

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KURU İNCİR KURDU, *EPHESTIA (CADRA) CAUTELLA*'NİN BAKTERİYAL
MÜCADELE ETMENİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog İslam YILDIZ

MART 2013
TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KURU İNCİR KURDU, *EPHESTIA (CADRA) CAUTELLA*'NİN BAKTERİYAL
MÜCADELE ETMENİNİN ARAŞTIRILMASI**

Biyolog İslam YILDIZ

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 12.02.2013
Tezin Savunma Tarihi : 01.03.2013**

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Kazım SEZEN

Trabzon 2013

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalında
İslam YILDIZ tarafından hazırlanan

**KURU İNCİR KURDU, *EPHESTIA (CADRA) CAUTELLA*'NİN BAKTERİYAL
MÜCADELE ETMENİNİN ARAŞTIRILMASI**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 12 / 02 / 2013 gün ve 1493 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Doç. Dr. Kazım SEZEN

Üye :Doç. Dr. İsmail DEMİR

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Kuru İncir Kurdu, *Ephestia (Cadra) cautella*’nın Bakteriyal Mücadele Etmeninin Araştırılması” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen hocam sayın Doç. Dr. Kazım SEZEN’e, tezin değerlendirilmesi ve geliştirilmesinde yardımcı olan değerli jüri üyeleri hocalarıma, laboratuvarında maddi manevi imkânlarını esirgemeyen hocam sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, laboratuvar çalışmalarım sırasında göstermiş oldukları ilgiden ötürü Doç. Dr. İsmail DEMİR, Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU ve beni yalnız bırakmayan ve hiçbir zaman benden yardımlarını esirgemeyen tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim. Bu tezin hazırlanması sırasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen fedakâr aileme minnet ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca, tez çalışmam süresince laboratuvar imkânlarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Asım KADIOĞLU’na da teşekkür ederim.

İslam YILDIZ
Trabzon 2013

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Kuru İncir Kurdu, *Ephestia (Cadra) cautella*’nın Bakteriyal Mücadele Etmeninin Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Kazım SEZEN’in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

12/02/2013

İslam YILDIZ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Önemli Depolanabilir Tarım Ürünleri ve Türkiye Ekonomisindeki Yeri.....	5
1.3. Ülkemizde Karşılaşılan Depolanmış Ürün Zararlıları	7
1.4. Zararlılarla Mücadele Yöntemleri.....	8
1.4.1. Kimyasal Mücadele.....	9
1.4.1.1. Kimyasalların Çevreye Olan Etkileri	11
1.4.1.2. İnsektisitlerin İnsanlar Üzerine Olan Etkileri.....	13
1.4.2. Biyolojik Mücadele	15
1.4.2.1. Biyolojik Mücadelede Kullanılan Etkin Gruplar	18
1.4.2.1.1. Predatörler	18
1.4.2.1.2. Parazitler.....	18
1.4.2.1.3. Mikroorganizmalar	19
1.4.2.1.3.1. Bakterilerin Mikrobiyal Mücadelede Kullanımı	22
1.4.2.1.3.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'lerin Genel Özellikleri.....	22
1.4.2.1.3.2.1. İnsektisidal Kristal Proteinin Hedef Böceklerdeki Etki Mekanizması.....	24
1.4.2.1.3.3. Böcek Populasyonlarının <i>Bacillus thuringiensis</i> 'e Dirençliliği	25
1.4.2.1.3.4. <i>Bacillus thuringiensis</i> Suşlarının Biyoteknolojisi	26
1.5. Kuru İncir Kurdu'nun (<i>Ephesia (Cadra) cautella</i> , Walker, Lep.: Pyralidae) Sistematikteki Yeri	28
1.5.1. Tanımı ve Yaşayışı.....	28
1.5.1.1. Ergin	28

