

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**İPEKBÖCEĞİ *BOMBYX MORI*'NİN BEŞİNCİ İNSTAR
LARVAL DÖNEMDE FENOKSİKARBİN
NÖROSEKRESYON HÜCRELERİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

Ebru TANRIVERDİO

TEZ DANIŞMANI: Yrd.Doç.Dr. Hatice KARAKİŞİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi; 08.03.2017

BORNOVA-İZMİR

2017

Ebru TANRIVERDİÖ tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “İpek böceği *Bombyx mori*’nin beşinci instar larval dönemde fenoksikarbın nörosekresyon hücreleri üzerine etkisi” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

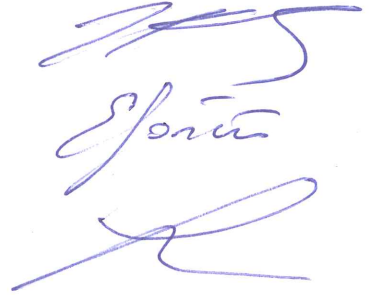
Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Yrd.Doç.Dr. Hatice KARAKİŞİ

Raportör Üye : Doç. Dr. N.Ebru GÖNCÜ

Üye : Doç. Dr. Selma KATALAY



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “İpek böceği *Bombyx mori*’nin beşinci instar larval dönemde fenoksikarbın nörosekresyon hücreleri üzerine etkisi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlamasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin çıkması sonucunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

08 / 03 /2017

İmza



Adı-Soyadı

EBRU TANRIVERDİO

ÖZET

İPEK BÖCEĞİ *BOMBYX MORI*'NİN BEŞİNCİ İNSTAR LARVAL DÖNEMDE FENOXYCARB'IN NÖROSEKRESYON HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

TANRIVERDİO, Ebru

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Yrd.Doç.Dr.Hatice KARAKIŞI

Mart , 2017, 41 sayfa

Böceklerde beyin endokrin sistemin önemli bir bileşeni olup, büyüme ve gelişmenin düzenlenmesinde merkezi role sahip bir salgı organıdır. Böceklerde beyin (serebral ganglion) iki lobdan oluşmakta ve baş bölgesinde özofagusun üzerinde yer almaktadır. Hormonal sistemin önemli düzenleyicilerinden olan nörosekresyon hücreleri beyin lateral ve median konumlarında bulunurlar. Hormon sisteminin en üst düzenleyicisi olan bu hücreler salgı meydana getirirler.

Bu çalışmada ipekböceği *Bombyx mori*'nin beşinci instar larvasında fenoksikarbın nörosekresyon hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bir juvenil hormon analogu olan fenoksikarb böcek zararlıları ile mücadelede kullanılan bir kimyasaldır. Disseksiyonla çıkarılan beyinler hemotoksilen&eosin ve paraldehit fuksin (PAF) ile boyanarak histolojik olarak incelenmiştir. Boyamalar sonucunda üç tip nörosekresyon hücresi tesbit edilmiştir. Bunlar ; NSH-1, NSH-2 ve NSH-3 'tür. Hem farklı günlerdeki hücreler arasında hem de uygulama ve kontrol grublarının hücreleri arasında salgı farklılıkları olduğu tesbit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Bombyx mori*, fenoxycarb, ipekböceği, nörosekresyon hücreleri



ABSTRACT**THE EFFECT OF FENOXYCARB ON NEUROSECRETION CELLS
OF SILKWORM *BOMBYX MORI* DURING 5. INSTAR
LARVAL PERIOD**

TANRIVERDİO, Ebru

MSc in Biology

Supervisor: Assoc.Prof.Dr.Hatice KARAKİŞİ

March 2017, 41 pages

The insect brain is a secretory organ with a central role in the regulation of growth and development. Brain in insects (cerebral ganglion) is composed of two lobes and exists on the esophagus in head. Neurosecretin cells have in the lateral and median regions of brain. These cells, which are the top regulatory centers of the hormone system consist secretion.

In this study, we investigated effect of fenoxycarb on neurosecretion cells of silkworm *Bombyx mori* during 5. instar larval period. A juvenile hormone analog fenoxycarb is used for many different control of insect pests. Brains removed with dissection, stained with hemotoxylen&eosine and paraldehyde fuchsine (PAF) for histological examination. As a result of stains three types of cells were detected. They are NSH-1, NSH-2 and NSH-3. Both the cells on different days and the cells of the administration and control groups were found to have secretory differences.

Keywords: *Bombyx mori*, fenoxycarb, neurosecretion cells, silkworm

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince destek, bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen danışmanım, Sayın Hocam Yrd. Doç. Dr. Hatice KARAKİŞİ'ye teşekkürlerimi sunarım. Tezimin her aşamasında fikirlerini ve desteklerini yanımda hissettiğim değerli hocalarım Doç. Dr. Ebru GÖNCÜ'ye, Yrd. Doç. Dr. Gamze TURGAY İZZETOĞLU'na, Öğr. Gör. Dr. Deniz ENGİN'e ve fotoğraf çekimlerinde sitogenetik laboratuvarının tüm imkanlarından faydalanmamızı sağlayan, hoşgörüsünü eksik etmeyen Doç. Dr. Nurşen ALPAGUT KESKİN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca tezimin her aşamasında yanımda olan manevi desteğini benden esirgemeyen, her daim beni motive eden hayatımda olmasından mutluluk duyduğum Sedat YELKOVAN'a teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatımda olduğu gibi yüksek lisans eğitimim boyunca da maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen, her zaman beni cesaretlendiren başta ablam Saniye TANRIVERDİ O olmak üzere aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Şuan hayatta olmayan ama her daim benimle yaşayan, yaşadığı süreçte hoşgörüsünü, sevgisini ve ilgisini benden hiç eksik etmeyen, üzerimde sonsuz emeği olan annem Safiye TANRIVERDİ O'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
1.GİRİŞ.....	1
2.MATERYAL METOD	12
2.1 Deney Hayvanlarının Yetiştirilmesi.....	12
2.1.1 Kültür Odasının Hazırlanması	12
2.1.2 Yetiştirme Koşulları.....	12
2.2 Deneyde Kullanılan Juvenil Hormon Analogu.....	12
2.3 Fenoxycarbın Uygulanması	13
2.4 Histolojik İnceleme	13
3.BULGULAR.....	17
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	34
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	37

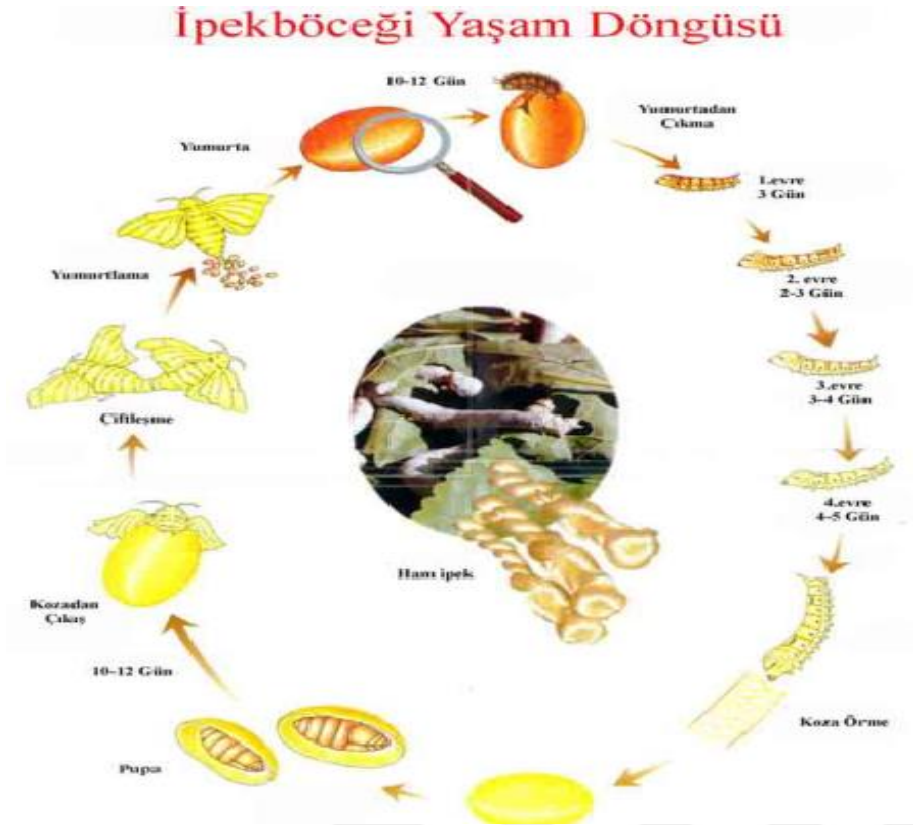
ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
1.1.İpekböceğinin Yaşam Döngüsü	2
1.2.İpekböceğinde Endokrin Sistem	3
1.3.Nörosekresyon hücre ve nörohemal organdan oluşan şematik görünüm	6
1.4.Beyin Nörosekresyon Hücrelerinin Temel Dağılımı	7
1.5. İpekböceği Beyinde Nörosekresyon Hücrelerinin Konumu ve Çeşitleri	8
1.6. Böceklerde JH'nun Moleküler Yapısı.....	9
1.7. Fenoksikarbın Kimyasal Yapısı	10
3.1. 5.instar 1.gün İpekböceği Larvasında Beynin Total Görünümü.....	17
3.2. 5.instar 6.gün İpekböceği Larvasında Beyninin Genel Görünümü.....	18
3.3. 5. instar 3.Günde PAF Boyama ile PIC Bölgesindeki Hücre Tipleri.....	18
3.4. 5.instar 0.Gündeki nsh'ları.....	19
3.5. 5 instar 1.gündeki nsh'lar.....	20
3.6. 5.instar 2.gündeki nsh'lar.....	21
3.7. 5.instar 3.gündeki nsh'lar.....	22
3.8. 5.instar 4.gündeki nsh'lar.....	23
3.9. 5.instar 5.gündeki nsh'lar.....	24
3.10. 5. instar 6.gündeki nsh'lar.....	25
3.11. Örme 1.gündeki nsh'lar.....	26
3.12. Örme 2.gündeki nsh'lar.....	27
3.13. Uygulama grubu örme 2.gündeki nsh'lar	28
3.14. Örme 3.gündeki nsh'lar.....	29
3.15. Uygulama grubu 3.gündeki nsh'lar.....	30
3.16. Örme 4.gündeki nsh'lar.....	31
3.17. Uygulama grubu örme 4.gün deki nsh'lar	32
3.18. Uygulama grubu örme 5.gündeki nsh'lar	33

1.GİRİŞ

Yaklaşık 5000 yıl önce insanlar ipekböceği larvalarının ipeğini keşfettiler ve ipek elde etmek için bu larvaları üretmeye başladılar (Knadan et al.,2014). İpek böceklerinin ürettikleri ipek, larval evreden ergin hale dönüşmek üzere kendisini hapsedtiği kozasından elde edilir. İpek M.Ö. 2600 yıllarında Çin’de kullanılmaya başlanmış ve Çinli prenseslerin evlilikleri yoluyla ülkelerinden ipekböceği yumurtalarını kaçırmaları sonucu tüm dünyada hızla yayılmıştır (Altun, 2007).

Holometabol böceklerden olup Lepidoptera takımına ait olan *Bombyx mori* ,larvalarının pupal ve ergin safhaları birbirinden tamamen farklı olup tam bir metamorfoz geçiren böceklerdir. Yaşamları boyunca çeşitli evrelerden oluşan bir hayat sürecine sahiptirler. İpekböcekleri, yumurta açılması ile başlayan larval evre, pupal evre ve ergin dönem ile sonlanan hayat süreçlerine sahiptirler (Parlak,2001), (Şekil 1.1). Her biri deri değişimi ile sonlanan beş larval evreleri vardır ve beşinci larval evrenin sonunda koza örerek pupal evreye geçerler.10-15 günlük pupal evreden sonra metamorfozlarını tamamlayarak ergin hale geçerler (Tufan et al.,2009). Hacimce büyük oluşu ve olumsuz çevre koşullarına, özellikle pestisitlere karşı son derece duyarlı oluşu nedeniyle çalışmalarda model organizma olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Xie et al., 2014).



Şekil 1.1. İpekböceğinin Yaşam Döngüsü (Soya,2013).

İpekböceklerinin sistematikteki yeri şu şekildedir (Parlak,2001):

Şube : Arthropoda

Alt şube : Uniramia

Sınıf : Insecta

Alt Sınıf : Pterygota

Üst Takım : Holometabola

Takım : Lepidoptera

Üst Familya : Bombycoidea

Familya : Bombycidae

Cins : *Bombyx*

Tür : *Bombyx mori*

Böceklerin gelişimi ve başkalaşımı başlıca birkaç hormonun denetimi altındadır. Bu hormonlar organizmanın çeşitli yerlerinden salgırlar (Yılmaz,1988). Böcekler klasik endokrin bezlere sahip olup, bunlardan salgılanan kimyasal haberciler, özelleşen dokulara hemolenf ile taşınarak dokulardaki

[illegible]

Böceklerde beyin başlıca endokrin sistem olup büyüme ve gelişmenin düzenlenmesinde merkezi role sahip bir salgı organıdır ve aynı zamanda davranış kontrolünün de merkezidir (Wang et al., 2015). Küçük sinyal molekülleri olan

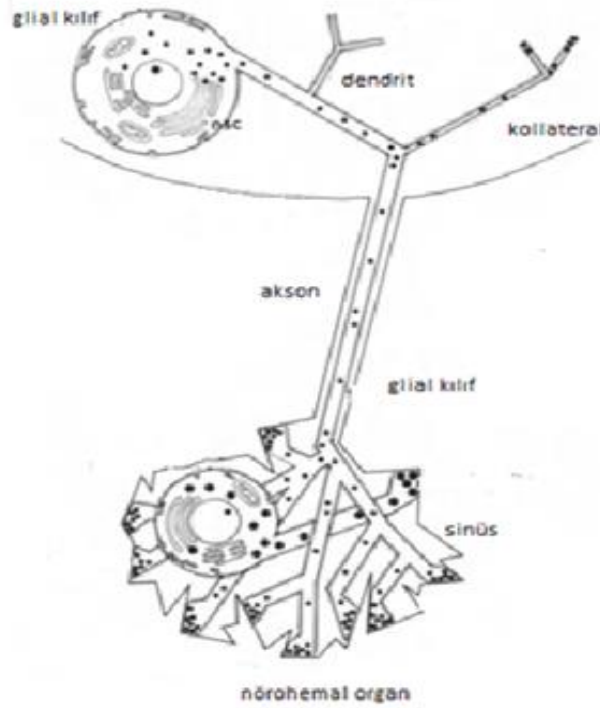
nörohormonlar beyinde sentezlenip, metamorfoz, beslenme, gelişim ve ekdisize neden olur (Uno et al., 2014).

Böceklerde merkezi sinir sistemi; serebral ganglion, subösofajial ganglion ve ventral sinir şeridinden meydana gelmektedir. Serebral ganglion (beyin) en büyük ganglionik yapı olup iki loptan oluşmaktadır (Tufan et al., 2009). Beyin subözofajial gangliona sirkumözofajial konnektifle bağlanmış olup, subözofajial ganglion torasik ve abdominal ganglionla birlikte ventral sinir şeridini oluşturmaktadır (Ichikawa,1991). Serebral ganglion (supraösofajial ganglion) temel olarak protoserebrum, deutocerebrum ve tritoserebrum olmak üzere 3 kısımdan meydana gelir (Treherne, 1974). Protocerebrum ön beyin olarak isimlendirilir ve merkezi sinir sisteminin en büyük nörosekresyon hücreleri bu kısımda bulunur (Karakışi, 2012). Protocerebrum bileşik gözler ve optik loblardan oluşur. Ayrıca mantar cisimciği (mushroom body) ve merkezi kompleks gibi ileri beyin merkezlerini barındıran multisensör alanlara da sahiptir. Deutocerebrum antennal lobları içerir ve böceklerin antenlerinden alınan bilgiyi yönlendirmekle görevlidir (Wessnitzer et al., 2006). Tritocerebrum ise beyin küçük bir parçası olup frontal ganglion ile labrum bağlantılı duyu ve motor sinirleri içerir (Chapman, 2013).

