

Alman Hamamböceği *Blatella germanica* (L.)'nın Erginlerinde İki Fungal İzolata Karşı Eikosanoidlerin Nodülasyon Reaksiyonları Üzerine Olan Fonksiyonu

Hasan TUNAZ^{ID}, Ali Arda IŞIKBER^{ID}, M. Kubilay ER^{ID}
KSÜ, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Kahramanmaraş
✉ : htunaz@ksu.edu.tr

ÖZET

Böceklerde mikrobiyal enfeksiyonlara karşı hücrel savunma reaksiyonlarından biri nodülasyon reaksiyonlarıdır. Bu çalışmada, Alman hamamböceği, *Blatella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae)'nın erginlerinde eikosanoidlerin, iki fungal izolata (*Beauveria bassiana*'nın 1512 ve *Metarhizium anisopliae*'nin S8-2) nodülasyon reaksiyonları üzerindeki rolü test edilmiştir. Ergin böcekler 1512 ve S8-2 ile enfekte edildiğinde, böcekler bu enfeksiyona karşı nodülasyon reaksiyonu göstermişlerdir. Ergin hamamböceklerine fungal izolatlarla enfekte edilmeden hemen önce eikosanoid biyosentez inhibitörleri enjekte edilmesi, fungal izolatlara karşı nodülasyon tepkisini azaltmıştır. Eikosanoid biyosentezindeki enzimlerin inhibitörlerinden deksametazon (bir fosfolipaz A₂ inhibitörü), indometasin, naproksen, ibuprofen (siklooksijenaz inhibitörleri), esculetin (bir lipoksijenaz inhibitörü) ve fenidon (hem siklooksijenaz / hemde lipoksijenaz inhibitörü) de dahil olmak üzere spesifik inhibitörlerle yapılan ayrı uygulamalar, *B. germanica*'nın fungal enfeksiyona karşı nodül oluşturmasını azaltmıştır. Bu bulgular, eikosanoidlerin *B. germanica*'nın erginlerindeki fungal enfeksiyonlara karşı nodülasyon reaksiyonlarında rol aldığı hipotezini desteklemektedir..

DOI:10.18016/ksudobil.346498

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 25.10.2017
Kabul tarihi : 12.12.2017

Anahtar Kelimeler

Böcek hücrel bağışıklığı
Nodülasyon
Beauveria bassiana;
Metarhizium anisopliae;
Blatella germanica

Araştırma Makalesi

The Functions of Eicosanoids on Nodulation Reactions to Two Fungal Isolates In Adults of The German Cockroach, *Blatella germanica* (L.)

ABSTRACT

One of the cellular defense reactions to microbial infections in insects is nodulation reactions. In this study, the role of eicosanoids on nodulation reactions to two fungal isolates (*Beauveria bassiana* 1512 and *Metarhizium anisopliae* S8-2) in adults of the German cockroach, *Blatella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae) was tested. Treating adult of German cockroach with *Beauveria* 1512 and *Metarhizium* S8-2 induced nodulation reactions. Injecting adults of *B. germanica* with eicosanoid biosynthesis inhibitors, immediately before intrahemocoelic injections of the fungal isolates reduced the nodulation response to fungal challenges. Separate treatments with specific inhibitors including dexamethasone (a phospholipase A₂ inhibitor), indomethacin, naproxen, ibuprofen (cyclooxygenase inhibitors), esculetin (a lipoxygenase inhibitor) and Phenidone (dual cyclooxygenase/lipoxygenase inhibitor) also impaired the ability of *B. germanica* to form nodules in reaction to fungal challenge. These findings support the hypothesis that eicosanoids has a role on nodulation reactions to the fungal infections in adults of *B. germanica*.

Article History

Received : 25.10.2017
Accepted : 12.12.2018

Keywords

Insect immunology;
Nodulation;
Beauveria bassiana;
Metarhizium anisopliae;
Blatella germanica

Research Article

To Cite : Tunaz H, Işıkber AA, Er MK 2018. Alman hamamböceği *Blatella germanica* (L.)'nın erginlerinde iki fungal izolata karşı eikosanoidlerin nodülasyon reaksiyonları üzerine olan fonksiyonu. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 21(3). 428-432. DOI:10.18016/ksudobil.346498

