

Borik Asit'in Farklı Gelişim Evrelerindeki *Drosophila melanogaster*'in Dış İskeleti Üzerine Etkisi

Eda GÜNEŞ¹, Durmuş SERT²

¹Necmettin Erbakan Üniversitesi Turizm Fakültesi Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü, Konya, ²Necmettin Erbakan Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Konya

✉: egunes@konya.edu.tr

ÖZET

Hedef olmayan organizmalar üzerinde daha az toksik etkiye sahip insektisit kullanımı, tarımsal zararlılarla mücadelede yaygınlaşmaktadır. Eklemli canlılarda kutikül adı verilen koruyucu bir dış iskelet bulunmaktadır. Çalışmamızda, *Drosophila melanogaster*'in larva, pupa ve ergin gelişimi boyunca dış iskelete Borik asit (BA)'in etkisini anlamak için tekstür analizi tekniği kullanılmıştır. Pup ve larva periyodunun aksine, BA dozajı ne kadar yüksek olursa sertlik o kadar artmıştır. Bu çalışma ile, tek başına kullanımı uygun olmasa da tekstür analizi gibi yaklaşımların biyolojik örneklerin analizinde uygulanabilir ek bir yöntem olduğunu göstermiştir.

DOI:10.18016/ksudobil.309374

Makale Tarihçesi

Geliş : 27.04.2017

Kabul : 29.05.2017

Anahtar Kelimeler

Borik asit,
tekstür,
Drosophila melanogaster,
gelişim

Araştırma Makalesi

The Effect of Boric Acid on The External Skeleton of *Drosophila melanogaster* at Different Developmental Stages

ABSTRACT

The use of insecticides with less toxic effect on non-target organisms are widely used to combat agricultural pests. Arthropods have a protective exoskeleton called cuticle. In our study, a texture analysis technique was used to identify the effect of Boric acid (BA) during development on the larval, pupal and adult exoskeleton of *Drosophila melanogaster*. The higher the dosage of the BA, the stiffness increased so much unlike the pupa and larval period. This study has shown that such as textural analysis approaches are an additional method for analyzing biological samples, although not suitable for use alone.

Article History

Received : 27.04.2017

Accepted : 29.05.2017

Keywords

Boric acid,
Texture,
Drosophila melanogaster,
Development

Research Article

To Cited : Güneş E, Sert D 2018. Borik Asit'in Farklı Gelişim Evrelerindeki *Drosophila melanogaster*'in Dış İskeleti Üzerine Etkisi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 21(2):126-130, DOI:10.18016/ksudobil.309374.

GİRİŞ

Omurgalı canlılarda anatomik duruşu sağlayan, hareket sistemi elemanı olarak bulunan ve çeşitli görevleri olan "iç iskelet" yerine omurgasız canlılardan eklemli canlılarda; şekil veren, su kaybını önleyen sert ve koruyucu özellikte bir "dış iskelet" bulunmaktadır. Bu yapı epidermal hücreler tarafından üretilen kutikula (ekstra selüler sıvıda lipit ve %25-60 nitrojenli polisakkarit kitin içeren), hipodermis ve asal zardan oluşmaktadır (Moussian ve ark., 2005). Epidermis ve iç tübüler organlar böceğin epitel bütünlüğünü sağlayarak, çeşitli patojen ve toksin temasını önlemektedir. Kutikula vücudu ve iç organları örterek büyümenin kontrolü, yara iyileşmesi ve çevresel koruma gibi önemli rolleri üstlenmektedir (Petkau ve ark., 2012). Özellikle holometabol böcekler