Böceklerde nörosekresyon hücrelerini ilk olarak DAY 1940'da bir Lepidoptera türü olan *Eacles imperialis fabricius*'un ventral sinir şeridinde bulmuştur (Şirip,1972). Nörosekresyon sistemi beyin ve ventral sinir kordunda birkaç nörosekresyon hücre (nsh)'nin kümeleşmesiyle oluşur. Nsh'lerin çoğunluğu dorso-medial protocerebrum, pars interserebralis (PIC) ve pars lateralis (PL)'de bulunurlar (Hartenstein, 2006). Nsh'ler böceklerde nöronların ve endokrin bezlerin fonksiyonel melezleri olarak isimlendirilir ve kan içine serbest bırakılan kimyasal habercileri üreten nöronlardan özelleşirler (Klowden, 2013). Nörosekresyon hücreleri beyin ganglionlarının lateral ve medial konumlarında bulunur. Nsh'lerin sitoplazmasındaki karakteristik kromofilik granüller sayesinde bu hücreler kolaylıkla saptanabilir (Ichikawa, 1991). Böceklerde nsh'ler hormon sisteminin en üst düzenleyici merkezidirler ve ektoderm hücrelerinin yeteneğini saklayan bu hücreler salgı meydana getirirler. Salgı, granüller ya da sıvı halinde oluşur, hücre gövdesi (perikaryon)'nde ve aksonlarda biriktirilir (Demirsoy, 1997). Bu salgı yani nörohormonlar perikaryonun endoplazmik retikulumunda

sentezlenerek golgi organellerine gönderilir ve nsh'lerin aksonlarına kadar taşınır. Nsh'lerin aktiviteleri nörohormonların sentezini , akson boyunca taşınımını, akson sonunda salınımını ve otofajik mekanizmaları içermektedir (Raabe, 1982). Nsh'ler tarafından üretilen bir hormon akson terminaline taşınarak elektriksel aksiyon potansiyelinin ortaya çıkması için hemolenf içine serbest bırakılır. Aksiyon potansiyeli aksondan akson terminali boyunca kalsiyum akımını ve hormonun eksositotik salgılanmasını tetikler. Çünkü nörosekresyon hücrelerinin elektriksel aktivitesi hormon salgılanmasıyla yakından ilişkilidir (Suenobu et al.,2004).

Böceklerde nsh'ler morfolojik açıdan diğer nöronlara benzemektedir. Böcek nörosekresyon hücreleri monopolar ya da multipolar tipte olabilirler, merkezi sinir sistemindeki nörosekresyon hücreleri monopolar tipte, perifer sinir sistemindeki nörosekresyon hücreleri ise multipolar tiptedir (Downer et al.,1984). Nsh'ler bir hücre gövdesinden (perikaryon), uzun bir aksondan ve hücre gövdesine yakın yerde bir ya da daha fazla kola ayrılan kollateral dallardan oluşmaktadır (Treherne,1974). Perikaryonun büyüklüğü ve nükleositol plazmik oranı değişkendir. Dendritler tüm böcek nöronlarında olduğu gibi aksonun proksimalinden kökenlenmiştir. Nsh'lerin aksonları genellikle çok uzundur ve distal uçlarından dallara ayrılır. Perikaryon, dendritler, kollateraller ve akson ince bir glial kılıf ile çevrilmiştir. Aksonlar genellikle nörohemal organlarda sonlanır, burada depolanan nörohormonlar hemolenf içine salınır ve uyarıya uygun cevap oluşur (Raabe,1982), (Şekil 1.3).

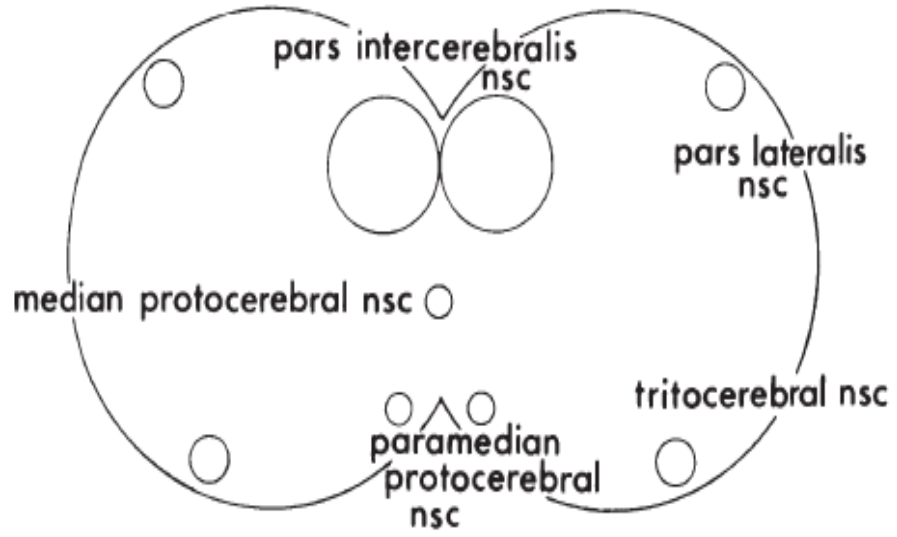


Şekil 1.3. Nörosekresyon Hücre ve Nörohemal Organdan Oluşan Şematik Görünüm (Raabe, 1982)

Böceklerde nörosekresyon hücreleri A, B, C ve D olmak üzere dört farklı tipte bulunmaktadır. Bu ayrım genellikle hücrenin büyüklüğüne, şekline veya boyalara karşı gösterdiği reaksiyonlara göre yapılmaktadır (Raabe, 1982).

Beyinde bulunan nörosekresyon hücreleri iki grup halinde bulunur. Birinci grup pars interserebralis bölgesinde, ikinci grup hücreleri ise beynin farklı bölgelerinde konumlanmıştır. Bu iki grup nörosekresyon hücreleri de birbirleriyle iletişim halindedir (Chapman, 2013).

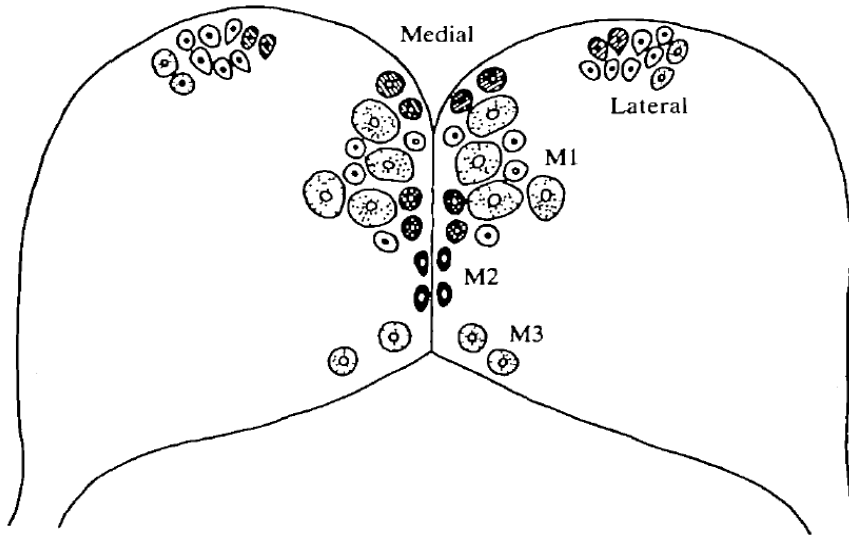
Ancak Raabe (1982) beyindeki nörosekresyon hücrelerinin median hatta, laterallerde, paramedian protoserebral bölgede ve tritoserebral bölgede bulunduğunu belirtmiştir (Şekil .4). PIC bölgesindeki nörosekresyon hücrelerinin aksonları beyni terk ederek nervus korpus kardiyakum internus (NCCI)'un ilk çiftini oluşturur. Diğer gruplardaki nörosekresyon hücrelerinin aksonları ise nervus korpus kardiyakum eksternus (NCCII)'u oluştururlar (Raabe, 1982).



Şekil 1.4. Beyin Nörosekresyon Hücrelerinin Temel Dağılımı (Raabe, 1982).

Mediandaki nörosekresyon hücreleri ipekböceği *Bombyx mori*'de erken larval safhadan pupa ve kelebek evresine kadar bütün gelişme evrelerinde görülür. Lateraldeki hücreler ise 5. larval safhadan kelebeğe kadar olan periyotta görülürler (Parlak, 2001).

Median bölgede M1, M2 ve M3 olmak üzere üç farklı hücre tipi bulunmaktadır. M1 nörosekresyon hücreleri diğer tiplere göre daha büyük olup 40-50 μm çapa sahiplerdir. Beynin bir lobunda dört adet olmak üzere toplamda sekiz adet bulunurlar. M2 hücreleri ikişer adet olup, 20-30 μm çapındadırlar. M3 tip hücreleri ise M2 hücrelerinden daha büyük olup, 30-35 μm çapa sahiplerdir. Her bir lobta bir ya da iki adet bulunurlar. Beynin lateral bölgelerinde ise bir kaç farklı hücre bulunmaktadır (Ichikawa,1991), (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. İpekböceği Beyinde Nörosekresyon Hücrelerinin Konumu ve Çeşitleri (Ichikawa,1991).

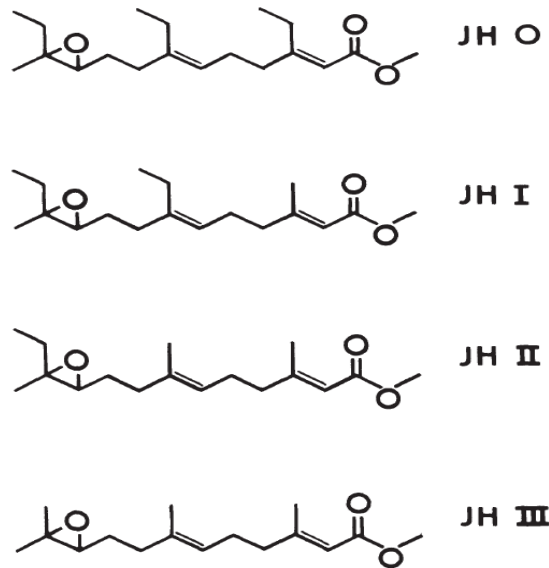
Beyindeki nsh'ler çeşitli nörohormonları salgılar. Bunlar; protorasikotropik hormon (PTTH), allotropik hormon (AH), eklozyon hormonu (EH), melanizasyon hormonu (MH)'dur. Beyindeki nsh'lerin dışında diyapoz hormonu (DH) subözofajial ganglionun ventralindeki nsh'lerden, adipokinetik hormon (AKH) korpus kardiyakum (CC)'dan, juvenil hormon (JH) ise korpus allatum (CA)'dan salgılanır (Shimizu et al.,1997 ve Akai, 1988). Bu nörohormonlardan PTTH beyindeki nörosekresyon hücrelerinden salgılanıp protorasik bezi uyararak deri değiştirme ve metamorfozu düzenleyen ekdizon hormonunun salgılanmasını başlatarak böcek gelişiminde anahtar rol oynayan önemli bir hormondur (Akai et al., 1990).

Böceklerde JH'nin varlığı ilk kez 1934 yılında Wigglesworth, *Rhodnius sp.*'de başkalaşmanın endokrin kontrolü üzerinde çalışırken bulmuştur (Kısmalı,1980). JH'nin böcek yaşamında önemli iki fonksiyonu; birçok böceğin ergininde yağ dokusu tarafından vitellojenin sentezlenmesini uyarması ve holometabol böceklerin son larval evrelerinde PTTH salınımını engellemesidir. PTTH'nin salınımının olmaması dolayısıyla deri değişiminin durması anlamına gelmektedir (Turgay İzzetoğlu et al.,2009). Bunların yanı sıra davranış, üreme, metamorfoz, diyapoz, stres direnci ve yaşlanma gibi süreçleri de düzenlemektedir (Pandey et al., 2015). Korpus allatumdaki (CA)'dan üretilen JH'nin biyosentezi

beyinde üretilen allatotropin (AT) ve allatostatin (AST) nöropeptidleri tarafından kontrol edilir (Meng et al.,2015). Bu nöropeptidler beyinde PIC ve PL'deki nörosekresyon hücreleri tarafından salgılanır ve bu hücrelerin aksonları boyunca CA'a iletilir. Allatotropinler uyarıcı etkiye sahipken allatostatinler inhibe edici etkiye sahiptir (Raabe, 1989).

JH hem peptid yapıda hem steroid yapıda olan bir hormondur. Hemolenfte JH bağlayıcı proteine bağlanarak taşınır. JH'nin bağlayıcı proteini juvenil hormonun yıkımına engel olur (Uranlı, 2008). JH'nin yıkımını sağlayan 3 enzim bulunmaktadır. Bunlar; JH estera (JHE), JH epoksid hidrolaz (JHEH) ve JH diol kinaz (JHDK)'dır (Zang, 2005).

JH'ler JH0, JHI, JHII, JHIII olmak üzere dört çeşittir. Sırasıyla 19, 18, 17 ve 16 karbona sahiptirler. Böceklerde en çok meydana gelen form JHIII'dür. Lepidopteralarda JHI ve JHII bulunmaktadır (Chapman, 2013), (Şekil 1.6).

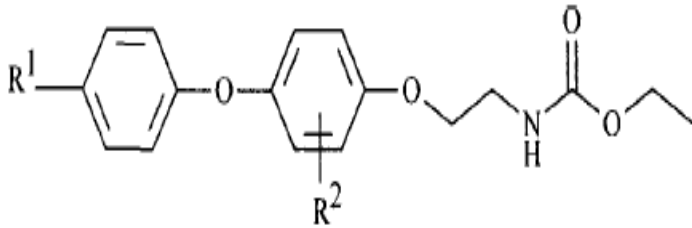


Şekil 1.6. Böceklerde JH'nin Moleküler Yapısı (Raabe, 1989)

Zararlı böceklerle mücadelede kullanılan böcek öldürücü ilaçların ekosistem ve yararlı organizmalar üzerindeki zararlı etkilerini azaltmak amacıyla günümüzde değişik yöntemler kullanılmaktadır. Böceklerin gelişmesinde gerekli hormonların dışarıdan uygulanması fikri ortaya atılarak bu yolda yapılan araştırmalar özellikle JH ve analogları (JHA) üzerinde yoğunlaştırılmıştır (Erkin

et al., 1988). *Bombyx mori*'de JHA'larla ilgili olarak ilk çalışma böcekler üzerinde topikal uygulamalarla başarılmıştır. Akai et al., (1985) sentetik hormon $C_{18}JH$ uygulandıktan sonra ipek oranında %30 artış olduğunu bildirmiştir. JHA'ların uygulama zamanı, oranı, uygulama metodu gibi birçok faktör fizyolojik etkilerde değişikliğe sebep olmuştur (Miranda et al., 2002). JHA'ları ile ilgili yapılan çalışmalarda özellikle kritik periyotlarda uygulandıklarında başkalaşımı engelleyerek yüksek bir morfojenetik etkiye sahip oldukları, spermatogenez ve oogenezi etkileyerek steril bireyler oluşturdukları, yumurtalarda embriyo gelişimini durdurdukları tespit edilmektedir (Koçak et al., 1997). JHA'ları sivrisinek, sinek, pire ve ateş karıncaları gibi çeşitli böcekler için kontrol maddeleri olarak kullanılır. Ayrıca ipek böceğinde ipek üretimini arttırmak için de kullanılmıştır. Hatta insan mikrobiyal patojenlerini bile kontrol edebileceğine dair raporlar vardır (Gilbert, 2012).

JHA'lardan olan fenoksikarb R Maag AG tarafından 1981'de keşfedilmiştir. Fenoksikarb böcek zararlılarının birçok farklı kontrolü için kullanılır (Sullivan, 2000). Fenoksikarb etilkarbamat (ethyl 2 -4 fenoksifenoksi) olan böcek büyüme regülatörüdür (Le et al.,2003), (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Fenoksikarb'ın Kimyasal Yapısı (Le et al.,2003)

Fenoksikarb, juvenil hormon aktivitesine sahip böcek büyüme düzenleyicidir ve karıncalar, pire, sivrisinek, kelebek ve üzüm, zeytin, pamuk, meyve gibi tarım zararlılarını kontrol etmek için kullanılır. Juvenil hormon analogları, juvenil hormon ile benzer etkiler gösterir, ancak JHA çok daha kararlı bileşiklerdir. Fenoksikarb, tarımsal zararlıları kontrol etmek için kullanılan ilk

jüvenil hormon analogudur. Çeşitli böcek türlerinin yumurtalarını ve larvalarını öldürür. İpekböceği, bu bileşime aşırı derecede duyarlıdır, özellikle son larva instarının ilk üç günü, örme inhibisyonuna ve gelişimi önlemeye neden olur (Göncü et al, 2011). Erken larval instarlarda JH ve JHA' nın uygulanması larval-pupal farklılaşmasının başlatılmasını inhibe eder ve larval evrenin uzamasına sebep olur (Uranlı, 2011).