GİRİŞ

Böcekler, enfeksiyonlara karşı fizyolojik olarak, hümmoral ve hemositik olmak üzere iki kategoride bağışıklık geliştirirler (Gillespie ve ark., 1997; Rosales, 2017). Hümmoral bağışıklık birkaç saat içinde oluşur ve bunlar cecropins, attacins, dipterisinler ve defensinler gibi antibakteriyel proteinlerin indüklenmiş sentezini içerir (Stanley ve Miller, 2006). Bu proteinlerin varlığında, bakteriler bu peptidlerin deterjan özelliklerinden dolayı hümmresel bütünlüklerini kaybederler. Böcekler aynı zamanda lizozem enzimi salgılar ve peptidoglikan bakterilerin hümmre duvarlarını hidrolize ederek etkisini gösterirler (Dunn, 1986; Russell ve Dunn, 1996).

Hemositik (hümmresel) bağışıklık reaksiyonları ise böcek kan dolaşımındaki hemocytes'ler ile enfekte mikroplar arasında doğrudan etkileşimleri içermektedir (Stanley ve Miller, 2006). Hümmresel bağışıklık reaksiyonları fagositoz, nodülasyon ve kapsülendirmeyi içerir. Nodülasyon böceklerde mikrobiyal enfeksiyona karşı baskın hümmresel savunma reaksiyonudur (Stanley ve Miller, 2006; Satyavathi ve ark., 2014).

Eikosanoidler, araşidonik asit (AA) ve diğler iki C20 çoklu doymamış yağ asidi enzimatik oksijenasyonu ile üretilir. Eikosanoidlerin iki önemli grubu prostaglandinler ve birçok lipoksigenaz ürünüdür. Neredeyse tüm hayvanlar eikosanoidleri sentezler ve eikosanidler, moleküler, fizyolojik ve ekolojik olarak canlıda görev almaktadır (Stanley, 2000; Stanley ve Kim, 2014). Önemli biyolojik görevlerinin arasında eikosanoidlerin böcek bağışıklığındaki rolüdür.

Miller ve ark.,(1994) böceklerde bakteriyel enfeksiyona karşı oluşturulan nodülasyon reaksiyonlarında eikosanoidlerin etkili olduğunu bildirmişlerdir. Eikosanidlerin böcek bağışıklığındaki görev aldığı ile ilgili günümüze kadar bir çok çalışma yapılmıştır (Stanley ve Miller, 2006; Satyavathi ve ark., 2014). Bu çalışmalar eikosanoid biyosentez inhibitörlerinin bakteriyel ve diğler enfeksiyonlara karşı nodülasyon tepkisini inhibe edebildiğini göstermektedir. Bu durum, eikosanoidlerin böceklerin hümmresel bağışıklığında önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada Alman hamamböceği, *Blatella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae) erginlerine uygulanan iki fungus izolatına karşı ergin böceklerin nodülasyon reaksiyonu göstermesi ve nodülasyon reaksiyonunda eikosanidlerin etkisi test edilmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Organizma

Blatella germanica kolonileri plastik kaplarda (60 litre) yetiştirilmiş ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Hamamböceklerine ağzı pamuk tıpalı tüplerde su ve besin olarak kuru köpek maması sağlanmıştır. Çalışmada 5-10 günlük ergin Alman

hamamböcekleri kullanılıp $25 (\pm 2) ^\circ\text{C}$ sıcaklık ve %50 (± 5) nisbi nemli odada muhafaza edilmiştir.

Laboratuvarımızda bulunan entomopatojen fungus stok kültürleri (*Metarhizium anisopliae* ve *Beauveria bassiana* türlerine ait izolatlar) çalışmalarda kullanılmıştır. Fungus kültürleri $25\pm 2^\circ\text{C}$ 'de karanlık koşullarda hassas inkübatörlerde çoğaltılmış ve sporları bu şartlarda elde edilmiştir. Çoğaltma işleminde PDA ve SDA ortamları kullanılmıştır. Kültüre alınan fungus kültürlerinin sporulasyonu tamamlamasını (yaklaşık 4 hafta) takiben sporlar %0.02'lik Tween 80 solüsyonlarına aktarılmıştır. Çalkalayıcı kullanılarak homojen dağılım sağlandıktan sonra haemocytometer kullanılarak konsantrasyonu belirlenmiş ve denemelerde gerekli olan konsantrasyonlara seyreltme yolu ile ulaşılmıştır. Tüm spor konsantrasyonları denemelerden hemen önce hazırlanarak bekletilmeden kullanılmıştır. Kullanılacak olan spor süspansiyonlarından %1.5'lük WA ortamına ekimi yapılarak $25\pm 2^\circ\text{C}$ 'de 24 saatteki (entomopatojen fungus, *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson için 48 saat) çimlenme oranları tespit edilmiştir.