yaşam döngülerine göre dış iskeletlerini değiştirmekte, büyüme ve morfogenezis kitine bağlı gerçekleşmektedir (Merzendorfer ve Zimoch, 2003). Her ne kadar gelişim esnasında farklı dokularda aralıksız devam eden kitin sentezi ve yıkımı kontrol mekanizmaları ile düzenlense de; çeşitli kimyasallar böceklerde kitin yapısının bozulmasına, epitel bütünlüğünü etkileyerek iskeletin düzensizliğine, ve kistlerin oluşmasına neden olabilmektedir (Tonning ve ark., 2005). Kitin sentaz tarafından üretilen kitinin azalması böceklerde ölümcül etki yaptığı gibi deri değiştirme kusurlarına da sebep olduğu, gelişimsel süreci etkilediği bilinmektedir (Gangishetti ve ark., 2009; Petkau ve ark., 2012). Nikkomycin gibi kimyasallar böceğin ebriyo ve larval evreden itibaren kitin dokusunda mutasyona sebep olmaktadır (Cohen,

1987; Moussian ve ark., 2005; Tønning ve ark., 2005). Dolayısıyla diflubenzuron ve lufenuron (10-200 ppm) gibi kitin sentezini inhibe eden insektisitler morfolojik, histolojik, biyokimyasal ve moleküler mekanizmaları açıklanarak zirai mücadelede kullanılmaktadır (Gangishetti ve ark., 2009)

Borik asit (BA) düşük miktarda kullanımı memeliler ve böceklerde toksisitesi az olduğu bilinen bir bor türü olup (Weir ve Fisher, 1972; Heindel ve ark., 1997; EFSA, 2004) zirai amaçlarla kullanılabilirliği önerilmektedir (Güneş ve Büyükgüzel, 2017). Son zamanlarda *Arabidopsis*, *Ciona*, *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* Maupas, Fare, Platynereis ve zebra balığı gibi biyolojik örneklerde çeşitli niceliksel ölçümler (görüntülenme ve çeşitli hesaplama yöntemleri) kullanılmakta, böylece morfolojik değişim ve farklılıklar daha kolay görülmektedir (Shlemov ve ark., 2014). *Drosophila melanogaster* Meigen'de morfolojik değişimlerin ve mutasyonların kolayca belirlenebilmesi kutikular sklerotizasyon (sertleşme) sürecinin anlaşılmasında (Wright, 1987; Hopkins ve Kramer, 1992; Sugumaran ve ark., 1992; Sugumaran, 1998; Moussian ve ark., 2005) model organizma olarak uygunluğunu göstermektedir. Bu amaçla çalışmada beslenme yoluyla alınan farklı konsantrasyonlarda BA'in *D. melanogaster*'in gelişim periyodunda dış iskeletindeki sertliği nasıl etkilediği tekstür analizi ile belirlenmiştir.

MATERYAL ve METOT

Örneklerin Hazırlanması

D. melanogaster (Wild type, W¹¹¹⁸) 250 cc'lik şişelerde (her birinde 50 adet olacak şekilde) yapay diyet ile beslenerek (25°C, % 60 nem, 12 s aydınlık/karanlık fotoperiyotta) kültüre alınmıştır (Rogina ve ark., 2000; Lesch ve ark., 2007). Yeni ergin hale gelen bireyler (6erkek:18dişi) olgunlaşmaları, çiftleşmeleri ve yumurta bırakmaları için yeni besin bulunan şişelere alınmıştır. Şişelerden 8 saat sonra *D. melanogaster* yumurtaları toplamak için uzaklaştırılmış, yumurtadan yeni çıkan larvalar (her bir şişe için 80 adet) mikroskop altında ince uçlu fırça yardımı ile yeni deney şişelerine aktarılmıştır (Kaya ve ark., 2000; Güneş, 2015). Böcek kültürü için kullanılan besinlere kontrol grubu hariç, farklı konsantrasyonlarda borik asit (10-300 mg/L) eklenerek deney düzeneği oluşturulmuştur. BA ve *D. melanogaster* ile yapılan önceki çalışmalar temel alınarak denenecek BA konsantrasyon aralığı belirlenmiştir (Güneş, 2013; Güneş ve ark., 2015). Hazırlanan konsantrasyonlar suda çözülerek besine donmadan önce eklenmiştir (Güneş, 2015). Belirlenen BA konsantrasyonları ile beslenen larvalar (üçüncü evre/108 saalık) ve puplar (130 saatlik) toplanarak