1.5.1.2.	Yumurta.....	29
1.5.1.3.	Larva.....	29
1.5.1.4.	Pupa.....	30
1.5.2.	<i>Ephestia cautella</i> 'nın Hayat Evresi.....	30
1.5.3.	Zarar Şekli, Ekonomik Önemi ve Yayılışı.....	31
1.5.4.	<i>Ephestia cautella</i> ile Mücadele Yöntemleri.....	32
1.6.	Çalışmanın Amacı.....	38
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	39
2.1.	<i>Ephestia cautella</i> 'nın Toplanması.....	39
2.2.	Bakteri İzolasyonu ve Karakterizasyonu.....	39
2.2.1.	Bakteri İzolasyonu.....	39
2.2.2.	Saf Kültürlerin Hazırlanması ve Stoklanması.....	40
2.2.3.	İzolatların Boyanma Özellikleri.....	40
2.2.3.1.	Gram Boyama.....	40
2.2.3.2.	Endospor Boyama.....	40
2.2.4.	İzolatların Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	41
2.2.4.1.	İzolatların Optimum Büyüme Sıcaklıklarının Belirlenmesi.....	41
2.2.4.2.	İzolatların Büyüyebildiği pH Aralıklarının Belirlenmesi.....	41
2.2.4.3.	İzolatların NaCl Toleranslarının Belirlenmesi.....	41
2.2.5.	İzolatların Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	42
2.2.5.1.	Nişasta Hidroliz Testi.....	42
2.2.5.2.	Katalaz Testi.....	42
2.2.5.3.	Oksidaz Testi.....	42
2.2.5.4.	Metil Kırmızısı Testi.....	42
2.2.5.5.	Üre Hidroliz Testi.....	43
2.2.5.6.	İndol Oluşumu Testi.....	43
2.2.6.	API 20 E Panel Test Sistemi.....	44
2.2.7.	API 50 CH Panel Test Sistemi.....	45
2.2.8.	İzolatların MacConkey Agar (MCA)'da Büyütülmesi.....	46
2.2.9.	API of Medium Testi.....	47
2.2.10.	Hareketlilik Testi.....	47
2.2.11.	İzolatların Moleküler Karakterizasyonları.....	47
2.2.11.1.	Genomik DNA İzolasyonu.....	47
2.2.11.2.	16S rDNA Geninin PCR ile Çoğaltılması.....	48

2.2.11.3.	16S rDNA Geninin Baz Dizisinin Belirlenmesi ve Gen Bankasındaki Sıralarla Karşılaştırılması	49
2.2.11.4.	Bakteriyal İzolatların <i>cry</i> Gen İçeriğinin Belirlenmesi	49
2.3.	İnsektisidal Aktivite Testleri	49
2.3.1.	Böceklerin Laboratuvar Kültürü	49
2.3.2.	Örneklerin Hazırlanışı	50
2.3.2.1.	Bakteriyal İzolatların Hazırlanışı	50
2.3.3.	<i>Ephestia cautella</i> 'dan Elde Edilen İzolatların İnsektisidal Aktivitesi	51
3.	BULGULAR.....	52
3.1.	<i>Ephestia cautella</i> Larvalarından Bakteri İzolasyonu	52
3.2.	İzolatların Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Tür Tayinlerinin Yapılması.....	53
3.2.1.	İzolatların Morfolojik Özellikleri.....	53
3.2.2.	İzolatların Fizyolojik Özellikleri.....	54
3.2.3.	Bakteriyal İzolatların Biyokimyasal ve Metabolik Özellikleri	55
3.2.3.1.	API 20 E ve API 50 CH Panel Test Sistemiyle Tespit Edilen Özellikler.....	56
3.2.4.	İzolatların Moleküler Karakterizasyonu.....	60
3.2.4.1.	İzolatların 16S rDNA Gen Sıraları.....	60
3.2.4.1.	Bakteriyal İzolatların <i>cry</i> Gen İçerikleri	64
3.3.	İnsektisidal Aktivite Çalışmalar	66
4.	TARTIŞMA	68
5.	SONUÇLAR.....	73
6.	ÖNERİLER.....	74
7.	KAYNAKLAR	75
8.	EKLER	87