Eikosanoid İnhibitörleri Kimyasallar

Çalışmada bağışıklık sistemini engelleyici kimyasal inhibitörler olan dexamethasone ((11 β , 16 α)-9- fluoro-11,17,21-trihydroxy-16-methylpregna-1,4-dione), phenidone (1-phenyl-3-pyrazolidinone), indomethacin (1-P-(chlorobenzyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indolyl-acetic acid), esculetin (6,7-dihydroxycoumarin), piroxicam (3,4-benzothiazine-3-carboxamid 1,1-dioxide), naproxin(O-2-(6-methoxy-naphthyl) propionic acid), ibuprofen (α -methyl-4 (2-methylpropyl) benzeneacetic acid) sigma kimyasal firmasından temin edilerek kullanılmıştır.

Eikosanoidlerin Rolü ve Eikosanoid İnhibitörlerinin Etkisi

Alman hamamböceği erginlerine *Beauveria*'nın 1512 nolu izolatu, *Metarhizium*'un S8-2 nolu izolatu test edilmiştir. Denemeler üç tekerrürlü olarak düzenlenmiş olup her uygulamada 10 birey bulunmaktadır. Eikosanoid biyosentezi inhibitörleri (Dexamethasone, Indomethacin, Esculetin phenidone ibuprofen ve Naproxen) ise 0.026 $\mu\text{g/ml}$ şeklinde stok kültür hazırlanmıştır. Eikosanoid biyosentezi inhibitörleri Alman hamamböceği erginlerinin her birine 104 $\mu\text{g/4}\mu\text{l}$ uygulandıktan sonra; aynı böceklere fungusların 1×10^7 spor/ml konsantrasyonundan 5 μl uygulanmıştır. Uygulama yapılan böcekler Alman hamamböceği kültürlerinin bulunduğu şartlarda inkübe edilerek 6 saat sonra yüksek büyütme kapasiteli bir steromikroskop (45x) altında kesilerek (dissection) iç organları nodül oluşumu yönünden incelenmiştir (Tunaz, 2006). Böylece zararlıların kullanılan fungusa karşı hümmresel savunma olarak

nodül oluşturup oluşturmadığı, oluşturduğu takdirde bunun boyutları ve nodül olumunda eikosanoidlerin rolü ortaya konmuştur.

Verilerin Değerlendirilmesi

Nodülasyon dataları SAS istatistik programı (SAS Ins., 1989), kullanılarak tek yönlü varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Ortalama nodül sayıları arasındaki farklılıklar ise LSD testi uygulanarak ortaya konulmuştur.

BULGULAR ve TARTIŞMA

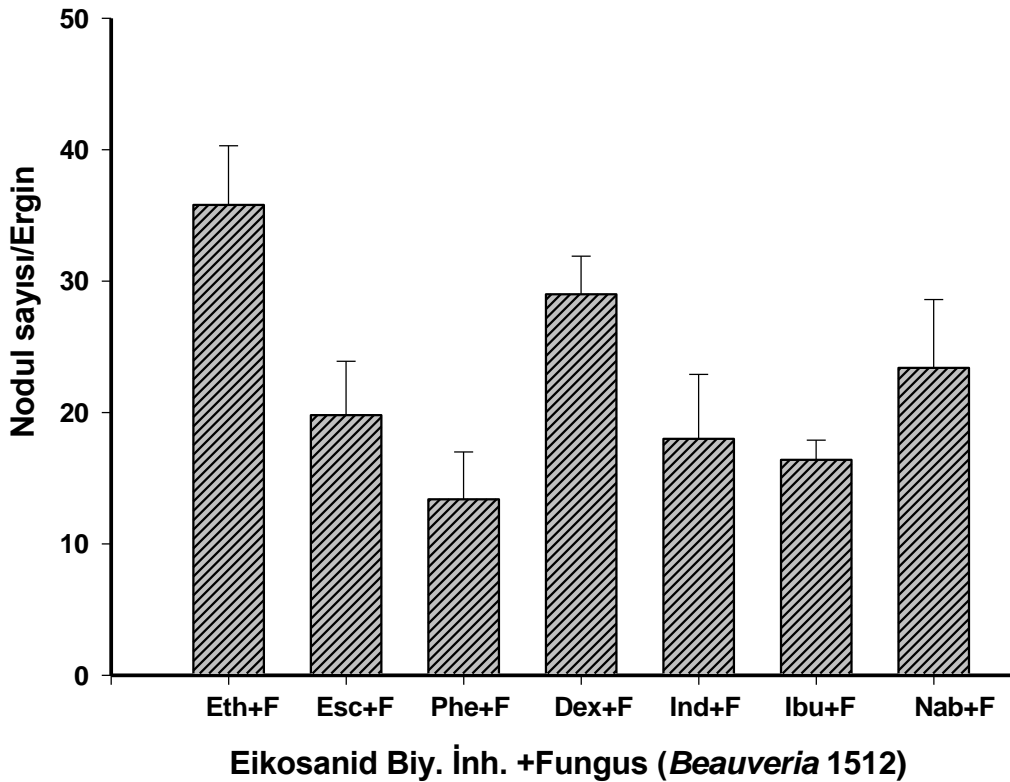
Alman Hamamböcekleri Erginlerinde *Beauveria*'nın 1512 nolu izolatına Karşı Oluşturulan Nodülasyon Reaksiyonunda Eikosanoidlerin Rolü

