mellonella* L.)'nin Morfoloji, Biyoloji ve Yayılışı Üzerinde Araştırmalar. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Kürsüsü Çalışmalarından, 26-35.
- Özkan, C. (2012). Bitki zararlıları ile savaşım yöntem ve ilaçları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü.
- Özkaya, A. (2007). Oksidatif Strese Maruz Kalan Ratların Bazı Biyokimyasal Parametrelerine Hesperetin ve Ellagik Asidin Etkisi. *Doktora Tezi*, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Packiam, S. M., Emmanuel, C., Baskar, K. and Ignacimuthu, S. (2015). Feeding Deterrent and Genotoxicity Analysis of a novel Phytopesticide by using Comet Assay against *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58 (4), 487-493.
- Paglia, D. and Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70, 158-159.
- Park, B. S., Kim, J. R., Lee, S. U., Kim, K. S., Takeoka, G. R., Ahn, Y. J. and Kim, J. H. (2005). Selective growth-inhibiting effects of compounds identified in *Tabebuia impetiginosa* inner bark on human intestinal bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1152-1157.
- Paul, D. and Sohkhet, M. D. (2012). Anti-feedant, repellent and growth regulatory effects of four plants extracts on *Pieris brassicae* larvae (Lepidoptera: Pieridae). *Open Access Scientific Reports*, 1 (10), 1-5.
- Paulsen, M. T. and Ljungman, M. (2005). The natural toxin juglone causes degradation of p53 and induces rapid H2AX phosphorylation and cell death in human fibroblasts. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 209, 1-9.
- Pavela, R. (2013). Efficacy of naphthoquinones as insecticides against the house fly, *Musca domestica* L. *Industrial Crop and Product*, 43, 745-750.
- Pavunraj, M., Muthu, C., Ignacimuthu, S., Janarthanan, S., Duraipandiyan, V., Raja, N. and Vimalraj, S. (2011). Antifeedant activity of a novel 6-(4,7-hydroxy-heptyl)

- quinone from the leaves of the milkweed *Pergularia daemia* on the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hub.) and the tobacco armyworm *Spodoptera litura* (Fab.). *Phytoparasitica*, 39, 145-150.
- Peric'-Mataruga, V., Blagojevic, D., Spasic, M. B., Ivanovic, J. and Jankovic-Hladni, M. (1997). Effect of the host plant on the antioxidative defence in the midgut of *Lymantria dispar* L. caterpillars of different population origins. *Journal of Insect Physiology*, 43, 101-106.
- Picot, I. C., Trivier, J. M., Nicole, A., Sinet, P. M. and Thevenin, M. (1992). Age-Related Modifications of Copper-Zinc Superoxide Dismutase and Glutathione-Related Enzyme Activities in Human Erythrocytes. *Clinical Chemistry*, 38 (1), 66-70.
- Piskorski, R., Ineichen, S. and Dorn, S. (2011). Ability of the oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) to detoxify Juglone, the main secondary metabolite of the non-host plant walnut. *Journal of Chemical Ecology*, 37, 1110-1116.
- Pohlon, E. and Baldwin, I. T. (2001). Artificial diets 'capture' the dynamics of jasmonate-induced defenses in plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 100, 127-130.
- Rabasse, J. M. and Van, M. J. S. (1999). Biological Control of Aphids. In: Integrated Pest and Disease Manegement in Greenhouse Crops, 16, 235-243.
- Rattan, R. S. and Sharma, A. (2011). Plant secondary metabolites in the sustainable diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) management. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, 1 (3), 295-309.
- Rencuzoğulları, E. and Topaktaş, M. (2000). Chromosomal aberrations in cultured human lymphocytes treated with the mixtures of carbosulfan, ethyl carbamate and ethyl methanesulfonate. *Cytologia*, 65, 83-92.
- Rice, E. L. (1984). Allelopathy. *Academic Press*, New York.