ÖZGEÇMİŞ

ÖZET

KURU İNCİR KURDU, *EPHESTIA (CADRA) CAUTELLA*'NİN BAKTERİYAL
MÜCADELE ETMENİNİN ARAŞTIRILMASI

İslam YILDIZ

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Kazım SEZEN
2013, 86 Sayfa, 10 Sayfa Ek

Kuru incir kurdu, *Ephestia cautella* (Lepidoptera: Pyralidae), kurutulmuş meyvelerin ve diğer depolanabilir ürünlerin en önemli zararlılarından biridir. Kuru incir kurdu, ülkemizde ve tüm dünyada geniş yayılış gösteren polifag bir zararlıdır. Larvaları kuru incirin ağaç, sergi ve depo dönemlerinde ciddi zararlara neden olur. Zararlıyla mücadelede çeşitli kültürel, kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılmasına rağmen, zararlının etkisi halen önemli bir şekilde ülkemizde ve tüm dünyada devam etmektedir. Mikrobiyal etmenlerin zararlıyla mücadelede kullanılmasına yönelik yapılan bu çalışmada, ilk olarak zararlıdan 13 adet bakteriyal izolat elde edildi ve bu izolatların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler özellikleri belirlendi. Bu özelliklere göre *Ephestia cautella*'dan belirlenen izolatlar, *Serratia* sp. (Eca1, Eca3 ve Eca11), *Bacillus thuringiensis* (Eca2, Eca4, Eca6, Eca7, Eca8, Eca9, Eca10, Eca12 ve Eca13) ve *B. axarquensis* (Eca5) olarak tanımlandı. Bu izolatların insektisidal aktivitesi depolarda ciddi zararlara sebep olan Lepidoptera grubuna ait 3 böcek türüne karşı test edildi. Test sonuçlarına göre 3. instar *E. cautella* ve *Plodia interpunctella* larvaları üzerinde en yüksek insektisidal aktivite Eca9 nolu izolat tarafından sırasıyla % 57 ve % 100 oranıyla, 3. instar *E. kuehniella* larvaları üzerinde ise en yüksek etki Eca3 ve Eca10 nolu izolatlar tarafından % 100 oranıyla oluşturuldu. Bu sonuçlara göre Eca9, Eca3 ve Eca10 numaralı izolatların, lepidopteran depo zararlılarının kontrolü için potansiyel bir biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus thuringiensis*, Bakteriyal flora, *Ephestia cautella*, Mikrobiyal mücadele,

Master Thesis

SUMMARY

DETERMINATION OF BACTERIAL CONTROL AGENTS OF ALMOND MOTH,
EPHESTIA (CADRA) CAUTELLA

İslam YILDIZ

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Assoc. Prof. Kazım SEZEN
2013, 86 Pages, 10 Pages Appendix

Almond moth, *Ephestia cautella* (Lepidoptera: Pyralidae) is one of the most serious pests of dried fruits and other stored products. Almond moth is polyphagous pest which is widespread in all over the world and our country. Larvae of almond moth cause serious damages on tree, warehouse and threshing floor of drying fig. Although various cultural, chemical and biological methods are being used to control this pest, its damage still continuous effectively all over the world and our country. In order to find a significant microbial control agent against this pest, first of all, we determined 13 bacterial isolates and identified these isolates based on morphological, physiological, biochemical and molecular characteristics. According to these characteristics were identified as *Serratia* sp. (Eca1, Eca3 and Eca11), *Bacillus thuringiensis* (Eca2, Eca4, Eca6, Eca7, Eca8, Eca9, Eca10, Eca12, Eca13) and *Bacillus axarquensis* (Eca5). The insecticidal activities of these isolates were performed against three insect species from Lepidoptera group which cause serious damages in warehouses. The highest insecticidal activity is 57 % for Eca9 isolate on the 3th instar larvae of *E. cautella*, 100 % for Eca9 isolate on the 3th instar larvae of *Plodia interpunctella* and % 100 for Eca10 and Eca3 isolate on the 3th instar larvae of *E. kuehniella*. Results indicate that Eca9, Eca3 and Eca10 isolates may be valuable as potential biological control agents for the control of warehouse pests.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, Bacterial flora, *Ephestia cautella*, microbial control