2.MATERYAL VE METOD

2.1.Deney Hayvanlarının Yetiştirilmesi

Bu çalışmada ipekböceği (*Bombyx mori*) larvaları Koza Birlik'ten temin edilen Japon X Çin hibriti beyaz monovoltin ırk ipekböceği yumurtalarının 8-10 günlük bir inkübasyonun ardından ipekböceği kültür laboratuvarında beslenmeye alınması sonucu elde edilmiştir.

2.1.1. Kültür Odasının Hazırlanması

İpekböceği yetiştirme döneminde enfeksiyon riskini en aza indirmek nedeniyle yetiştirme sırasında kullanılacak tüm malzemeler önceden yıkanıp sterilize edilmiştir. Kültür odası ve kullanılacak malzemeler %3'lük formaldehit buharına maruz bırakılmıştır.

2.1.2. Yetiştirme Koşulları

Kozabirlik (Bursa) 'den getirilen ipekböceği (*Bombyx mori*) yumurtaları $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ısı ve %70-85 nemlilik ortamında inkübasyon odasına bırakılmışlardır.10-12 gün sonra yumurtadan çıkan larvalar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık fotoperiyot koşullarında beslenmeye alınmıştır. Larvalar sabah, öğlen, akşam olmak üzere günde üç kez aynı saatlerde taze dut yapraklarıyla beslenmiştir.

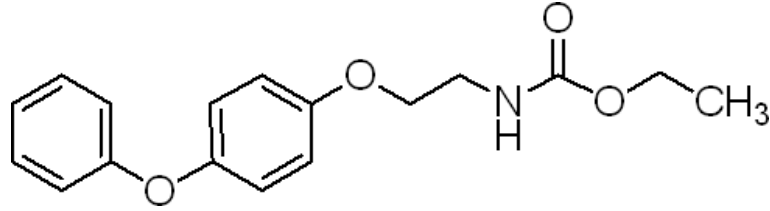
2.2. Deneyde Kullanılan Jüvenil Hormon Analogu

Deneylerde ticari olarak elde edilen jüvenil hormon analogu olan fenoksikarb (ethyl [2-(4-phenoxy- phenoxy)ethyl] carbamate (Riedel,31343) kullanılmıştır. Fenoksikarb ($\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_4$) ilk kez 1981 yılında keşfedilmiş ve 1987'de İngiltere Ürün Koruma Konseyi'nden R. Maag AG tarafından tanıtılmıştır. Fenoksikarb geniş spektrumlu bir böcek büyüme düzenleyicisidir. Karbamat yapısından dolayı anti-kolinesteraz aktivitesine sahip olmadığı için nörotoksik değildir. Geniş aralıkta tarım zararlılarının kontrolünde kullanılmaktadır. Deri değişimi ve üreme gibi fizyolojik işlemler üzerine jüvenil

hormonun etkilerini taklit etme yeteneğinden dolayı juvenil hormon analogu olarak isimlendirilir.

Fenoksikarb

Kimyasal formülü



Kimyasal adı:

Ethyl[2-(4-phenoxy-phenoxy)-ethyl]carbamate

2.3. Fenoksikarb'ın Uygulanması

Juvenil hormon analogu olan fenoksikarb 1ng / 10µl asetonda çözdürülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyonlar kullanılıncaya kadar - 20°C'de saklanmıştır. Fenoksikarb uygulanan günler ve miktar literatüre dayanılarak belirlenmiştir. Hayvanlar kontrol grubu ve uygulama grubu olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Uygulama grubundaki hayvanlara koza örme davranışının 1. gününde dorsal-median hattı boyunca 1ng fenoksikarb topikal olarak uygulanmıştır.

2.4. Histolojik İnceleme

Kontrol ve uygulama grubu olan ipekböceklerinin beyinlerindeki nörosekresyon hücreleri Zeis Axioscope marka ışık mikroskobu seviyesinde histolojik yapıların belirlenmesi amacıyla incelenmiştir. Histolojik olarak

incelenecek dokular Zenker fiksatifinde 4°C’ de 21 saat fikse edilip aşağıdaki basamaklar izlenmiştir:

1. Yıkama (akar su).....1s
2. %70 alkol.....10dk
3. %96 alkol.....10dk
4. %100 alkol.....10dk
5. %100 alkol + ksilol (1:1 oranında).....10dk
6. Ksilol.....10dk
7. Ksilol + parafin (1:1 oranında).....10dk
8. Parafin I.....1s
9. Parafin II.....10dk
10. Bloklama

Hazırlanan bloklardan 5µm kesitler alınarak su banyosunda lam üzerine alınmıştır. Lam üzerine alınan dokular etüvde 50-60 °C’de 1 saat bekletilmiştir. Boya aşamasına hazır hale gelen kesitler Gills Hematoksilen & Eosin ve Gabe Paraldehit Fuksin ile boyanmıştır. Kontrol gruplarının ve uygulama yapılan grupların kesitleri histolojik açıdan karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Kullanılan Boyalar

Hematoksilen & Eosin ile boyama

Gills Hematoksilen: 6 gr hematoksilen, 42 gr alüminyum sülfat, 1.4 gr sitrik asit ve 1.0 gr sodyum iodat 680 ml distile su içerisinde çözdürüldükten sonra etilen glikol eklenir.

Eosin: 1 gr eosin, 100 ml %70 alkol, 5 ml gl.a.asit.

Hematoksilen& Eosin Boyama Basamakları

1. Deparafinizasyon (ksilol I ve II).....2x15 dk
2. Hidrasyon10‘ar dk

3. Saf su ile yıkama1dk
4. Boyama I (Hematoksilen)15 dk
5. Akarsu ile yıkama (rengi mavi olana kadar)
6. Saf su ile yıkama..... 1dk
7. Boyama II (Eosin)..... 1 dk
8. Saf su ile yıkama
9. Dehidrasyon.....2x5 dk
10. Şeffaflaştırma (ksilol I ve II).....2x10 dk
11. Kapama

Paraldehit Fuksin ile boyama

Solüsyonlar

- a) **Natrium thiosülfat:** 1.5 gr natrium thiodülfat, 20ml %90-96'lık alkol, 180ml distile su içerisinde çözündürülür.
- b) **Potasyum permanganat:** 100ml distile suya 80ml %2.5'lik potasyum permanganat ve 20ml sülfürik asit ilave edilir.
- c) **Phosfomolyde-saure:** 2gr phosfomolyde saure, 8 gr phosfowolf from , 200 ml distile suda çözündürülür.
- d) **Fast green:** 0.64 gr fast green, 1.6 gr Orange G. , 0.32 gr chromotrop 2R, 160ml distile suda çözündürülür, 1.6 ml asetik asit ilave edilir.
- e) **Lügol:** %70 alkole 1-2 damla lugol damlatılır.
- f) **%2.5'lik oksalik asit:** 80 ml distile suda 2 gr oksalik asit çözündürülür.
- g) **Paraldehit Fuchsin Boyası:** 200 ml kaynamış distile suya 1 gr basic fuchsin konulup, 1 dk kaynatılır, soğutulup süzülür. Oda sıcaklığında 2 ml konsantre hidroklorik asit (HCl) ve 2 ml paraldehit eklenir. Oda sıcaklığında 3-4 gün tutulur. Daha sonra filtre edilerek, kurutma kağıdındaki süzüntü etüvde 37 °C' de kurumaya bırakılır. Elde edilen boyadan 0.5 gr alınıp 100 ml % 70 alkolde çözündürülerek stok solüsyon yapılır. Bu stok solüsyondan 25 ml alınır, 75 ml % 70 alkol ile karıştırılarak üzerine 1 ml asetik asit ilave edilir.

Paraldehit Fuchsin ile Boyama Basamakları

1. Deparafinizasyon (ksilol I ve II).....2x5 dk
2. Hidrasyon10'ar dk
3. Saf su ile yıkama
4. Lugol.....5 dk
5. Natrium thiosülfat.....5-10 dk
6. Akarsu ile yıkama.....5 dk
7. Saf su ile yıkama
8. Potasyum permanganat.....3 dk
9. Saf su ile yıkama
10. %2.5'lik oksalik asit.....10 dk
11. Boyama (PAF ile).....3 dk
12. %96 alkol +3-5 damla asetik asit3 dk
13. %96 alkol.....2x3 dk
14. %100 alkol + 0.2 ml hidroklorik asit.....3 dk
15. %90 alkol3 dk
16. %70 alkol3 dk
17. %50 alkol.....3 dk
18. Phosfomolyde saure.....10 dk
19. Saf su ile yıkama
20. Fast green.....15-20 sn
21. %96 alkol + %2'lik asetik asit ile yıkama
22. %96 alkol.....2 dk
23. %100 alkol.....2 dk
24. Şeffaflaştırma (ksilol I ve II).....2x5 dk
25. Kapama

3. BULGULAR

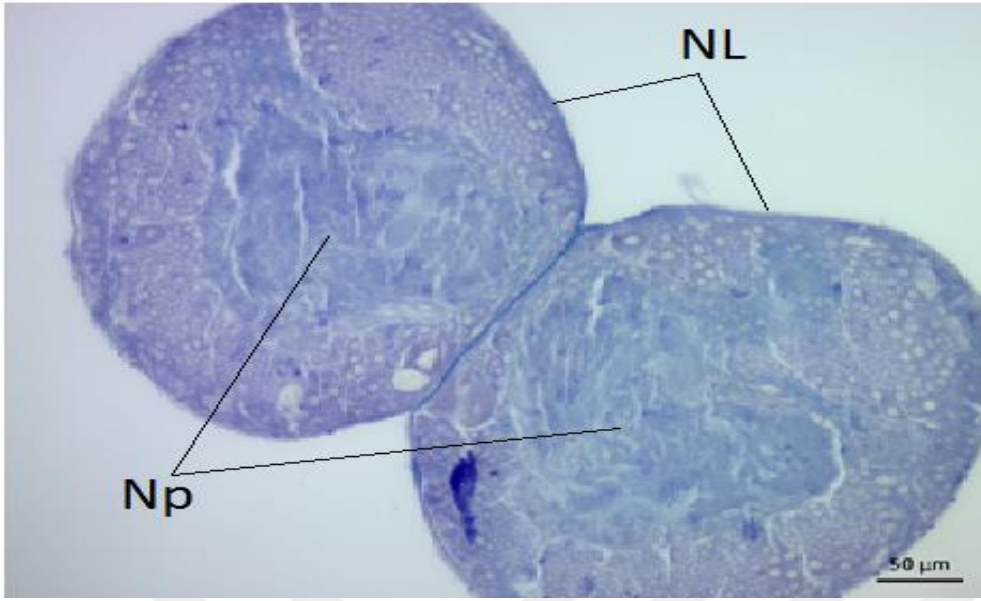
Çalışmamızda ipekböceği *Bombyx mori*'de 5. instar larval evrede fenoksikarbın nörosekresyon hücreleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Örmenin 1.günü 1ng/10 µl fenoksikarb uygulanmıştır. Kontrol grubunda 5. instarın 0. gününden larval-pupal deri değişimine kadar; uygulama grubunda ise koza örme aşamasının 2. gününden pupalaşmaya kadar olan tüm günlerdeki nörosekresyon hücreleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Beyin (serebral ganglion) iki lobdan oluşmaktadır. Nörosekresyon hücrelerinin kromofilik yapısından dolayı rahatlıkla ayırt edilebilmektedir. Beynin her iki lobu da sirkümözofajial konnektiflerle subözofajial , toraks ve abdominal ganglionlara bağlanmıştır (Şekil 3.1).



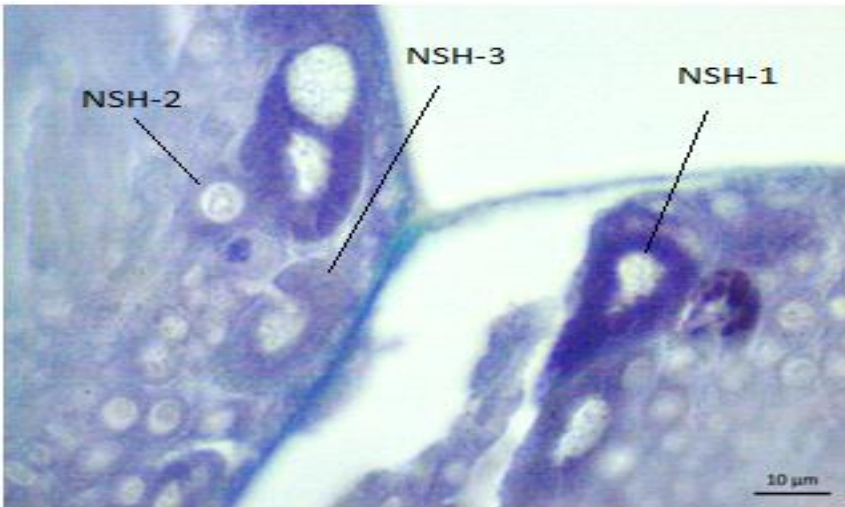
Şekil 3.1. 5.instar 1.Gün İpekböceği Larvasında Beynin Total Görünümü. SK-sirkümözofajial konnektif.

Beynin her iki lobu da neural lamella ile örtülü olduğu, lobların merkez kısmında ise neuropil olarak adlandırılan bölgenin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 3.2).



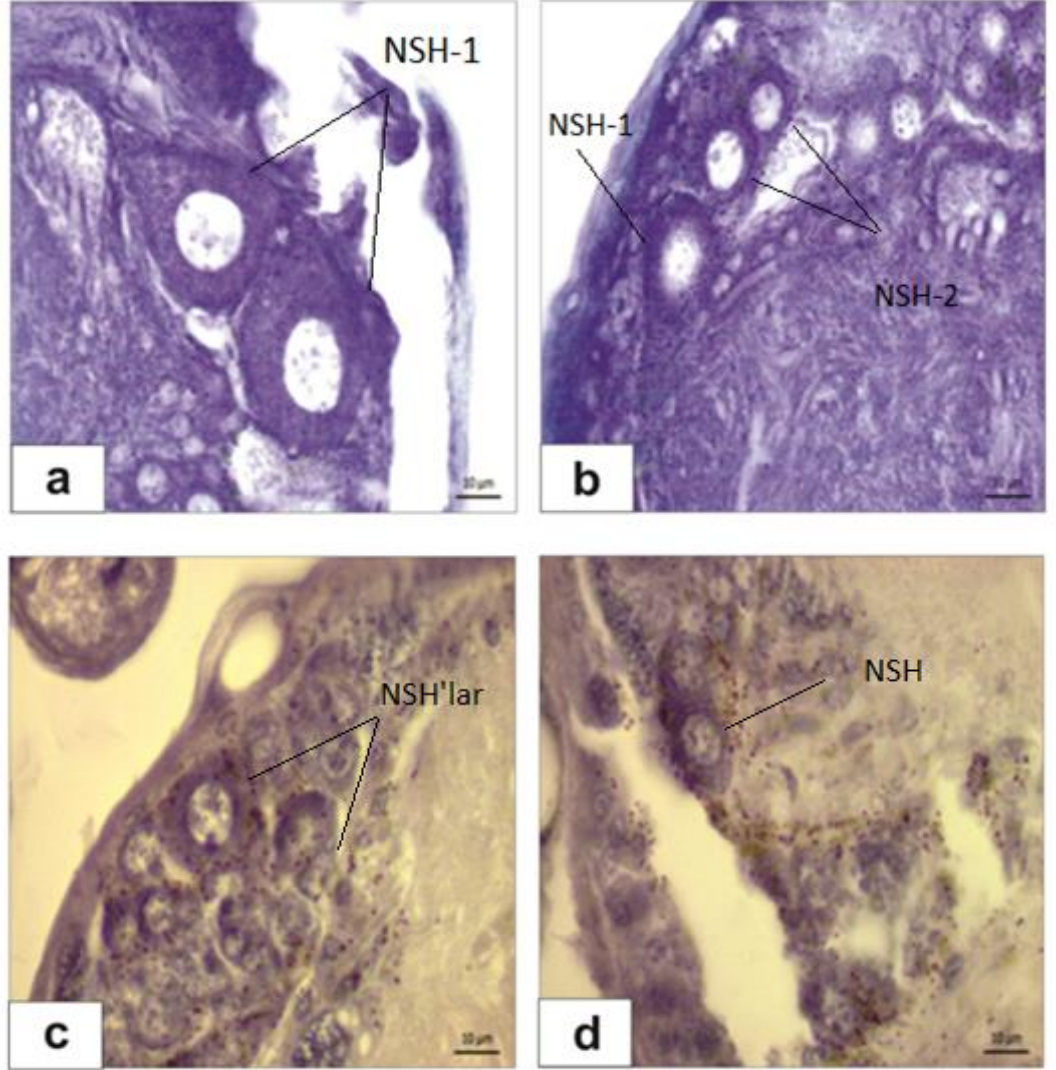
Şekil 3.2. 5.instar 6.Gün İpekböceği Larvasında Beynin Genel Görünümü. NL- neural lamella,Np- neuropil

Çalışmamızda beyin PIC bölgesinde 3 tip nörosekresyon hücresi tespit edilmiştir. NSH-1,armut şeklinde olup, sitoplazma içerisindeki salgı materyalinin bol olmasından dolayı daha koyu boyanan ve en büyük nörosekresyon hücre tipi olarak belirlenmiştir. NSH-2, yuvarlak yapıda, boyut olarak NSH-1'den daha küçük olan ve salgı materyali bakımından NSH-1 gibi zengin olan hücrelerdir. NSH-3 ise NSH-2'den büyük olan ve sitoplazma içerisindeki salgı materyalinin daha az yoğunlukta bulunan hücreler olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.3).