- Rick, A. and Relyea, R. A. (2005). The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications*, 15 (2), 618-627.
- Rietveld, W. J. (1983). Allelopathic effect of juglone on germination and growth of several herbaceous and woody species. *Journal of Chemical Ecology*, 9, 2.
- Saling, S. C., Comar, J. F., Mito, M. S., Peralta, R. M. and Bracht, A. (2011). Actions of juglone on energy metabolism in the rat liver. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 257, 319-327.
- Sankarapandi, S. and Zweier, J. L. (1999). Evidence against the Generation of Free Hydroxyl Radicals from the Interaction of Copper, Zinc-Superoxide Dismutase and Hydrogen Peroxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (49), 34576-34583.
- Scheline, R. R. (1978). Mammalian metabolism of plant xenobiotics. *Academic Press*, New York.
- Selçukoğlu, E. (1999). Çukurova Bölgesi'nde toplanan bal örneklerinden amitraz ve fulvalinate kalıntılarının belirlenmesi. *Doktora tezi*, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Senthil-Nathan, S. (2013). Physiological and biochemical effect of neem and other meliaceae plants secondary metabolites against lepidopteran insects. *Frontiers in Physiology*, 4, 1-17.
- Siddique, H. R., Chowdhuri, D. K., Saxena, D. K. and Dhawan. A. (2005). Validation of *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for genotoxicity assessment using modified alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 20 (4), 285-290.
- Simkó, M., Kriehuber, R., Weiss, D. G. and Luben, R. A. (1998). Effects of 50 Hz EMF exposure on micronucleus formation and apoptosis in transformed and non transformed human cell lines. *Bioelectromagnetics*, 19, 85-91.
- Simmonds, M. S. J., Manlove, J. D., Blaney, W. M. and Khambay, B. P. S. (2002). Effects of selected botanical insecticides on the behaviour and mortality of the

- glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* and the parasitoid *Encarsia formosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 102, 39-47.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. and Schneider, E. L. (1988). A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-191.
- Siu, W. H. L., Caob, J., Jack, R. W., Wu, R. S.S., Richardson, B. J., Xud, L. and Lama, P. K. S. (2004a). Application of the comet and micronucleus assays to the detection of genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). *Aquatic Toxicology*, 66, 381-392.
- Siu, W. H., Mak, E., Cao, J., De Luca-Abbott, S. B., Richardson, B. J. and Lam, P. K. (2004b). Micronucleus induction in gill cells of green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons and chlorinated pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 1317-1325.
- Sorokin, N. and Whitaker, J. (2008). The impacts of selected natural plant chemicals on terrestrial invertebrates. Chapter 12, Secondary Metabolites in Soil Ecology, Editör: Karlovsky, P., Berlin, Springer.
- Sugie, S. (1998). Inhibitory effects of plumbagin and juglone on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. *Cancer Letters*, 127, 177-183.
- Sun, M., Wang, Y., Song, Z. and Fang, G. (2007). Insecticidal activities and active components of the alcohol extract from green peel of *Juglans mandshurica*. *Journal of Forestry Research*, 18, 62-64.
- Sun, Y., Oberley, L. W. and Li, Y. (1988). A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase. *Clinical Chemistry*, 34 (3), 497-500.
- Szatkowska, B., Kwiatkowska, M., Michałowicz, J., Sicińska, P., Huras, B. and Bukowska, B. (2012). Impact of chlorfenvinphos, an organophosphate insecticide on human blood mononuclear cells (in vitro). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102 (2), 175-181.
- Şekeroğlu-Atlı, Z. ve Şekeroğlu, V. (2011). Genetik Toksisite Testleri. Ordu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 4 (3), 221-229.