tekstür analizi gerçekleştirilmiştir (Fontaine ve ark., 2009; Güneş ve ark., 2015). Pupadan çıkan erginler (üç günlük dişi ve erkek) isehafif eterle bayıltılarak (eter buharına maruz bırakılarak: Çalışkan ve Yavuz Kocaman, 2002; Altun, 2007) diseksiyon mikroskobu altında cinsiyet ve fenotiplerine göre ayrımları yapılarak (Sarıkaya ve Solak, 2003) zaman geçirilmeden tekstür analizi yapılmıştır.

Tekstür profil analizi (TPA)

Toplanan örnekler, TA-XT-plus tekstür analiz cihazı (Texture Analyzer TAXT2İ) kullanılarak Tekstür profil analizi (TPA) yapılmıştır. TPA için 5 mm çapında düz tabanlı (penetration probe) prob kullanılmıştır. Sertlik birinci sıkıştırımda uygulanan maksimum kuvvet olarak yaklaşık 2 mg yükleme ağırlığı ile 0,1 mm mesafe olarak belirlenmiştir.

Verilerin Değerlendirilmesi

Örneklere ilişkin analiz sonuçlarında uygulamalar arasındaki farklılığın saptanması amacıyla Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi (Düzyüney ve ark., 1987), homojen ve normal dağılım gösteren grupların ortalamaları arasındaki farklılığın belirlenmesinde (LSD testi) SPSS.17 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca her konsantrasyon için larva-pup-ergin evreleri arasındaki farkları tespit edilmesinde "Kruskal-Wallis testi" kullanılmıştır. Deneyler dört tekerrür halinde gerçekleştirilmiş, ortalamaların önemi 0.05 olasılık seviyesinde tablo ile gösterilmiştir (SPSS, 1997; Güneş, 2013).

BULGULAR

Kontrol grubu ve BA ile beslenen larvalar karşılaştırıldığında; artan BA konsantrasyonuna bağlı olarak sertliğin arttığı; fakat en yüksek konsantrasyonla beslenen larvada kontrole kıyasla sertliğin giderek azaldığı görülmektedir. Böceğin pup evreleri birbirleri ile karşılaştırıldığında uygulanan BA miktarı fazlalaştıkça sertlik azalmaktadır. Erkek ve dişi bireylerde ise pup evresinde gözlenenin aksi bir durum söz konusudur (Çizelge 1).

Konsantrasyonlar kendi içinde karşılaştırıldığında; dış iskeletin en sert olduğu zaman pup evresi olduğu görülmektedir. En düşük konsantrasyonda üçüncü larval evre, 100 mg/L BA uygulamasında larva ve pup, 200 mg/L BA uygulamasında larva, ve en yüksek konsantrasyon olan 300 mg/L BA uygulamasında ise dişi ve erkek bireylerin en sert olduğu görülmektedir. Gruplar kendi içinde değerlendirilirken sertliği az olarak değerlendirilen evreler arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p < 0,05$).

Çizelge 1. Borik asitin farklı konsantrasyonlarını içeren yapay besinler ile yetiştirilen *D. melanogaster*'in farklı gelişim evrelerinde dış iskeletin sertlik derecesi (gr).