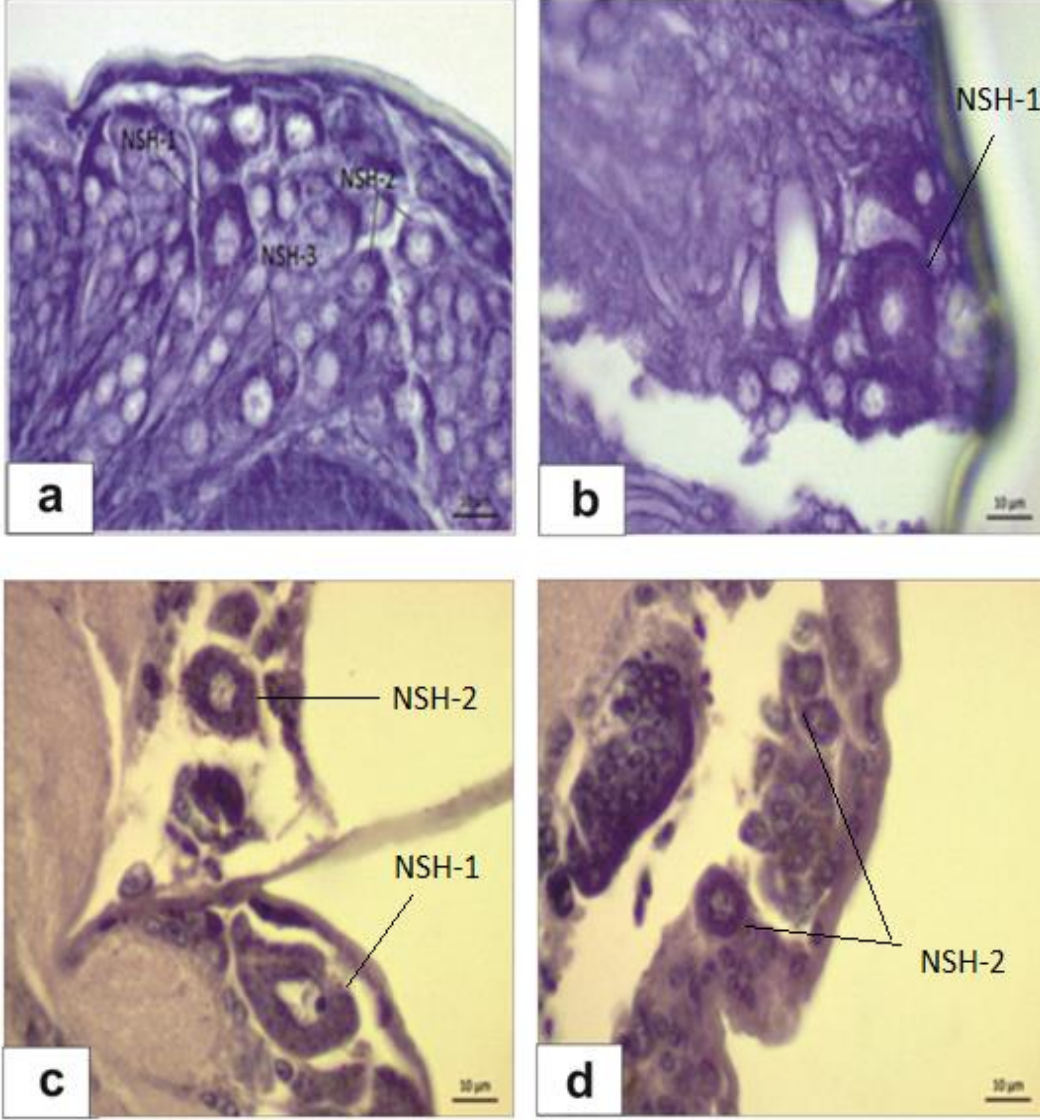
Şekil 3.3. 5. instar 3.Günde PAF Boyama ile PIC Bölgesindeki Hücre Tipleri.

5.instar 0.gününe ait larvaların PAF ve HEM&Eosin boyama ile her bir beyin lobunda pars laterallerde ikişer adet NSH-1 hücresi ve çok sayıda NSH-2 hücresi tespit edilmiştir. PIC, tritoserebral ve paramedin protoserebral bölgelerde de çok sayıda nörosekresyon hücresine rastlanılmıştır (Şekil 3.4).



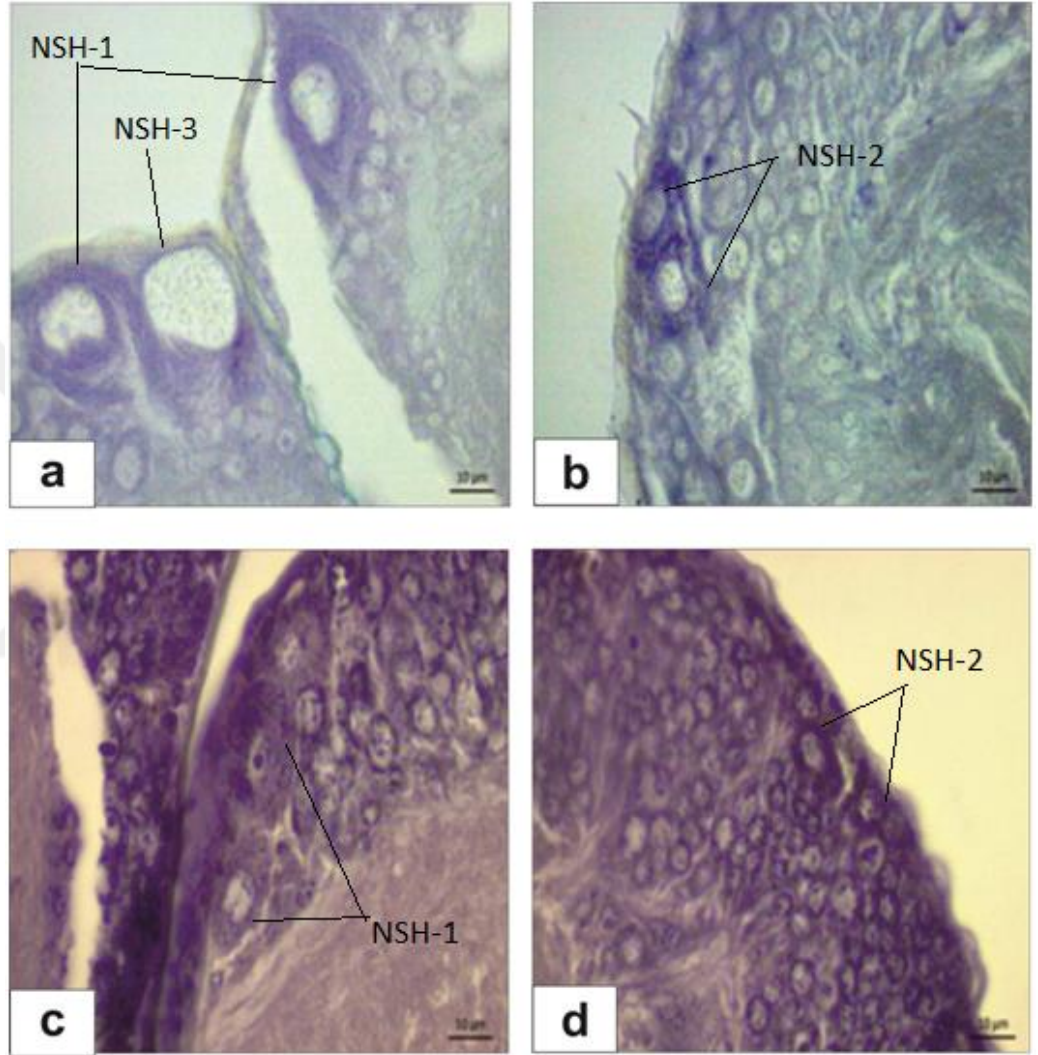
Şekil 3.4. 5.instar 0.Gündeki nsh'ler.. (a; PL'de NSH-1, b; PIC' deki NSH-1ve NSH-2 hücreleri, a ve b; PAF boyama ,c ve d; PL'de nsh'ler HEM&Eosin boyama).

5.instar 1.gündeki larvaların beyinlerinde PIC bölgesinde tip NSH-1, NSH-2 ve NSH-3 hücrelerinin varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca PL bölgesinde de tip NSH-1 ve NSH-2 hücrelerine rastlanmıştır (Şekil 3.5).



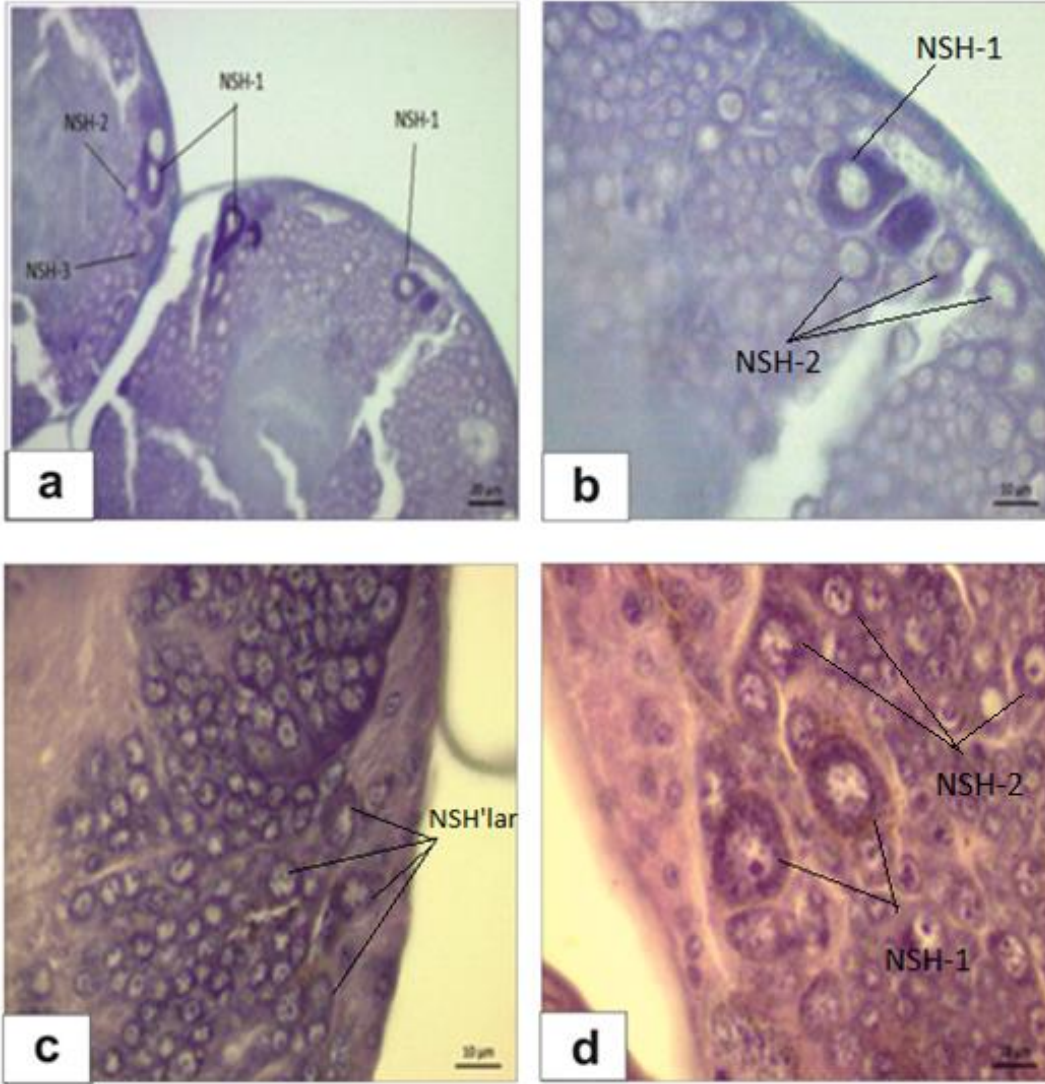
Şekil 3.5. 5 instar 1.Gündeki nsh'ler.(a; PIC bölgesindeki nsh'ler , b; PL bölgesindeki nsh'ler,c PIC bölgesindeki nsh'ler, d; PL bölgesindeki nsh'ler. a ve b PAF boyama c ve d HEM&Eosin boyama).

5.instar 2.gün ipekböceği larvasının beyinde PIC bölgesinde NSH-1 ve NSH-3 hücreleri tespit edilmiştir. PIC bölgesinde NSH-2 hücrelerine rastlanmazken PL’lerde NSH-2 hücrelerine rastlanmıştır (Şekil 3.6).



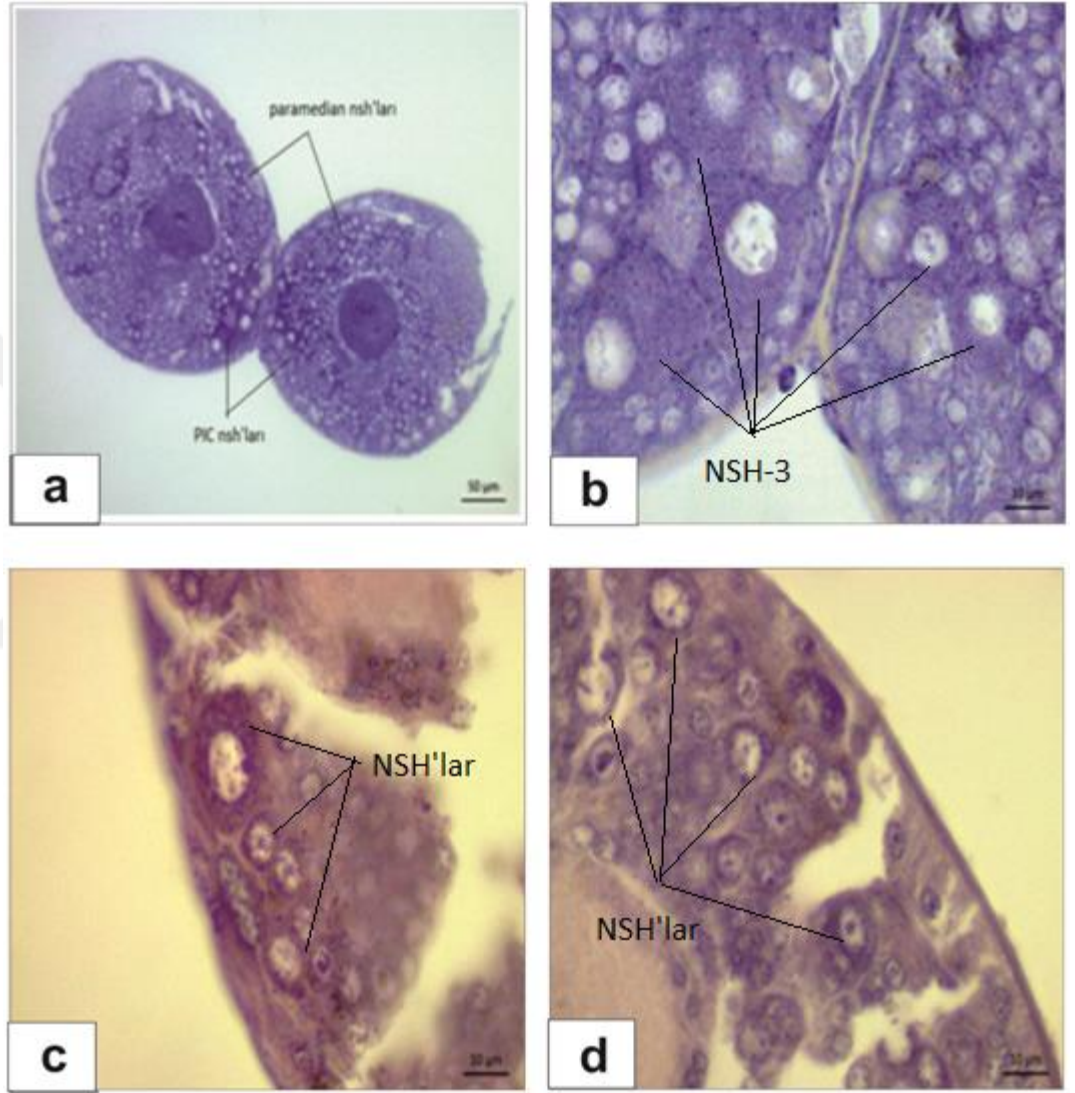
Şekil 3.6. 5.instar 2.Gündeki nsh’ler. (a;PIC bölgesindeki nsh’ler, b;PL bölgesindeki nsh’ler, c;PIC bölgesindeki nsh’ler, d;PL bölgesinde nsh’ler. a ve b PAF boyama, c ve d HEM&Eosin boyama).