Fungal enfeksiyonlara tepki olarak eikosanoid biyosentezin altı farmasötik inhibitörünün nodülasyon üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Şekil 1'de görüldüğü gibi fungal enfeksiyona (*Beauveria*'nın 1512 nolu izolatı) nodül oluşturma tepkisi olayında altı tane eikosanoid biyosentez inhibitörlerinin etkisine bakıldığında; kontroldeki böceklerle (EtOH) karşılaştırdığımızda ortalama nodül sayısını önemli ölçüde azaltmıştır (LSD, $P \leq 0.01$). İnhibitörler arasında nodül sayısını azaltma bakımından önemli bir fark

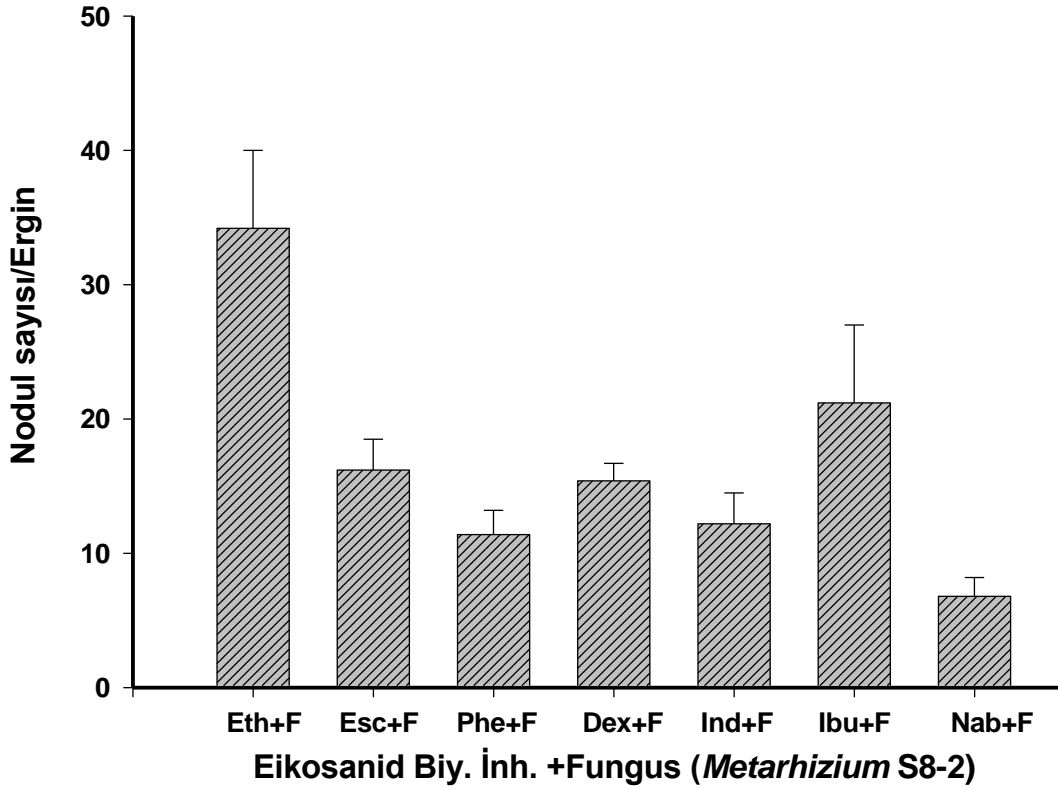
görülmemiştir. Böylece zararlıların kullanılan fungusa karşı hücrel savunma olarak nodül oluşturduğu ve bu oluşturma eikosanoidlerin rol aldığı ortaya çıkmıştır.