Borik asit (mg/L)	3. Evre Larva (Ort* ± S.H)† #	Pup (Ort* ± S.H)† #	Erkek rt* ± S.H)† #	Dişi (Ort*± S.H)†#
0,00§	7,89 ± 0,03aA	15,24 ± 0,35bB	8,66 ± 0,01aA	8,27 ± 0,04aA
10	15,70 ± 0,07bB	9,34 ± 0,01aA	9,96 ± 0,35aA	8,81 ± 0,11aA
100	16,47 ± 1,06bB	15,55 ± 0,04bB	8,58 ± 0,04aA	8,43 ± 0,01aA
200	12,10 ± 0,04bB	10,49 ± 0,07abA	10,49 ± 0,03abA	9,49 ± 0,14aA
300	5,59 ± 0,16cA	8,43 ± 1,06aB	12,48 ± 0,71bC	12,53 ± 3,54bC

*Dört tekrarın ortalaması, her bir tekrar için 20 böcek kullanıldı.

†Aynı sütunda aynı harfi içeren değerler birbirinden farklı değildir, P > 0,05 (LSD Testi)

#Aynı satırda aynı büyük harfi içeren değerler birbirinden farklı değildir, P > 0,05 (Kruskal-Wallis testi)

§Kontrol besini (Borik asit içermeyen)

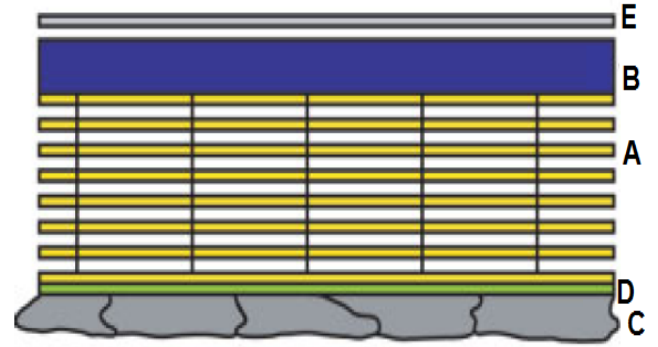
TARTIŞMA

Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda BA almış *D. melanogaster* ile gerçekleştirilen deneylerde dış iskeletin sertliği ölçülerek böcekte meydana gelen değişimler gözlenmiştir.

Eklembacaklılarda, kutikular proteinler ve katekolaminlerle ilişkili olan kitin, farklı fiziksel özelliklere sahip kutikullerin tanımlanmasına neden olmaktadır (Moussian ve ark., 2005). Kutikulun mekanik özelliklerini belirleyen proteinlerle ilişkili ve güçlü bir iskelet malzemesi olan kitin; dış ve iç kutikul'da bulunmaktadır (Şekil 1; Andersen, 1979; Kramer ve ark., 1995; Merzendorfer ve Zimoch, 2003; Payre, 2004). Dış iskelet kitin sayesinde sertlik, esneklik ve elastik özellik göstermektedir (Nemtsev ve ark., 2001; Majtan ve ark., 2007). Bir ürünün; mekanik (sertlik, yumuşaklık, yapışkanlık, gevreklik, viskozite, elastiklik, bağlılık), geometrik (boyut, şekil), bileşim (yağlılık, nem içeriği gibi) gibi özelliklerini kapsayan terim "tekstür" olarak bilinmektedir. Böceğin gelişim evrelerine bakıldığında pupal dönemde sertliğin en fazla olduğu görülmekte iken, uygulanan BA ile sertliğin değiştiği gözlenmektedir. *D. melanogaster* ile yapılan bir çalışmada pupal ve ergin döneminde kutikul sertliğinin larval evreden fazla olması çalışmamızla benzerlik göstermektedir (Kohane ve ark., 2003). Son larva evresinde ekdizon varlığı ile kitin sentezinin inhibe edilerek sertliğin azaldığı, ergin evrede ise arttığı (Apple ve Fristrom, 1991; Hiruma ve ark., 1991; Moussian ve ark., 2005) bilinmektedir. Yapılan benzer çalışma sonuçlarına bağlı olarak artan BA konsantrasyonu ile böcekte sertliğin artmasına rağmen, en yüksek konsantrasyon olan 300 mg/L'de larval ve pupal evrede gevşemenin olduğu düşünülmektedir.