- Şeref-Gün, S., Çinbilgel, İ., Öz, E. ve Çetin, H. (2011). Bazı *Salvia* L. (Labiatae) bitki ekstraktlarının, sivrisinek *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae)'e karşı larva öldürücü aktivitesi. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 17 (Suppl A), 61-65.
- T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 2013-2017 Stratejik Plan. <http://www.tarim.gov.tr/Sayfalar/Detay.aspx?OgeId=4&Liste=KutuMenu>, Son erişim tarihi: 30 Ekim 2017.
- Tan, S., Sagara, Y., Liu, Y., Maher, P. and Schubert, D. (1998). The Regulation of Reactive Oxygen Species Production during Programmed Cell Death. *The Journal of Cell Biology*, 141, 1423-1432.
- Tekcan, M. (2009). Oksidatif Stres-Antioksidan Sistemler ve Testis. Derleme, Infertilite, *Androloji Bülteni*, 37, 131-136.
- Thiboldeaux, R. L., Lindroth, R. L. and Tracy, J. W. (1994). Differential toxicity of juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) and related naphthoquinones to Saturniid moths. *Journal of Chemical Ecology*, 20, 1631-1641.
- Thiboldeaux, R. L., Lindroth, R. L. and Tracy, J. W. (1998). Effects of juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) on midgut morphology and glutathione status in Saturniid moth larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 120, 481-487.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C. and Sasaki, Y. F. (2000). Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206-221.
- Timbrell, J. (1991). *Principles of Biochemical Toxicology*, In London ed., Taylor and Francis; 73-124.
- Tinaz, A., Sevimli, L. S., Görgül, G. and Türköz, E. G. (2002). The Effects of Sodium Hypochloride Concentrations on the Accuracy of an Apex Locating Device. *Journal of Endodontics*, 28 (3), 160-162.
- Topçu, Ş. ve Çölgeçen, H. (2015). Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoreaktörlerde Üretilmesi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8 (2), 09-29.

- Tosun, N., Karabay, N. U. and Sayım, F. (2001). Pesticide usage and their potential adverse impact of living organisms. *Anadolu J AARI*, 11, 113-125.
- Tulaganov, S. (1995). Değişik besinlerin *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae)'nın gelişme ve morfolojisine etkisi üzerine gözlemler. *Yüksek Lisans Tezi*, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Tülüçe, Y. (2005). Bazı Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Subakut ve Subkronik Uygulamalarının Ratların Eritrosit ve Çeşitli Dokularındaki Antioksidan Enzim Aktiviteleri, Glutasyon Ve Lipid Peroksidasyon Seviyeleri Üzerine Etkileri. *Doktora Tezi*, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Van.
- Türkez, H., İncekara, Ü. and Erman, O. (2010). Biomonitoring of the genotoxic potentials of two edible insects species in vitro. *Türk Entomoloji Dergisi*, 34 (4), 411-417.
- Uçkan, F. and Sak, O. (2010). Cytotoxic Effect of Cypermethrin on *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) Larval Hemocytes. *Ekoloji*, 19, 75, 20-26.
- Uğurlu, S. (2000). Zirai mücadele ilaçlarının insan ve çevreye etkileri. Ankara Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Sunumlar, Ankara.
- Ujvary, I. (2001). Pest Control Agents from Natural Products. In handbook of pesticide toxicology. *Academic Press*, 23, 109-179.
- Urso, M. L. and Clarkson, P. M. (2003). Oxidative Stress, Exercise and Antioxidant Supplementation. *Toxicology*, 189 (1-2), 41-54.
- Ündeğer, Ü. and Başaran, N. (2005). Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. *Archives of Toxicology*, 79, 169-176.
- Van-Goethem, F., Lison, D. and Kirsh-Volders, M. (1997). Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt- tungsten carbide. *Mutation Research*, 392, 31.