5.instar 3.gün ipekböceği larvasının beyinde PIC bölgesinde NSH-1, NSH-2 ve NSH-3 hücrelerinin üçüne de rastlanmıştır. Laterallerde NSH-2 hücreleri bulunmaktadır. Ayrıca lateral bölgelerde 2.günden farklı olarak NSH-1 hücrelerine de rastlanmıştır. PTTH salgılayan hücreler de yoğun granülleriyle dikkat çekmektedir (Şekil 3.7).



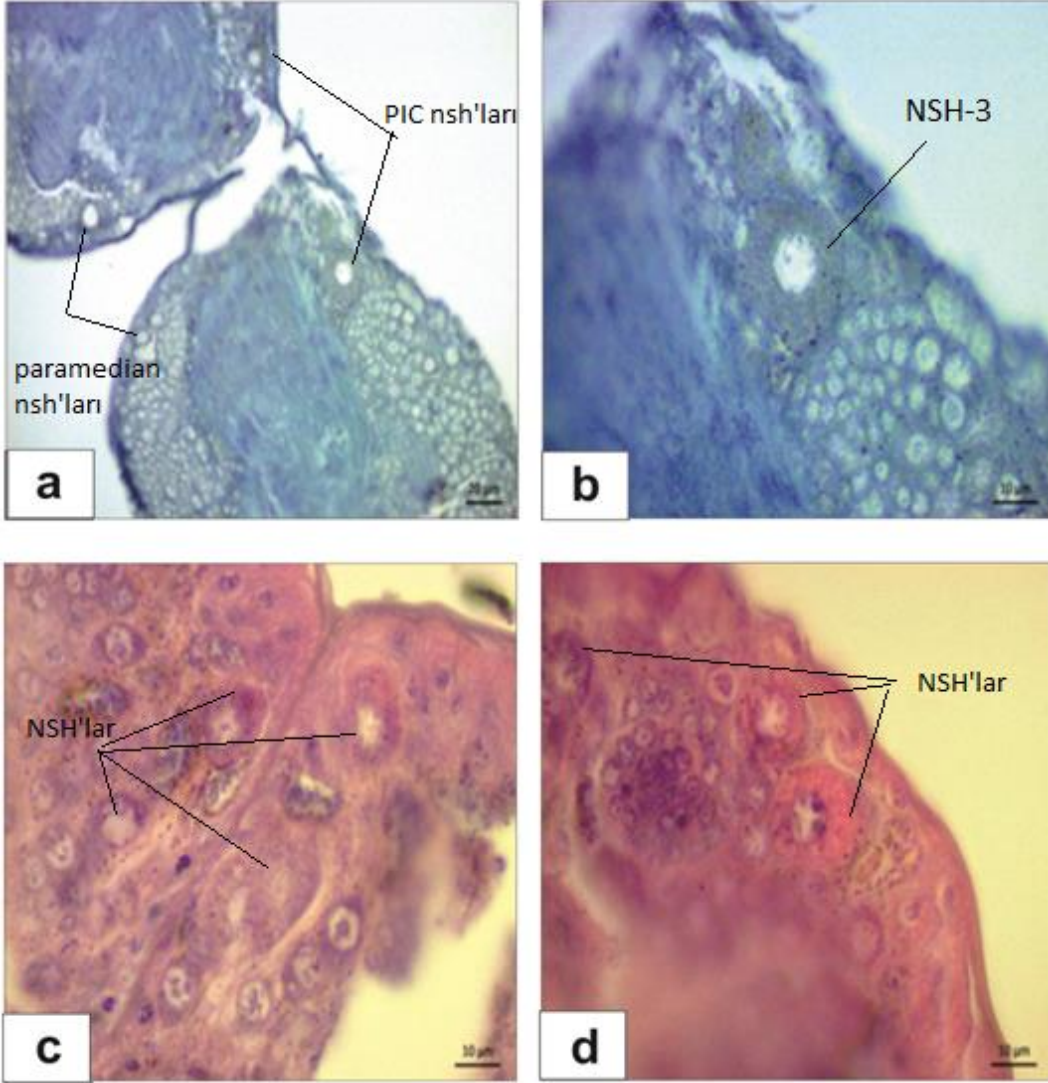
Şekil3.7. 5.instar 3.Gündeki nsh'ler.(a; median ve lateral bölgelerdeki hücrelerin genel görünümü, b; lateraldeki NSH-1 (PTTH salgılayan hücre) ve NSH-2 hücresi, c ve d; lateraldeki nsh'ler. a ve b ; PAF boyama, c ve d; HEM&Eosin boyama).

5.instar 4.güne ait ipekböceği larvalarının beyinlerinde PIC bölgesinde NSH-1 hücresi, dörder adet NSH-3 hücresi ve çok sayıda NSH-2 hücresi tespit edilmiştir. Laterallerde çok sayıda NSH-2 hücrelerine rastlanmıştır. Ayrıca 1.,2. ve 3.günlerden farklı olarak beyin paramedian protoserebral kısmında da nörosekresyon hücreleri görülmüştür (Şekil 3.8).



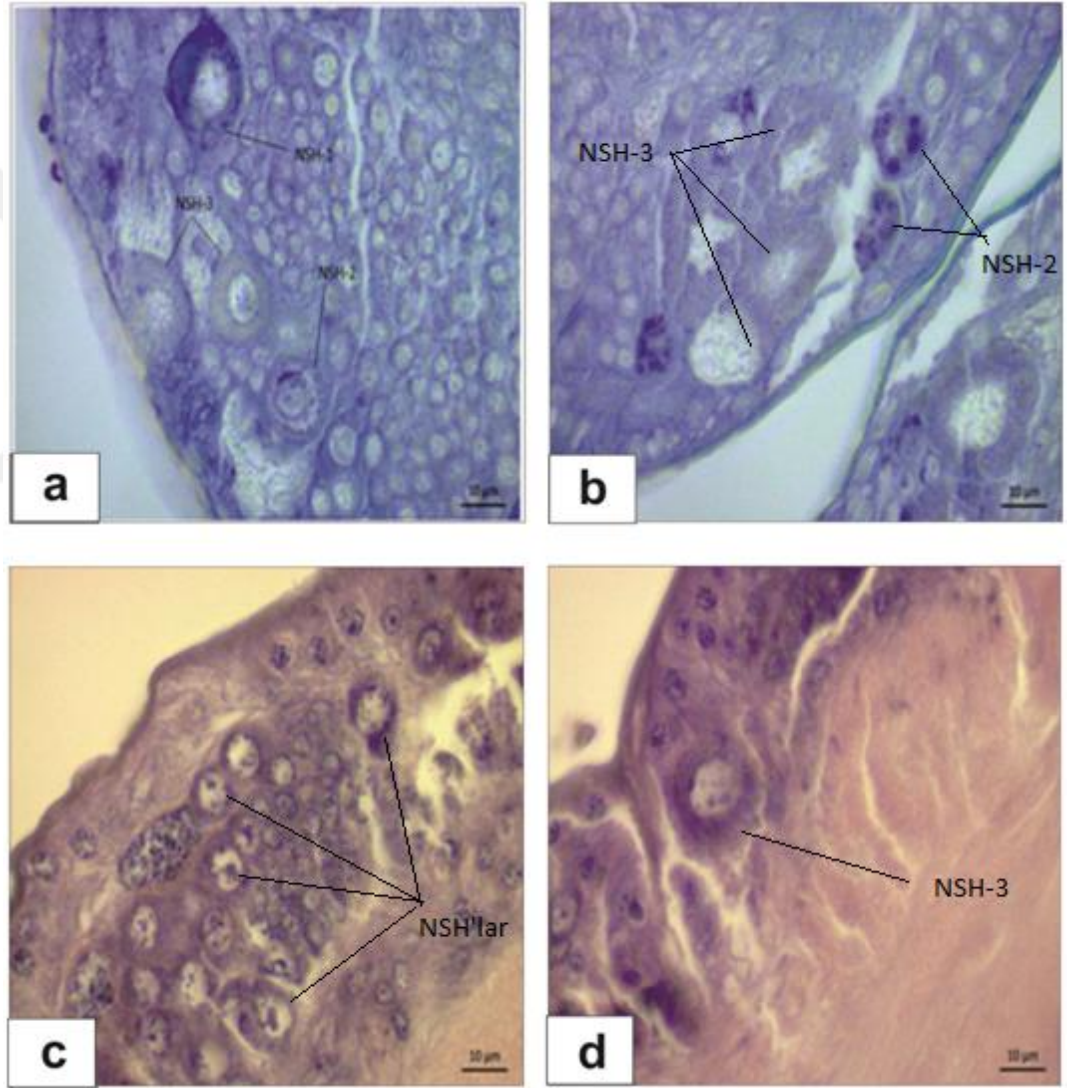
Şekil 3.8. 5.instar 4.Gündeki nsh'ler.(a; PIC ve paramedian bölgesindeki nsh'ler, b; PIC bölgesinde NSH-3 hücreleri, c ve d; lateral nsh'ler. a ve b; PAF boyama, c ve d; HEM&Eosin boyama).

5.instar 5.gün ipekböceği larvalarında PIC bölgesinde birer adet NSH-1, NSH-3 hücreleri ve birçok adet NSH-2 hücreleri tespit edilmiştir. Laterallerde de NSH-2 hücreleri bulunmaktadır. 4.günde olduğu gibi paramedian protoserebral bölgesinde de nörosekresyon hücreleri vardır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. 5.instar 5.Gündeki nsh'ler. (a ;PIC ve paramedian bölgesindeki NSH'ler, b; PIC bölgesindeki NSH-3 hücresi, c; PIC bölgesindeki nsh'ler, d; laterallerdeki nsh'ler. a ve b PAF boyama,c ve HEM&Eosin boyama).

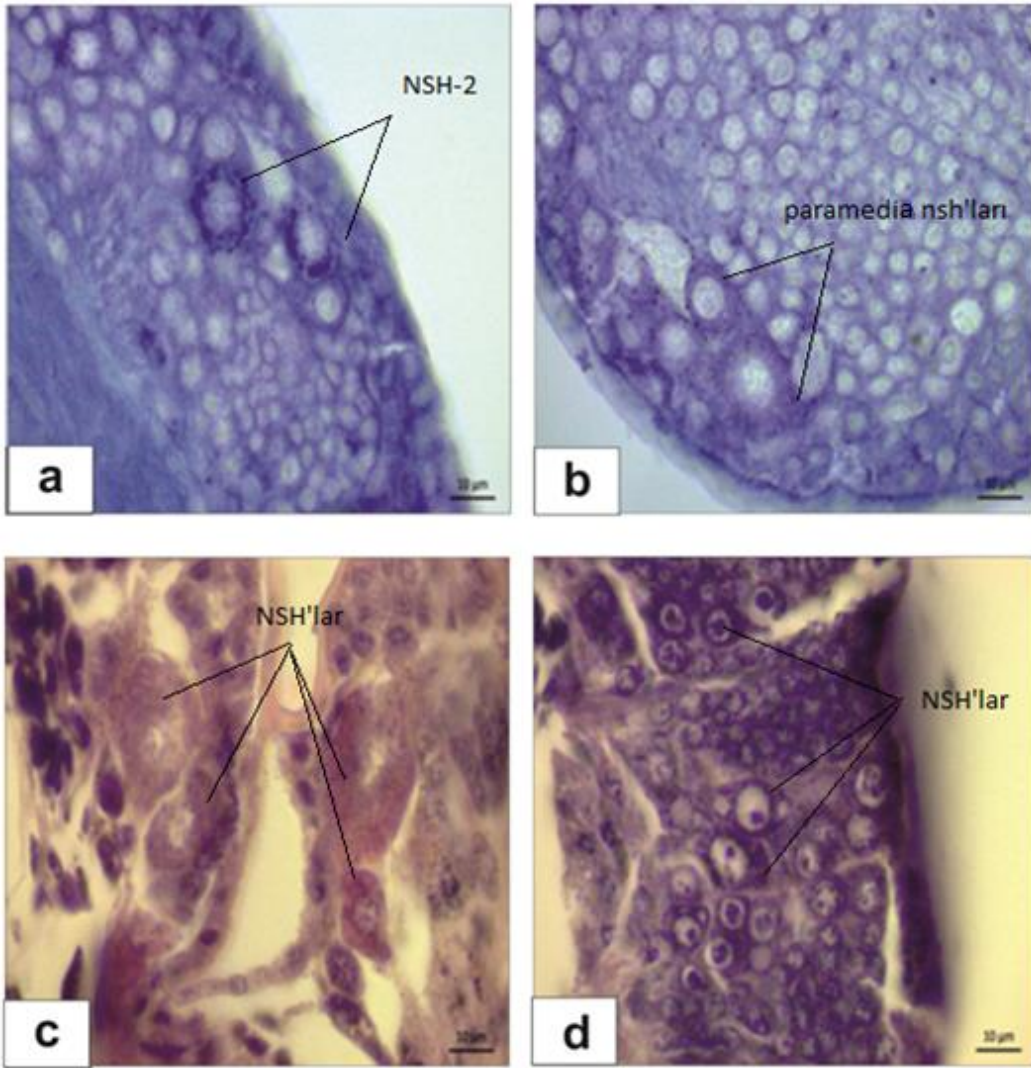
5. instar 6.gün ipekböceği larvalarında PIC, pars lateraller, paramedian protoserebral ve tritoserebrum bölgelerinde yoğun bir şekilde nörosekresyon hücreleri bulunmaktadır. PIC bölgesinde dörder adet NSH-3 hücreleri ikişer adet NSH-2 hücreleri ve birer adet de NSH-1 hücresi bulunmaktadır. Laterallerde birer adet nörosekretuvar materyali yoğun olan NSH-1 hücreleri dikkat çekmektedir. Bunun yanında laterallerde NSH-2 ve NSH-3 hücreleri de tespit edilmiştir. Bombyxin salgılayan hücreler de median bölgede dikkat çekmektedir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. 5. instar 6.Gündeki nsh'ler (a; laterallerdeki nsh'lar, b; NSH-2 ve NSH-3 (bombyxin salgılayan hücreler) c; laterallerdeki nsh'lar, d; PIC'deki nsh'lar. a ve b PAF boyama, c ve d HEM&Eosin boyama).