Bazı çalışmalarda BA'in orta barsak epitel dokusunda oksidatif hasara sebep olabileceği bildirilmektedir (Habes ve ark., 2006). Çalışmamızda besinsel yolla alınan BA miktarındaki artışın böceğin orta bağırsak epitelinde hasar oluşturabileceği gibi, bağışıklık

yanıtına bağlı olarak (Kılınçer ve Güz, 2010) ve oksidan-antioksidan kapasitedeki değişimler (Güneş ve Büyükgüzel, 2017) ile böcekte epidermal farklılık oluşabileceği düşünülmektedir. Fakat gelişim evrelerindeki bu epidermal farklılığın net olarak ortaya çıkarılması için etkin hormonların belirlenerek kitin sentezinde görev alan gen (CHS1: dış iskelette, CHS2: orta barsakta; Lucero ve ark., 2002; Merzendorfer ve Zimoch, 2003; Zhang ve Zhu, 2013) ve yolların (aktif eden/durduran) daha ayrıntılı çalışmalarla açıklanmasına ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil 1. İskelet bütünlüğünden sorumlu olan epidermis ve kutikul morfolojisinde kitin. A. Kitin tabakaları arasında prokutikul, B. Epikutikul, C. Epidermis, D. Adezyon bölgesi, E. Dış örtü (Moussian ve ark., 2005).

Özellikle toksin ve patojen saldırılarına karşı kitinin koruma görevi olduğu düşünülürse (Tellam, 1996) ergin bireylerde direncin gelişerek sertliğin artış sebebi anlaşılabilir. *Drosophila*'da kitin sentaz-1'in yokluğu lethal bir mutasyona sebep olmakta (Ostrowski ve ark., 2002) pigmentasyon sürecini de etkilemektedir. Çalışmamızda 300 mg/L'den fazla BA alan böceğin pupasyona geçememesinin kitin sentezine etki ederek yaşama gelişimi olumsuz etkileme olasılığından kaynaklanmış olabilir.

SONUÇ

Böceklerde büyüme ve gelişimin kontrolü, sürekli sentezlenip indirgenen kitinli yapıların yeniden şekillendirme kabiliyetine bağlıdır (Merzendorfer ve Zimoch, 2003). Zirai açıdan dış iskelette meydana gelebilecek farklılıklar böceğin yaşama gelişimi için önemli olduğu gibi, hedef olmayan canlılarda neslin korunması yada hedef canlıda mücadele yönteminin belirlenmesinde önemlidir. Bu yüzden pestisit olarak kullanılan kimyasalların epidermal hücrelerde fenotipik etkilerinin aydınlatılmasında biyokimyasal ve morfolojik analizlerin yanı sıra tekstür analizi gibi çeşitli tekniklerin kullanılması, böcek iskeletinde meydana gelen değişimlerin aydınlatılmasında yeni bir teknik olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir. Böylece model organizmalarda gerçekleştirilecek yaklaşımlar ile özellikle erken klinik testler (faz öncesi çalışmalar) için yeni algoritmalar, tekstür analizi gibi yöntemler ile kombine sistemlerin kullanılarak geliştirilebileceği ifade edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Andersen SO 1979. Biochemistry of the Insect Cuticle. Annual Review of Entomology, 24: 29-61.
- Apple RT, Fristrom JW 1991. 20-Hydroxyecdysone is Required for, and Negatively Regulates, Transcription of *Drosophila* Pupal Cuticle Protein Genes. Developmental Biology, 146: 569-582.
- Altun D 2007. *Usnea longissima* Ach. Likenin *Drosophila melanogaster*'in çeşitli gelişim parametreleri ve ömür uzunluğu üzerine etkileri. Atatürk Üniversitesi Fen Bil. Ens., Biyoloji ABD, Yüksek Lisans Tezi, 27-28.
- Cohen E 1987. Chitin Biochemistry: Synthesis and Inhibition. Annual Review of Entomology, 32: 71-93.
- Çalışkan M, Yavuz Kocaman A 2002. *Drosophila* Genetiği. Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Genetik Laboratuvar Kılavuzu, Hatay.
- Düzgüneş O, Kesici T, Kavuncu O, Gürbüz F 1987. Araştırma ve Deneme Metotları. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, 381s.
- EFSA 2004. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a Request from the Commission Related to the Tolerable Upper Intake Level of Boron (Sodium Borate And Boric Acid) (Request N_ EFSAQ- 2003-018). European Food Safety Authority Journal, 80: 1-22.
- Fontaine EI, Zabala F, Dickinson MH, Burdick JW 2009. Wing and Body Motion During Flight Initiation in *Drosophila* Revealed by Automated Visual Tracking. The Journal of Experimental Biology, 212: 1307-1323.
- Gangishetti U, Breitenbach S, Zander M, Saheb SK, Müller U, Schwarz H, Moussian B 2009. Effects of