Alman Hamamböcekleri Erginlerinde *Metarhizium*'un S8-2 izolatına Karşı Oluşturulan Nodülasyon Reaksiyonunda Eikosanoidlerin Rolü

Bir önceki çalışmada olduğu gibi fungal enfeksiyonlara tepki olarak eikosanoid biyosentezi altı farmasötik inhibitörünün nodülasyon üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Şekil 2'de görüldüğü gibi fungal enfeksiyona (*Metarhizium*'un S8-2 nolu izolatı) nodül oluşturma tepkisi olayında altı tane eikosanoid biyosentez inhibitörlerinin etkisine bakıldığında; kontroldeki böceklerle (EtOH) karşılaştırdığımızda nodülasyon oluşumunu en fazla Nabroxen inhibitörü azaltmıştır (LSD, $P \leq 0.01$). Diğer inhibitörler de kontrolle karşılaştırdığımızda nodül sayısını azaltmıştır (LSD, $P \leq 0.01$). İnhibitörler arasında nodül sayısını azaltma bakımından farklılıklar ortaya çıkmıştır. Böylece zararlıların kullanılan fungusa karşı hücrel savunma olarak nodül oluşturduğu ve bu oluşturma eikosanoidlerin rol aldığı ortaya çıkmıştır.



Şekil 1. Farklı eikosanoid biyosentez inhibitörlerinin Alman hamamböceği erginlerinin fungus sporlarına (*Beauveria*'nın 1512 nolu izolatı) karşı oluşturduğu nodülasyon reaksiyonundaki etkisi.



Şekil 2. Farklı eikosanoid biyosentez inhibitörlerinin Alman hamamböceği erginlerinin fungus sporlarına (*Metarhizium*'un S8-2 nolu izolatu) karşı oluşturduğu nodülasyon reaksiyonundaki etkisi.

Çalışmada, sonuçlar eikosanoidlerin, Alman hamamböceği erginlerinde fungal enfeksiyonlara tepki olarak nodül oluşumuna aracılık ettiği hipotezini desteklemiştir. Altı farklı eikosanoid biyosentez inhibitörü, kontrol uygulamalarına kıyasla nodülasyonu önemli ölçüde azaltmıştır. Benzer olarak Tunaz, (2009) yaptığı çalışmada, eikosanoidlerin süne erginlerinde bakteriyel enfeksiyona tepki olarak nodül oluşumuna aracılık ettiğini test etmiştir. Bizim yaptığımız bu çalışmada olduğu gibi o çalışmada da yedi farklı eikosanoid biyosentez inhibitörü (Dexamethasone, Indomethacin, Esculetin Phenidone Ibuprofen Piroxicam ve Naproxen), kontrol uygulamalarına kıyasla nodülasyonu önemli ölçüde azaltmıştır. Diğer yandan Tunaz ve ark., (2008) yaptıkları çalışmada yine eikosanoidlerin patates böceği larvalarında fungal (*Beauveria bassiana* HRI-215 izolatu) enfeksiyona tepki olarak nodül oluşumuna aracılık edip etmediğini test ettiklerinde; kullandıkları yedi farklı eikosanoid biyosentez inhibitöründen (Dexamethasone, Indomethacin, Esculetin Phenidone Ibuprofen Piroxicam ve Naproxen) sadece Phenidone inhibitörü kontrol uygulamalarına kıyasla larvalarda nodül sayısını önemli ölçüde azaltmıştır. Bu çalışma gösteriyor ki eikosanoid biyosentez inhibitörlerinin nodül oluşumunu engellemesi böcek türünden böcek türüne farklılık arz edebiliyor. Bu çalışmada