- Van-Ommen, B., Ploemen, J. H. T. M., Bogaards, J. J. P., Monks, T. J., Lau, S. S. and Van-Bladeren, P. J. (1991). Irreversible inhibition of rat glutathione S-transferase 1-1 by quinones and their glutathione conjugates. *Biochemical Journal*, 276, 661-666.
- Venier, P., Maron, S. and Canova, S. (1997). Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzowaxpyrene. *Mutation Research*, 390, 33-44.
- Vural, N. (2005). Toksikoloji. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, Ankara, 115-129.
- Wadleigh, R. W. and Yu, S. J. (1988). Detoxification of isothiocyanate allelochemicals by glutathione transferase in three lepidoptera species. *Journal of Chemical Ecology*, 14, 1279-1288.
- Wessel, N., Rousseau, S., Caisey, X., Quiniou, F. and Akcha, F. (2007). Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17 α -ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquatic Toxicology*, 30, 133-142.
- Wheeler, G. S., Slansky, F. and Yu, S. J. (1993). Fall armyworm sensitivity to flavone: Limited role of constitutive and induced detoxifying enzyme activity. *Journal of Chemical Ecology*, 19, 645.
- Woźnicki, P., Lewandowska, R., Brzuzan, P., Ziomek, E. and Bardega, R. (2004). The level of DNA damage and the frequency of micronuclei in haemolymph of freshwater mussels *Anodonta woodiana* exposed to. *Acta Toxicologica*, 12 (1), 41-45.
- Yagi, K. (1998). Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods in Molecular Biology*, 108, 101-106.
- Yeh, S. P., Sung, G. T., Chang, C. C., Cheng, W. and Kuo, M. N. (2005). Effects of an organophosphorus insecticide, trichlorfon, on hematological parameters of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture*, 243, 383-392.

- Yılayaz, Ö. (2008). Chlorpyrifos Ethyl (Pestisit; İnsektisit)'in *Barbus rajanorum mystaseus* (Heckel,1843) Üzerindeki Genotoksik Etkilerinin Eritrosit Mikronukleus Testi İle Belirlenmesi. Fırat Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Eğitimi Anabilim Dalı, Elazığ.
- Yıldızdaş, H. Y. (2003). Hipoksik İskemik Beyin Hasarı Oluşturulan ve Growth Hormon Uygulanan Yenidoğan Ratlarda Beyin Dokusunda Piruvat Kinaz Aktivitesi, Antioksidan Sistem ve Lipit Peroksidasyonu. *Yan Dal Uzmanlık Tezi*, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Neonatoloji Bilim Dalı, Adana.
- Yiğit, D., Yiğit, N., Aktaş, E. and Özgen, U. (2009). Ceviz (*Juglans regia* L.)'in antimikrobiyal aktivitesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 39 (1-2), 7-11.
- Yu, S. J. (1982). Host plant induction of glutathione-S-transferase in the faal armyworm. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 18, 101-106.
- Yu, S. J. (1987). Quinone reductase of phytophagous insects and its induction by allelochemicals. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 87B, 621-624.
- Yu, S. J. and Abo-Elghar, G. E. (2000). Allelochemicals as Inhibitors of Glutathione S-Transferases in the Fall Armyworm. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 68, 173-183.
- Yu, S. J. and Huang, S. W. (2000). Purification and characterization of glutathione S-transferases from the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 67, 36.
- Zang, Y., Zhong, Y., Luo, Y. and Kong, Z. M. (2000). Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*, 108 (2), 271-278.
- Zeiger, E. (2004). History and rationale of genetic toxicology testing: an impersonal, and sometimes personal. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44, 363-71.
- Zenkov, N. K., Lankin, V. Z. and Men'shchikova, E. B. (2001). Oxidation Stress: Biochemical and Patophysiological Aspects. State Publishing House of Biochemistry and Biology Literature, Moscow, Russia, 1-343.

- Zhai, M., Li, X., Lin, Q., vd. (2003a). Extract of Inhibiting Composition and Inhibitory Activity from Walnut Leaves. *Journal of Northwest Forestry University*, 18 (4), 89-91.
- Zhai, M., Yang, X., Lin, Q., vd. (2003b). A Study on the Bioactivity of Walnut Leaves Against *Stilpnotia candida*. *Journal of Northwest Forestry University*, 18 (2), 65-67.