- Benzoylphenylurea on Chitin Synthesis and Orientation in the Cuticle of the *Drosophila* Larva. European Journal of Cell Biology, 88:167-180.
- Güneş E, Büyükgüzel E 2017. Oxidative Effects of Boric Acid on Different Developmental Stages of *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera: Drosophilidae). Türkiye Entomoloji Derneği Dergisi, 41(1): 3-15.
- Güneş E, Şimşek Sezer EN, Bozkurt M, Uysal M 2015. The Determination of Boric Acid Effects on Different Developmental Stages of *Drosophila melanogaster* by Sds-Page. Journal of Biochemistry International, 1(1): 1-5.
- Güneş E 2015. *Drosophila melanogaster*'de Yulaf Unu (*Avena sativa* L.)'nin Total Oksidatif Stres Üzerinde Etkisi. Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi, 6(2): 134-140.
- Güneş E 2013. Borik Asit'in *Drosophila melanogaster*'in Meigen (Diptera: Drosophilidae) Bazı Biyolojik Özellikleri ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi. BEÜ Fen Bil. Ens., Biyoloji ABD, Doktora Tezi.
- Habes D, Morakchi S, Aribi N, Farine JP, Soltani N 2006. Boric Acid Toxicity to the *German cockroach*, *Blattella germanica*: Alterations in Midgut Structure, and Acetylcholinesterase and Glutathione S-transferase Activity. Pesticide Biochemistry and Physiology, 84: 17-24.
- Heindel J, Fail P, George J, Grizzle T 1997. Reproduction Toxicology of Boric Acid. Environmental Health Perspectives, 105: 275-276.
- Hiruma K, Hardie J, Riddiford LM 1991. Hormonal Regulation of Epidermal Metamorphosis in Vitro: Control of Expression of a Larval Specific Cuticle Gene. Developmental Biology, 144: 369-378.
- Hopkins TL, Kramer KJ 1992. Insect Cuticle Sclerotization. Annual Review of Entomology, 37:273-302.
- Kaya B, Yanıkoglu A, Creus A, Marcos R 2000. The Use of The *Drosophila* Wing Spot Test in The Genotoxicity Testing of Different Herbicides. Environmental and Molecular Mutagenesis, 36: 40-46.
- Kılınçer N, Güz N 2010. *Ephestia kuehniella*'da Transferin Geninin Moleküler Karakterizasyonu ve Savunma Reaksiyonlarındaki Rolü Üzerinde Araştırmalar. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu, Proje No: 08B4347005.
- Kramer KJ, Hopkins TL, Schaefer J 1995. Applications of Solids NMR to the Analysis of Insect Sclerotized Structures. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 25: 1067-1080.
- Kohane M, Daugela A, Kutomi H, Charlson L, Wyrobek A, Wyrobek J 2003. Nanoscale in Vivo Evaluation of the Stiffness of *Drosophila melanogaster* Integument During Development.