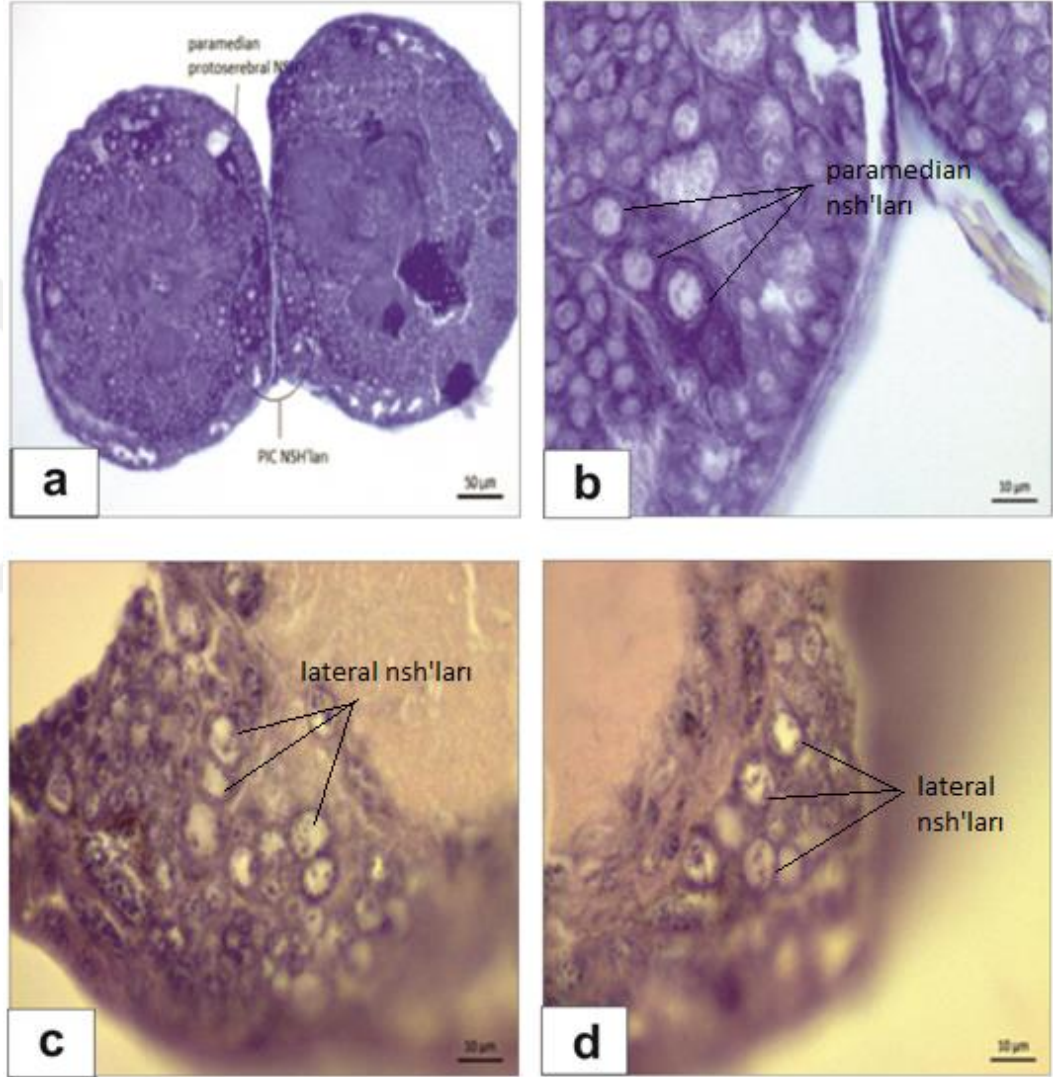
6. günden sonra larvalar ipek örmeye başladıkları için, örme 1.gün diye adlandırılmıştır.

Örme 1.günde beyinin PIC bölgesinde NSH-1, NSH-2 ve NSH-3 hücrelerine rastlanmıştır. Laterallerde nörosekretuar materyal bakımından zengin olan ikişer tane beşgen-altıgen yapıda nörosekresyon hücresi tespit edilmiştir. Ayrıca paramedian protoserebral nörosekresyon hücrelerine de rastlanmıştır (Şekil 3.11).



Şekil 3. 11. Örme 1.Gündeki nsh'ler (a; laterallerdeki yoğun materyalli nsh'ler, b; paramedian protoserebral nsh'leri, c;PIC'deki nsh'ler d; lateraldeki nsh'ler. a ve b PAF boyama,c ve d;HEM&Eosin boyama).

Örme 2.günde PIC bölgesinde NSH-1, NSH-2 ve NSH-3 hücrelerine rastlanmıştır. Pars laterallerde çok sayıda NSH-2 hücreleri tespit edilmiştir ayrıca tritoserebral bölge ve paramedian protoserebral bölgede de nörosekresyon hücrelerine rastlanmıştır. Median kısımdaki bombyxin salgılayan hücreler yoğun salgı içerdiği gibi pars lateral bölgelerde PTTH salgılayan hücreler de yoğun salgı içermektedir (Şekil 3.12).

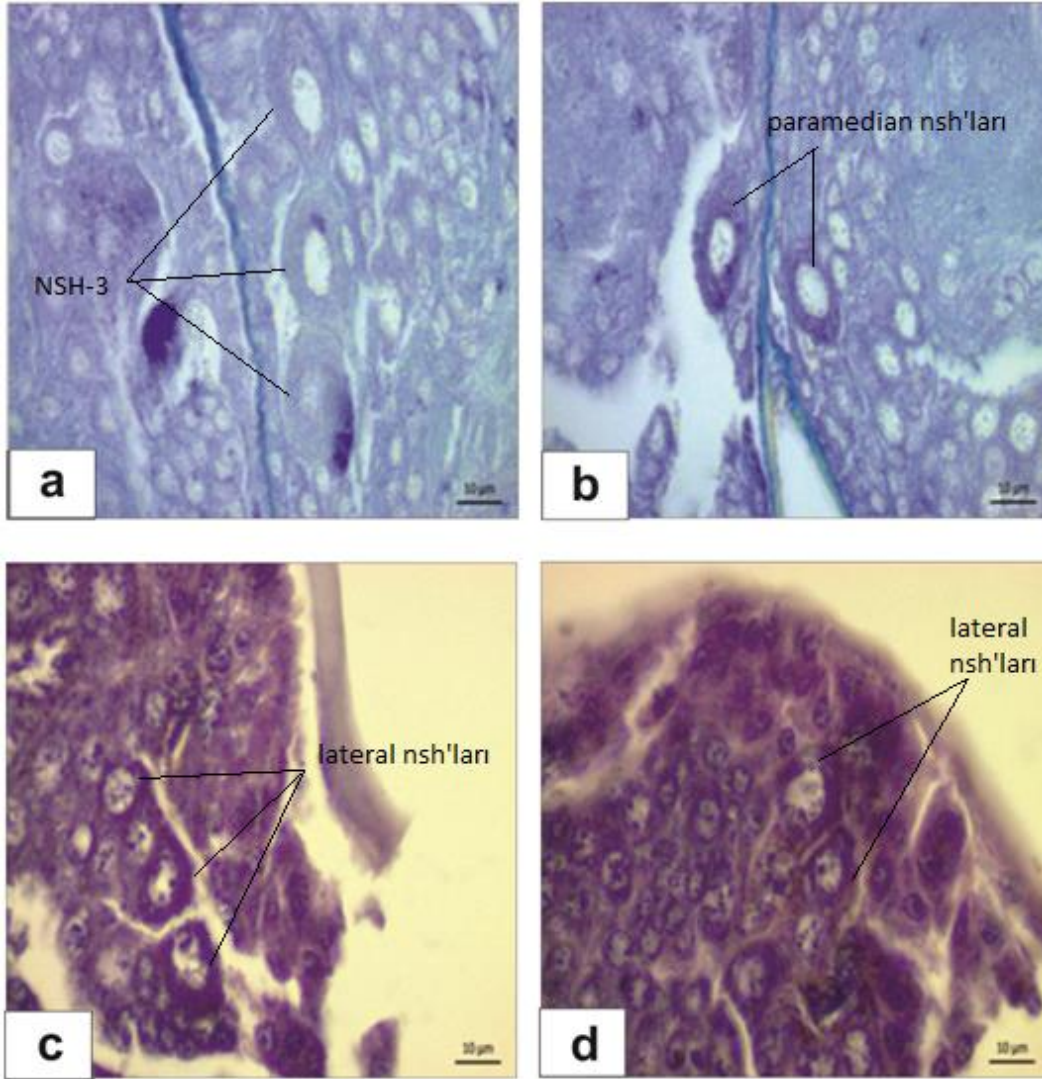


Şekil.3.12. Örme 2. Gündeki nsh'ler. (a; beynin genel görünümünde nsh'ler, b;PIC bölgesindeki nsh'ler, c ve d: pars laterallerde nsh'ler. a ve b PAF boyama, c ve d; HEM&Eosin boyama.)

Örme 1. günde 1ng fenoxycarb uygulanan hayvanların 24 saat sonra beyinleri çıkarılmıştır ve uygulama grubu örme 2. günden itibaren başlamaktadır. Uygulama grubunda F.Ö.2. gün, F.Ö.3. gün, F.Ö.4. gün ve F.Ö.5. gün örnekleri

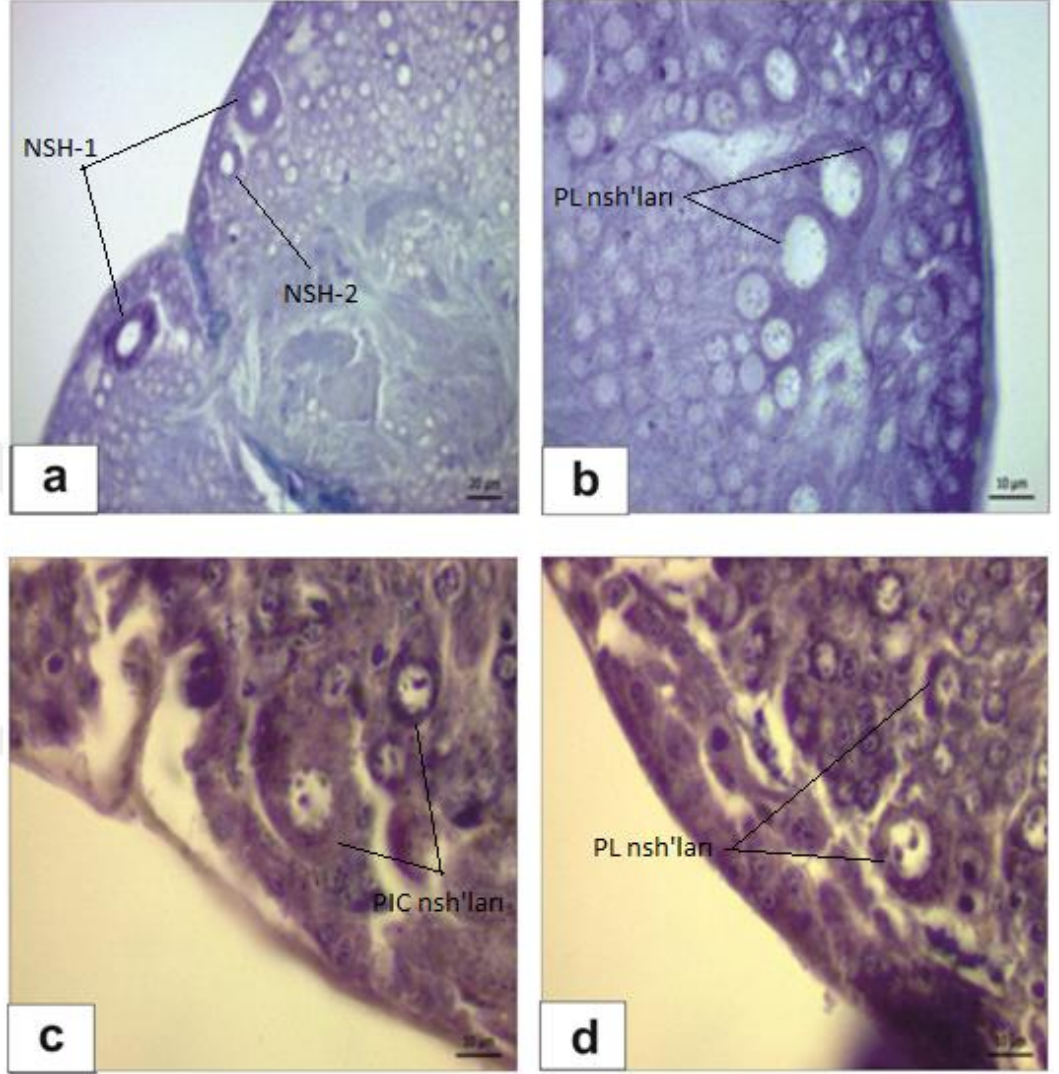
incelenmiştir. Fenoksikarb bir juvenil hormon analogu olduğu için uygulama grubundaki hayvanların pupaya geçmesini geciktirerek örme gününü 1 gün uzatmıştır. Kontrol grubu ise örme 4. güne kadar mevcuttur ve 4. günden itibaren pupa evresine geçmiştir.

F. Örme 2.güne ait hayvanların beyinlerinde PIC bölgesinde üçer adet NSH-3 hücresi ve birer adet yoğun materyalli NSH-2 hücresi tespit edilmiştir. Laterallerde NSH-3 hücrelerine, paramedian protoserebral bölgesinde de birer adet NSH-1 hücrelerine rastlanmıştır (Şekil 3.13).



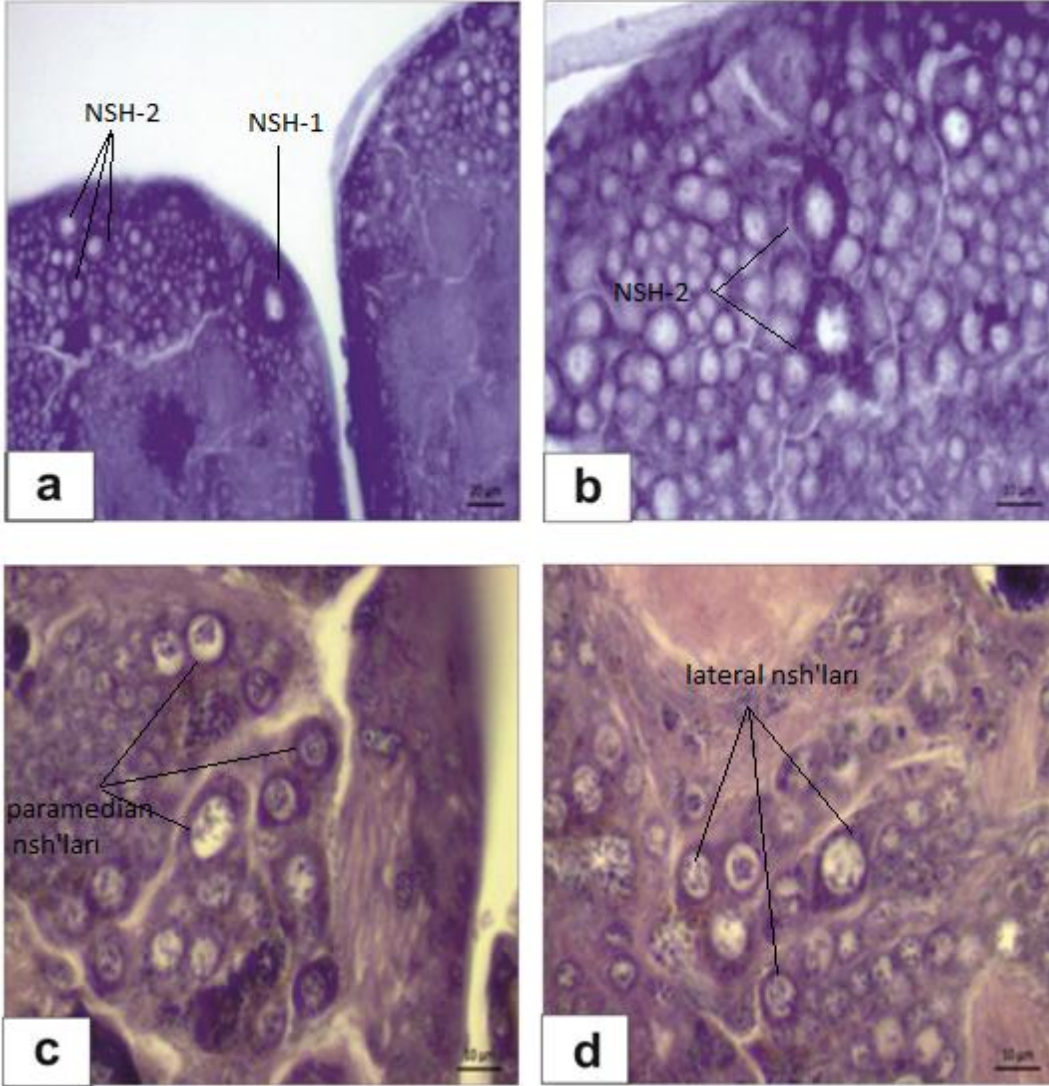
Şekil 3.13. Uygulama grubu örme 2. Gündeki nsh'ler (a;PIC bölgesindeki NSH-3 hücreleri, b;paramedian protoserebral bölgesindeki NSH-1 hücreleri, c ve d; laterallerdeki nsh'ler. a ve b PAF boyama, c ve d; HEM&Eosin boyama).