kullandığımız altı farklı eikosanoid biyosentez inhibitörü etkisini ayrıntılı olarak incelersek; Alman hamamböceğindeki eikosanoid sentezini inhibe etmesi için bu çalışmada kullanılan kimyasallar eikosanoid biyosentez yolundaki farklı enzimleri inhibe etmektedir. İnhibitörlerden dexamethason biyosentez yolundaki fosfolipaz A₂ enzimini; yine inhibitörlerden naproxen, indomethacin, ibuprofen biyosentez yolundaki siklogenaz (cyclooxygenase) enzimini; inhibitörlerden esculetin biyosentez yolundaki lipoksinaz (lipoxigenase) enzimini; inhibitörlerden phenidone biyosentez yolundaki hem siklogenaz hem de lipoksigenaz enzimini inhibe etmektedir (Stanley, 2000). Bu bilgilerden yola çıkarak hem siklogenaz hem de lipoksigenaz sentez yolu bu böceklerin bağışıklıklarında eikosanoidlerin biyokimyasal etkisini ortaya koymaktadır.

Ayrıca bu çalışma böcek patolojisi ve dolayısıyla mikrobiyal mücadele ile son zamanlarda ilişkilendirilmiş olan eikosanoidlerin inhibe edilmesinin böcek bağışıklık sistemini baskı altına alarak özellikle entomopatojen fungus uygulamaları sonucundaki biyolojik etkinliğin hızlanmasına ve ölüm oranlarının yükselmesine neden olabileceğini ortaya koymuştur. Eikosanoid inhibitörleri, entomopatojen fungus izolatları (*Beauveria*'nın 6646 nolu izolatu ve *Metarhizium*'un 3293) birlikte Alman hamamböceği

erginlerine uygulandığında böceklerde hücrel bağışıklıklardan biri olan nodül oluşumuna neden olduğu görülmüş ve buradan yola çıkarak bu etmenler eikosanoid inhibitörleri ile beraber uygulanmıştır. Eikosanoid inhibitörlerinin fungus izolatları ile birlikte uygulanması eikosanoid inhibitörü uygulanmayan denemelerden daha yüksek oranda ölüm oranına sahip olabilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından 110O159 nolu proje olarak desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Dunn, P.E. 1986. Biochemical aspects of insect immunology. *Annu Rev Entomol*, 31: 321-339.
- Gillespie, J.P., Kanost, M.R., Trenczek, T. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*, 42: 611-643.
- Miller, J.S., Nguyen, T., Stanley-Samuels, D.W. 1994. Eicosanoids mediate insect nodulation responses to bacterial infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91: 12418-12422.
- Rosales, C. 2017. Cellular and Molecular Mechanisms of Insect Immunity. In: Shields, V.D.C. Ed. *Insect Physiology and Ecology*. InTeach Publication. CCBY. Pp. 179-212.
- Russell, V., Dunn, P.E. 1996. Antibacterial proteins in the midgut of *Manduca sexta* during metamorphosis. *Journal of Insect Physiology*, 42: 65-71.
- SAS Institute Inc. 1989. SAS/STAT[®] User's Guide, Version 6, 4th Ed., vol 2. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Satyavathi, V.V., Minz, A., Nagaraju, J. 2014. Nodulation: An unexplored cellular defense mechanism in insects. *Cellular Signalling*, 26: 1753-1763.
- Stanley, D.W. 2000. *Eicosanoids in Invertebrate Signal Transduction Systems*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Stanley, D.W., Kim, Y. 2014. Eicosanoid Signaling in Insects: from Discovery to Plant Protection. *Plant Sciences*, 33:20-63.
- Stanley, D.W., Miller, J.S. 2006. Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 119: 1-13.
- Tunaz, H. 2009. Eicosanoids act in nodulation reactions to bacteria *Serratia marcescens* in hemipteran pest, *Eurygaster integriceps* *Turkish Journal of Biology* 33: 301-309.
- Tunaz, H., Bengin, C., Er, M.K. 2008. Nodulation reaction to fungal infections in larvae of *Leptinotarsa decemlineata*(Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) mediated by eicosanoids. *Turkish Journal of Agricultural Forestry* 32: 11-18.
- Tunaz, H. 2006. Influence of Eicosanoids in nodulation reactions against bacteria, *Serratia marcescens* in larvae of *Leptinotarsa decemlineata*. *KSU Fen Mühendislik Dergisi*, 9:159-163.