- Journal of Biomedical materials research, 66A(3): 633-642.
- Lesch C, Goto A, Lindgren M, Bidla G, Dushay MS, Theopold U 2007. A Role for Hemolymph in Coagulation and Immunity in *Drosophila melanogaster*. *Developmental and Comparative Immunology*, 31: 1255-1263.
- Lucero HA, Kuranda MJ, Bulik DA 2002. A non radioactive, high through put assay for chitinsynthase activity. *Analytical Biochemistry*, 305: 97-105.
- Majtan J, Bilikova K, Markovič O, Grof J, Kogan G, Simuth J 2007. Isolation and Characterization of Chitin from *Bumble bee* (*Bombus terrestris*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 40 : 237-241.
- Merzendorfer H, Zimoch L 2003. Chitin Metabolism in Insects: Structure, Function and Regulation of Chitin Synthases and Chitinases. *Journal of Experimental Biology*, 206: 4393-4412.
- Moussian B, Schwarz H, Bartoszewski S, Nüsslein-Volhard C 2005. Involvement of Chitin in Exoskeleton Morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Morphology*, 264(1): 117-130.
- Nemtsev S, Zueva OY, Khismatullin RG, Khismatullin MR, Varlamov VP 2001. Bees As Potential Source of Chitosan. *Proceedings of the 37th International Apicultural Congress, APIMONDIA*.
- Ostrowski S, Dierick HA, Bejsovec A 2002. Genetic Control of Cuticle Formation During Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 161:171-182.
- Payre F 2004. Genetic Control of Epidermis Differentiation in *Drosophila*. *International Journal of Developmental Biology*, 48: 207-215.
- Petkau G, Wingen C, Jussen LC, Radtke T, Behr M 2012. Obstructor-a is Required for Epithelial Extracellular Matrix Dynamics, Exoskeleton Function, and Tubulogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 287(25): 21396-21405.
- Rogina B, Reenan RA, Nilsen SP, Helfand SL 2000. Extended Life-Span Conferred by Cotransporter Gene Mutations in *Drosophila*. *Biogerontology Science*, 290:2137-2140.
- Sarıkaya R, Solak K 2003. Benzoikasıit'in *Drosophila melanogaster*'de Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Genotoksisitesinin Araştırılması. *Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 19(32).
- Shlemov A, Golyandina N, Holloway D, Spirov A 2014. Shaped Singular Spectrum Analysis for Quantifying Gene Expression, with Application to the Early *Drosophila* Embryo. *Bio Med Research International*, 1-14.
- Sugumaran M, Giglio L, Kundzicz H, Saul S, Semensi V 1992. Studies on the Enzymes Involved in Puparial Cuticle Sclerotization in *Drosophila melanogaster*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 19:271-283.
- Sugumaran M 1998. Unified Mechanism for Sclerotization of Insect Cuticle. In: Evans PD, editor. *Advances in insect physiology*, Academic Press, New York, 229-334s.
- Tellam RL 1996. The Peritrophic Matrix (Biology of the Insect Midgut: Ed. Lehane MJ, Billingsley PF) Cambridge: Chapman and Hall, 86-114.
- Tønning A, Hemphala J, Tang E, Nannmark U, Samakovlis C, Uv A 2005. A Transient Luminal Chitinous Matrix is Required to Model Epithelial Tube Diameter in the *Drosophila* Trachea. *Developmental Cell*, 9: 423-430.
- Weir RJJ, Fisher RS 1972. Toxicologic Studies on Borax and Boric Acid. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 23: 351-364.
- Wright TR 1987. The Genetics of Biogenic Amine Metabolism, Sclerotization, and Melanization in *Drosophila melanogaster*. *Advances in Genetics*, 24:127-222.
- Zhang X, Zhu KY 2013. Biochemical characterization of chitinsynthase activity and inhibition in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Sci.*, 20 (2): 158-166.