Örme 3.güne ait beyinlerde PIC bölgesinde NSH-1 ve NSH-2 hücreleri tespit edilmiştir. Laterallerde NSH-1 ve NSH-2 hücrelerine rastlanmıştır. Bugüne ait beyinlerde NSH-3 hücrelerine rastlanmamıştır (Şekil 3.14).



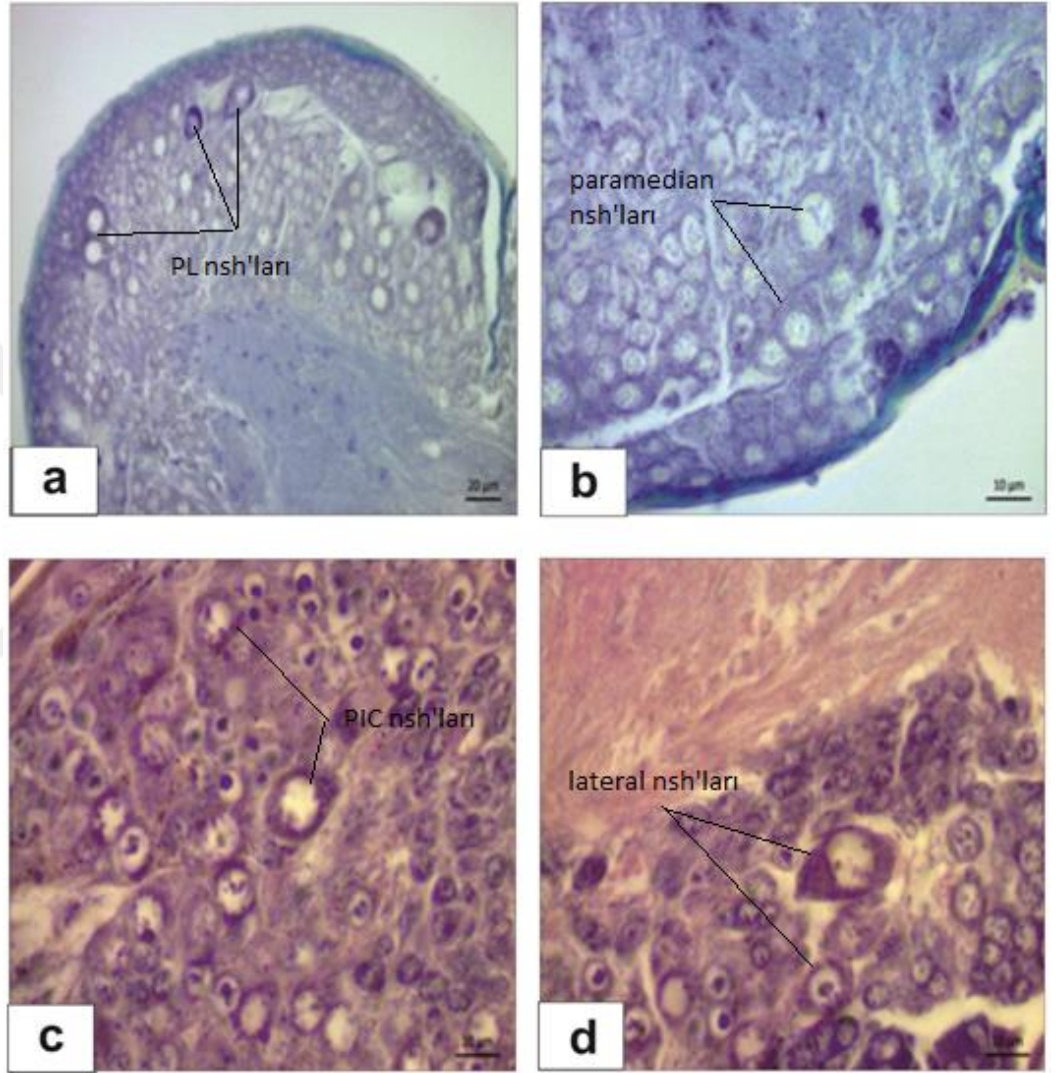
Şekil 3.14. Örme 3.gündeki nsh'ler. (a ve c;PIC bölgesindeki nsh'ler, b ve d; pars lateraldeki nsh'ler, a ve b; PAF boyama, c ve d; HEM&Eosin boyama.)

F.Örme3.günde PIC bölgesinde yalnızca birer adet NSH-1 hücresi bulunmaktadır. Pars laterallerde ise NSH-2 hücrelerine rastlanmaktadır. Ayrıca paramedian protoserebral bölgede de NSH-1 ve NSH-2 hücreleri tespit edilmiştir (Şekil 3.15).



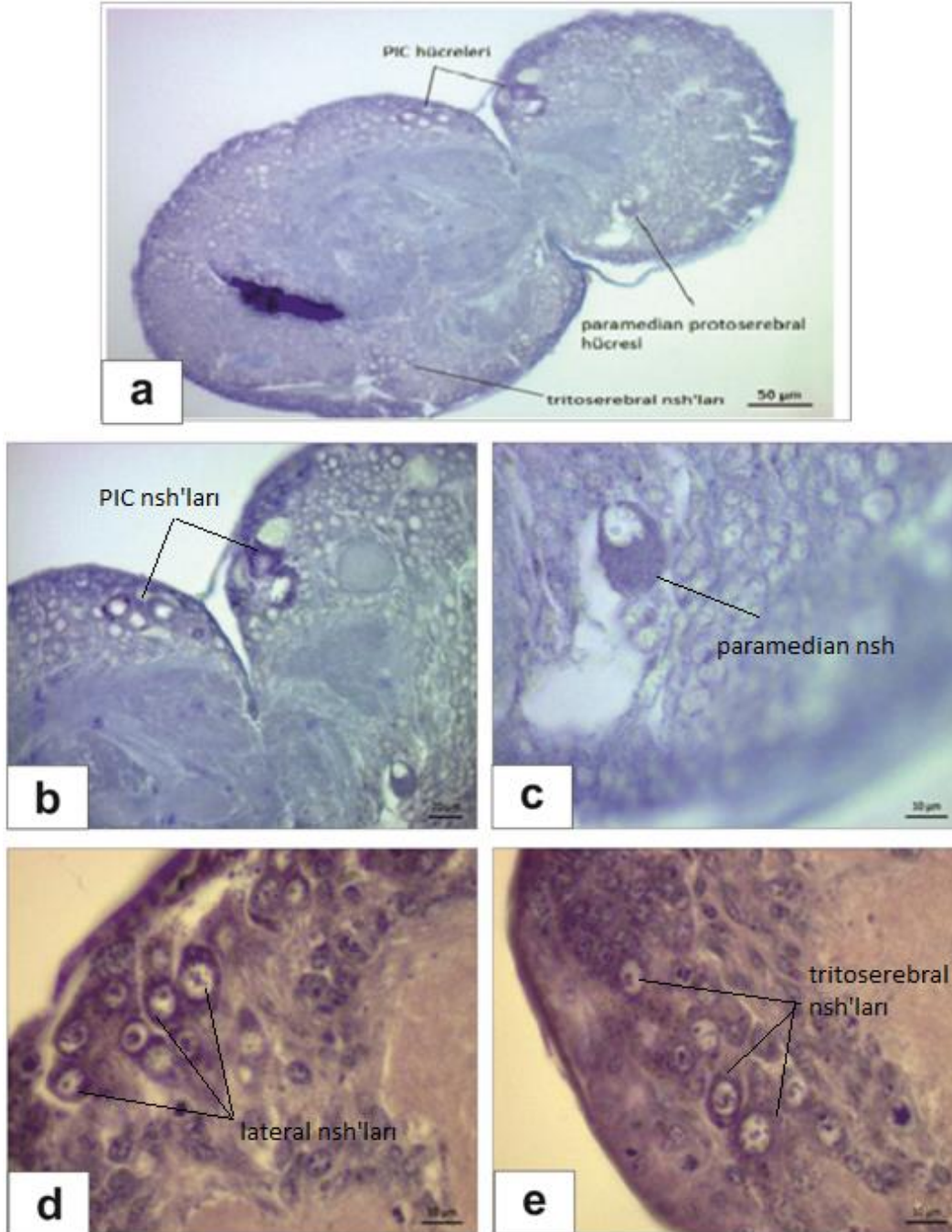
Şekil 3.15. Uygulama grubu 3.Gündeki nsh'ler. (a; PIC ve Pars laterallerde bulunan nsh'ler, b; laterallerde bulunan nsh'ler, c; paramedian protoserebral bölgede bulunan nsh'ler, d; laterallerde bulunan nsh'ler. a ve b; PAF boyama, c ve d; HEM&Eosin.)

Örme 4.günü örmenin son günüdür ve bu güne ait beyinlerde PIC bölgesinde NSH-1 ve NSH-3 hücreleri, laterallerde NSH-1, NSH-2 ve NSH-3 hücreleri bulunmaktadır. Paramedian protoserebral bölgede de NSH-3 hücrelerine rastlanmıştır (Şekil 3.16).



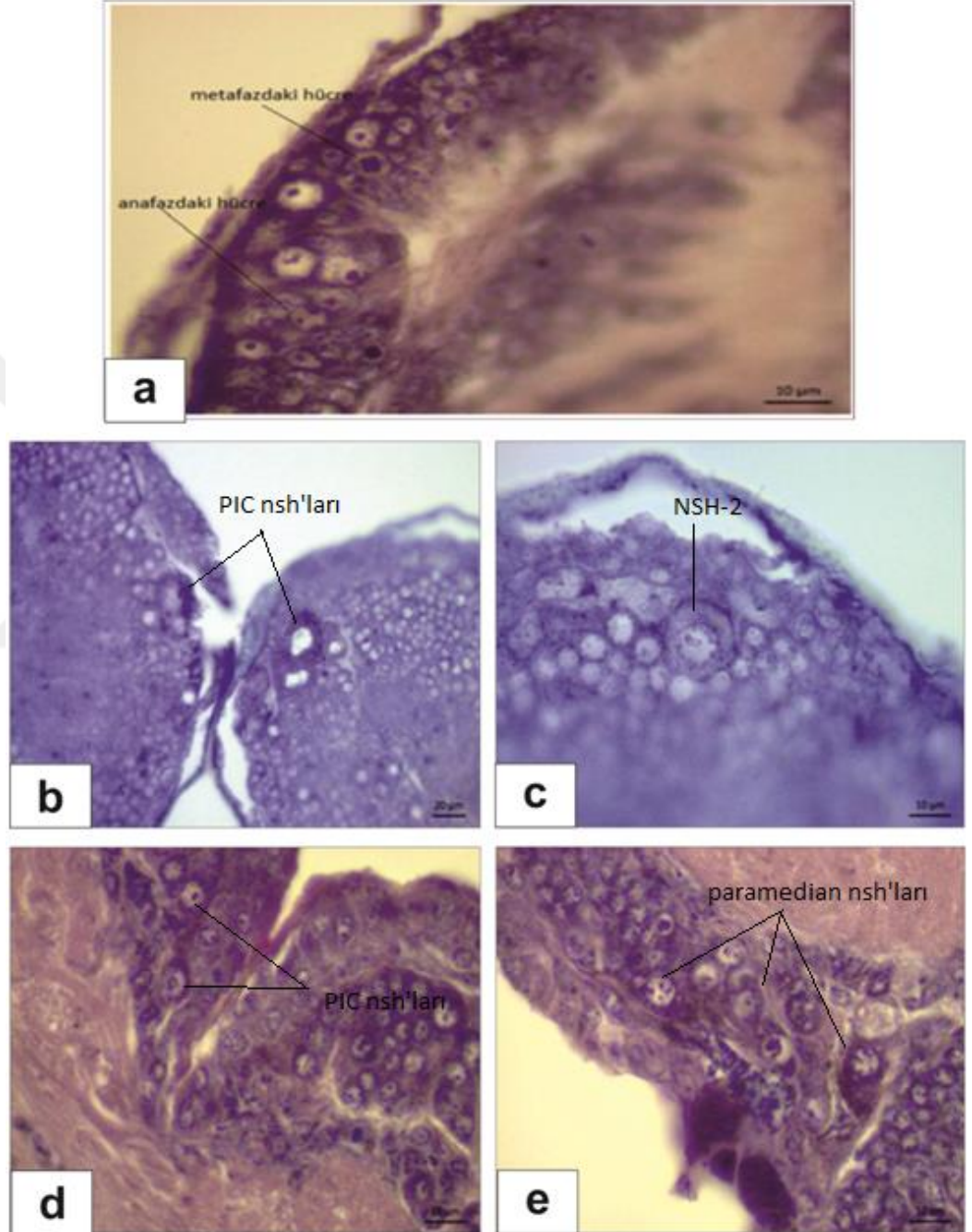
Şekil 3.16. Örme 4. Gündeki nsh'ler (a; PIC ve laterallerdeki nsh'ler, b;paramedian protoserebral bölgedeki nsh'ler, c; PIC bölgesindeki nsh'ler d; laterallerdeki nsh'ler. a ve b;PAF boyama, c ve d; HEM&Eosin boyama.)

F. Örme 4. güne ait beyinlerde PIC bölgesinde NSH-1, NSH-2 ve NSH-3 hücreleri tespit edilmiştir. Laterallerde NSH-2 hücreleri bulunmaktadır. Paramedian protoserebral ve tritoserebral bölgelerinde de nörosekresyon hücrelerine rastlanılmıştır (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. Uygulama grubu örme 4. Gün deki nsh'ler (a; beynin genel görünümü ve nörosekresyon hücreleri, b; PIC bölgesindeki nsh'ler, c; paramedian protoserebraldeki nsh'ler, d; lateraldeki nsh'lar, e; tritoserebraldeki nsh'ler. a, b, c ; PAF boyama, d ve e; HEM&Eosin boyama).

F. Örme 5. güne ait beyinlerde PIC bölgesinde oldukça iri NSH-1 hücrelerine rastlanılmıştır. Bunun yanı sıra NSH-2 ve NSH-3 hücreleri de görülmektedir. Laterallerde birer adet NSH-3 hücresi bulunmaktadır. Paramedian protoserebral bölgede de NSH'ler görülmüştür. Diğer günlerden farklı olarak sinir hücrelerinde bölünmelerin farklı safhalarına rastlanmıştır (Şekil 3.18).



Şekil3.18. Uygulama grubu örme 5.gündeki nsh'ler (a; bölünme aşamasındaki hücreler, b ve d; PIC bölgesindeki nsh'ler, c; lateraldeki nsh'lar, e; paramedian protoserebral bölgedeki nsh'ler. b ve c PAF boyama, a, d ve e HEM&Eosin boyama).

4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Böceklerde jüvenil hormonun oynadığı rolün anlaşılması adına jüvenil hormon aktivitesine sahip birçok kimyasal jüvenil hormon analogu geliştirilmiştir (Dedos et. al.,2002). Sentezlenen ve biyotayini yapılan yaklaşık 1000 kadar jüvenil hormon analogu vardır (Gilbert,2012).

Fenoksikarb uygulama zamanı ve uygulama miktarına göre protorasik bezi inhibe eder. JH ve JHA'ları son larval evrenin başlangıcında uygulanırsa larval evrenin uzamasına neden olur ve larva-pupa deri değişimini inhibe eder. Uygulama dozu ve zamanına bağlı olarak ekstra bir larval deri değişimi meydana gelebilir. Son larval evrenin sonunda örme davranışının başlangıcında uygulanırsa larva-pupa deri değişimi meydana gelir (Uranlı,2008).

Bizim çalışmamızda da fenoksikarb larval evrenin sonu örme davranışının başlangıcı olan örmenin 1. gününde uygulanmıştır. JH miktarı hemolenfte 6. günde artış gösterirken PTTH miktarı ise bir düşüş göstermektedir (Niimi and Sakurai,1997; Mizoguchi et. all., 2001). Buna bağlı olarak bulgularımızda da belirtildiği gibi 6. Günde nörosekresyon hücre salgıları yoğun olmaktadır. Çalışmamızda bu uygulama sonucunda ekstra bir larval evrenin oluşmadığı, larva-pupa deri değişiminin meydana geldiği ve larval evrenin sadece bir gün uzayarak pupal evrenin oluştuğu tespit edilmiştir.

Stereomikroskop altında *Bombyx mori* beyni incelenmiş, beyinin iki lop halinde, nörosekresyon hücrelerin kromofilik materyallerinden dolayı hareli bir görünümde olduğu ve sirkümüözofajial konnektiflerle subözofajial ganlionlara bağlandığı tespit edilmiştir.

Birçok böcekte olduğu gibi *Bombyx mori* beyinde de nörosekresyon hücreleri pars laterallerde ve medianda olmak üzere iki grup halinde bulunduğu Akai (1996) tarafından gösterilmiştir. Aynı şekilde Ichikawa (1991) da beyindeki nörosekresyon hücrelerinin pars laterallerde ve pars interserebralis'te gruplandığını belirtmiştir. Ancak bizim çalışmamızda Raabe (1982)'ın belirttiği

gibi beyinde pars lateral, pars interserebralis, paramedian ve tritoserebral alanlar olmak üzere dört grup tespit edilmiştir.

Bassurmanova ve Panov (1967) lepidopterlerde protoserebrumun median kısmında üç grup nörosekresyon hücresi olduğunu, Geldiay ve Edwards (1973) *Acheta domesticus*'da protoserebrumun median kısmında iki grup nörosekresyon hücresi olduğunu belirtmiştir. Biz ise ipekböceği *Bombyx mori*'de protoserebrumun median kısmında pars interserebralis ve paramedian olmak üzere iki grup halinde olduğunu tespit ettik.

Akai et.al. (1966)'da *Bombyx mori*' de median bölgede A ve B olmak üzere iki tip hücre olduğunu, A hücrelerinin daha geniş, eliptik ve sitoplazmasında büyük vakuol içerdiğini, B hücrelerinin ise daha küçük ve sitoplazmasında vakuol içermediğini belirtmiştir. Bizim elde ettiğimiz beyin kesitlerin de ise median bölgede NSH-1, NSH-2 ve NSH-3 olmak üzere üç tip hücre tespit edilmiştir. NSH-1 tip iri, koyu granüllü ve vakuollü hücrelerdir. NSH-2, NSH-1'den daha küçük ve vakuolsüz, NSH-3 tip hücreler ise NSH-1 gibi iri fakat az granül içerdiği için daha açık renk görünen hücrelerdir.

Beynin median, lateral ve paramedian bölgelerinde NSH-1, NSH-2 ve NSH-3 hücrelerinin üçü de bulunabilirken tritoserebral bölgede bu hücrelerin hepsi tespit edilememiş, sadece NSH-2 hücrelerine rastlanılmıştır. Raabe (1982)'ın tespit ettiği gibi nörosekresyon hücrelerinin en çeşitli olduğu kısım PIC bölgesidir. Üç hücre tipi de rahatlıkla bu bölgede görülebilmektedir.

Diğer günlerden farklı olarak 5. instarın 0. ve 6. günlerinde nörosekresyon hücreleri beynin median, lateral, paramedian ve tritoserebral olmak üzere her dört bölgesinde de yoğun bir şekilde bulunmaktadır. Bu yoğunluğu PTTH'nin hemolenfteki 0. ve 6. günlerinde düşük olmasıyla ilişkilendirilebilir (Mizoguchi et al., 2001). Hemolenfteki PTTH miktarının düşük olması nörosekresyon hücreleri tarafından materyalinin henüz hemolenfe verilmemesinden kaynaklanmaktadır.

Parlak ve Ünal (1999) 5. instarın 5. gününden itibaren nörosekresyon hücrelerinin sitoplazmalarında granüllerin birikmeye başladığını, 6. günde ise bu artışın hızlandığını ve yoğun granüllü hücreler tespit ettiğini söylemiştir. Bizim

çalışmamızda da 6.günde nörosekresyon hücrelerinin yoğun granüllü olduğu tespit edilmiştir. Özellikle protoserebrumun lateralinde PTTH salgılayan hücrelerin ve median bölgede insülin benzeri peptid yani bombyxin salgılayan hücrelerin yoğun materyal içerdiği şekil 4.2’de de gösterilmiştir.

5. instarın 6. gününde PTTH salgılayan hücrelerinin yoğun salgı içermesinin temel sebebi juvenil hormonun 6.günden hemolenfteki miktarının fazla olması ve juvenil hormonu baskılayan, ecdizon hormonunun salgılanmasını stimüle eden nörosekresyon hücrelerindeki PTTH salgısının artmasından kaynaklanır. Aynı şekilde bombyxin (insulin benzeri peptid) salgılayan hücrelerin yoğun salgıları da Saegusa et al.,(1992)’nın belirttiği gibi salgılarının en çok 6. günde olduğu görülmektedir.

Nijhout ve Grunert (2002) bombyxinin kanat imajinal disklerinin büyümesini ve hücre bölünmesini stimüle ettiğini belirtmiştir. Bu nedenle larvanın son evrelerinde bombyxin salgılayan hücreler yoğun granüllü görülmektedir. Kontrol grubundaki örmenin 2. gününe ait bombyxin salgılayan hücrelerin yoğun salgı içerdiği, uygulama grubundaki örme 2. güne ait bombyxin salgılayan hücrelerin salgılarının ise daha az olduğu şekil 4.3’te gösterilmiştir ve fenoksikarbın bombyxin salgısını baskıladığı söylenebilir.

Bir juvenil hormon analogu olan fenoksikarb uygulandığı için örme evresi bir gün uzamıştır. Uygulama grubunda örmenin 5.gününde hem&eosin ile boyanan beyin kesitlerinde çok sayıda hücrenin farklı bölünme evrelerinin olduğu tespit edilmiştir. Park ve arkadaşlarının (2002) yapmış olduğu çalışmada böcek beynindeki nöroblastlar (kök hücreler)’ın özellikle larval evrede bölünmelere rastlanabileceği hatta bazı fibroblast büyüme faktörlerinin de bu bölünmeleri tetiklediklerini belirtmişlerdir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Altun, D., 2007,** XIX. Yüzyılda Bursa'da İpek Böcekçiliği.
- Akai, H., Nagashima, T., Aoyagi, S., Endo, Y., Uwo, M. F., Asaoka, K., ... & Kobayashi, E., 1996,** Development and secretory function of neurosecretory A cell in brain of *Bombyx mori*. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 32(3-4), 333-340.
- Akai, H., 1988,** Hormonal regulation of larval development and its utilization in silk production by [silkworm] *Bombyx* silkmoth. *JARQ (Japan)*.
- Bassurmanova, O. K., & Panov, A. A., 1967,** Structure of the neurosecretory system in Lepidoptera. Light and electron microscopy of type A'-neurosecretory cells in the brain of normal and starved larvae of the silkworm *Bombyx mori*. *General and comparative endocrinology*, 9(2), 245-262.
- Bisch-Knaden, S., Daimon, T., Shimada, T., Hansson, B. S., & Sachse, S., 2014,** Anatomical and functional analysis of domestication effects on the olfactory system of the silkmoth *Bombyx mori*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 281(1774), 20132582.
- Chapman, R. F., 2013,** *The insects: structure and function*. S. J. Simpson (Ed.). Cambridge University Press. 659-660p.
- Dedos, S. G., Szurdoki, F., Székács, A., Mizoguchi, A., & Fugo, H., 2002,** Induction of dauer pupae by fenoxycarb in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of insect physiology*, 48(9), 857-865.
- Demirsoy, A., 1997,** Yaşamın Temel Kuralları, Entomoloji, Ankara Cilt 2, Kısım 2. Beşinci Baskı
- Downer, R. G., & Laufer, H., 1983,** *Invertebrate endocrinology. Volume 1. Endocrinology of insects*. Alan R. Liss. 13-19p.
- Erkin, E., & Kismalı, Ş., 1988,** Juvenil Hormon Analogu ZR-51Z' nin *Aphidius evri* Haliday (Hymenoptera: Aphidiidae) Üzerine Etkisi.
- Geldiay, S., & Edwards, J. S., 1973,** The protocerebral neurosecretory system and associated cerebral neurohemal area of *Acheta domesticus*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 145(1), 1-22.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Gilbert, L. I. (Ed.)**, 2012, *Insect endocrinology*. Academic Press. 310-312p.
- Goncu, E., & Parlak, O.**, 2011, The influence of juvenile hormone analogue, fenoxycarb on the midgut remodeling in *Bombyx mori* (L., 1758)(Lepidoptera: Bombycidae) during larval-pupal metamorphosis. *Turk J Entomol*, 35, 179-194.
- Hartenstein, V.**, 2006, The neuroendocrine system of invertebrates: a developmental and evolutionary perspective. *Journal of endocrinology*, 190(3), 555-570.
- Ichikawa, T.**, 1991, Architecture of cerebral neurosecretory cell systems in the silkworm *Bombyx mori*. *Journal of experimental biology*, 161(1), 217-237.
- İzzetoğlu, G. T., Özkorkmaz, F., Zeka, Ö., & Öber, A.**, 2009, İpekböceği (*Bombycidae: Bombyx mori*)’nde juvenil ve ekdizon hormonları uygulaması sonucu olası değişimler. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15(4), 525-530.
- Karakişli H., Kumaş, M., & Engin, D.**, 2012, *Locusta migratoria* L. 1758, (Orthoptera, Acrididae)’da Beynin Protocerebrum (Ön Beyin) Bölgesindeki Pars Intercerebralis Hücrelerinin Histolojik Açıdan Değerlendirilmesi
- Kısmalı, Ş.**, 1980, Böceklerde juvenil hormonun etkileri. *Turkish Journal of Entomology*, 4(4).
- Klowden, M. J.**, 2013, *Physiological systems in insects*. Academic Press. 540-545p.
- Le, H., Szurdoki, F., & Szekacs, A.**, 2003, Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of the insect growth regulator fenoxycarb in environmental and biological samples. *Pest management science*, 59(4), 410-416.
- Meng, M., Liu, C., Peng, J., Qian, W., Qian, H., Tian, L., ... & Xia, Q.**, 2015, Homeodomain Protein Scr Regulates the Transcription of Genes Involved in Juvenile Hormone Biosynthesis in the Silkworm. *International journal of molecular sciences*, 16(11), 26166-26185.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Miranda, J. E., Bortoli, S. A. D., & Takahashi, R.,** 2002, Development and silk production by silkworm larvae after topical application of methoprene. *Scientia Agricola*, 59(3), 585-588.
- Mizoguchi, A., Oka, T., Kataoka, H., Nagasawa, H., Suzuki, A., & Ishizaki, H.,** (1990). Immunohistochemical Localization of Prothoracicotropic Hormone-Producing Neurosecretory Cells in the Brain of *Bombyx mori*. *Development, growth & differentiation*, 32(6), 591-598.
- Mizoguchi, A., Ohashi, Y., Hosoda, K., Ishibashi, J., & Kataoka, H.,** (2001). Developmental profile of the changes in the prothoracicotropic hormone titer in hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*: correlation with ecdysteroid secretion. *Insect biochemistry and molecular biology*, 31(4), 349-358.
- Niimi, S., & Sakurai, S.,**(1997). Development changes in juvenile hormone and juvenile hormone acid titers in the hemolymph and in-vitro juvenile hormone synthesis by corpora allata of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 43(9), 875-884.
- Nijhout, H. F., & Grunert, L. W.,** 2002, Bombyxin is a growth factor for wing imaginal disks in Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15446-15450.
- Pandey, A., & Bloch, G.,** 2015, Juvenile hormone and ecdysteroids as major regulators of brain and behavior in bees. *Current Opinion in Insect Science*, 12, 26-37.
- Park, Y., Rangel, C., Reynolds, M. M., Caldwell, M. C., Johns, M., Nayak, M., ... & Datta, S.,** (2003). *Drosophila perlecan* modulates FGF and hedgehog signals to activate neural stem cell division. *Developmental biology*, 253(2), 247-257.
- Parlak, O.,** 2001, İpekböceği Biyolojisi (Yardımcı Ders Kitabı). *Ege Üniversitesi Basımevi, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları*, 171. 11-51p.
- Parlak, O., & Ünal, G.,** 1999, İpekböceği *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) beyin nörosalgı hücrelerinde beşinci larval evre süresince hemolenf ektisteroid değişimlerine bağlı farklılıkların araştırılması. *Tr. J. of Zoology*, 23, 733-737.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Raabe, M.**, 2012, *Insect Neurohormones. National Center for Scientific Research Pierre and Marie Curie University Paris, France.*3-20p.
- Saegusa, H., Mizoguchi, A., Kitahara, H., Nagasawa, H., Suzuki, A., & Ishizaki, H.**, (1992). Changes in the Titer of Bombyxin-Immunoreactive Material in Hemolymph during the Postembryonic Development of the Silkworm *Bombyx mori*. *Development, growth & differentiation*, 34(5), 595-605.
- Ishizaki, H.** 1992, Changes in the Titer of Bombyxin-Immunoreactive Material in Hemolymph during the Postembryonic Development of the Silkworm *Bombyx mori*. *Development, growth & differentiation*, 34(5), 595-605.
- Shimizu, I., Aoki, S., & Ichikawa, T.**, 1997, Neuroendocrine control of diapause hormone secretion in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of insect physiology*, 43(12), 1101-1109
- Soya, S.**,2013, İpekböceği (*Bombyx mori* L.) Sinir Sisteminde Yaşlanma Sürecinde Şeker Değişikliklerinin Belirlenmesi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Doktora Tezi) İzmir.
- Suenobu, A., Mizoguchi, A., & Ichikawa, T.**, 2004, Relationship between firing activity of bombyxin-producing neurosecretory cells and hemolymph bombyxin titer in the silkworm *Bombyx mori*. *General and comparative endocrinology*, 137(3), 219-226.
- Sullivan, J.**, 2000, Environmental fate of fenoxycarb. *Environmental monitoring fate reviews. Environmental Monitoring Branch, Department of Pesticide Regulation, California EPA, Sacramento, CA, USA.*
- Şirip, N.**,1972, *Anacaridium aegyptium* L.'nin Ventral Sinir Şeridi Nörosekresyon Hücreleri Üzerinde Histolojik Araştırma. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi İzmir.
- Treherne, J. E.**, 1974, *Insect neurobiology*. North-Holland Pub. Co.; distributed by American Elsevier Pub. Co..3-310p.
- Tufan S., Öber, A., & İzzetoğlu T. G.**, 2009, *Bombyx mori* Linnaeus (Lepidoptera: Bombycidae)'nin Gelişim Evrelerinde Beynin Histolojik Açından Araştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* ,15 (6): 847-854.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Uno, T., Isoyama, Y., Sakamoto, K., Uno, Y., Sakamoto, K., Kanamaru, K., ... & Takeda, M.,** 2014, Characterization of Rab-interacting lysosomal protein in the brain of *Bombyx mori*. *Histochemistry and cell biology*, 141(3), 311-320.
- Uranlı, R.,** 2008, İpekböceğinde (*Bombyx mori*) 5. Larval Evrenin 0. Gününden İtibaren Kontrol ve Juvenil Hormon Analogu Fenoxycarb Uygulanan Gruplarda Hemolenf Proteinlerinin SDS-PAGE İle Belirlenmesi. Ege Üniversitesi Bilimleri Enstitüsü (Yüksek Lisans Tezi) İzmir.
- Uranlı, R., Göncü, E., & Parlak, O.,** 2011, Investigation of the influence of the juvenile hormone analogue fenoxycarb on major hemolymph proteins of the silkworm *Bombyx mori* during the last larval instar. *Turkish Journal of Zoology*, 35(2), 223-236.
- Wang, G. B., Zheng, Q., Shen, Y. W., & Wu, X. F.,** 2016, Shotgun proteomic analysis of *Bombyx mori* brain: emphasis on regulation of behavior and development of the nervous system. *Insect science*, 23(1), 15-27.
- Wessnitzer, J., & Webb, B.,** 2006, Multimodal sensory integration in insects—towards insect brain control architectures. *Bioinspiration & biomimetics*, 1(3), 63.
- Xie, Y., Wang, B., Li, F., Ma, L., Ni, M., Shen, W., ... & Li, B.,** 2014, Molecular mechanisms of reduced nerve toxicity by titanium dioxide nanoparticles in the phoxim-exposed brain of *Bombyx mori*. *PloS one*, 9(6), e101062.
- Yılmaz, B.,** 1988, Omurgasızlarda Hormonlar. *A.Ü. Veterinerlik Fak Derg*, 35 (2-3) : 218-226.
- Zhang, Q. R., Xu, W. H., Chen, F. S., & Li, S.,** 2005, Molecular and biochemical characterization of juvenile hormone epoxide hydrolase from the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 35(2), 153-164.