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>Bacillus thuringiensis</i> bakterisinin spor ve kristallerinin elektron mikroskopik görünümü	23
Şekil 2. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in Cry toksininin hedef böceklerdeki mekanizması.....	25
Şekil 3. <i>Ephestia cautella</i> 'nın biyolojisi	30
Şekil 4. <i>Ephestia cautella</i> 'nın hayat evresi	31
Şekil 5. <i>Ephestia cautella</i> 'nın çeşitli zarar şekilleri	32
Şekil 6. Farklı izolatlara ait koloni görüntüleri.....	52
Şekil 7. Eca4 ve Eca5 numaralı izolatlara ait spor boyama.....	53
Şekil 8. Gram pozitif izolatların 16S rDNA dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı.....	63
Şekil 9. Gram negatif izolatların 16S rDNA dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı.....	64
Şekil 10. İzolatların <i>cry1</i> gen primeri kullanarak elde edilen PCR ürünleri	65
Şekil 11. İzolatların <i>cry2</i> gen primeri kullanarak elde edilen PCR ürünleri	65
Şekil 12. İzolatların <i>Ephestia cautella</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkisi	66
Şekil 13. İzolatların <i>Plodia interpunctella</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkisi	67
Şekil 14. İzolatların <i>Ephestia kuehniella</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkisi.....	67

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1. Yıllara göre ülkemiz kuru incir üretim ve ihracat miktarı ve ihracat geliri	5
Tablo 2. Yıllara göre ülkemiz tahıl üretimi	5
Tablo 3. Yıllara göre ülkemiz fındık üretim ve ihracat miktarı ile ihracat geliri	6
Tablo 4. Yıllara göre ülkemiz kuru üzüm üretim ve ihracat miktarı ile ihracat geliri	6
Tablo 5. Ülkemizde depolanmış ürünlerde sıklıkla karşılaşılan zararlı türler	7
Tablo 6. Kimyasal mücadele ile biyolojik mücadelenin karşılaştırılması.....	15
Tablo 7. Lepidopteraların kontrolü için ticari olarak kullanılan <i>B. thuringiensis</i> 'ler	26
Tablo 8. API 20 E panel sisteminin içerdiği testler.....	44
Tablo 9. API 50 CH panel sisteminin içerdiği testler	45
Tablo 10. İzolatların morfolojik özellikleri	54
Tablo 11. İzolatların fizyolojik özellikleri.....	55
Tablo 12. İzolatların klasik yöntemlerle belirlenen biyokimyasal özellikleri	56
Tablo 13. İzolatların API 20 E panel test sistemi ile belirlenen özellikleri.....	57
Tablo 14. İzolatların API 50 CH panel test sistemi ile belirlenen özellikleri.....	58
Tablo 15. İzolatların 16S rDNA sekanslarının gen bankasındaki sıralarla karşılaştırmaları.....	60

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADH	: Arginin dehidrolaz
AMY	: Amigdalın
ARA	: Arabinoz
bp	: Baz çifti
CIT	: Sitrat
CFU	: Koloni oluşturabilen birim
DDT	: Dikloro-difenil-trikloroetan
DNA	: Deoksiribonukleik asit
GEL	: Jelatin
GLU	: Glikoz
H ₂ S	: Hidrojen sülfür
ICP	: İnsektisidal kristal proteini
IND	: İndol
INO	: İnositol
LDC	: Lisin dekarboksilaz
MAN	: Mannitol
MEL	: Melibiose
MK (MR)	: Metil kırmızısı
NPV	: Nukleopolihedrovirüs
ODC	: Ornitin dekarboksilaz
PBS	: Fosfat buffer salin
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi
RHA	: Rhamnoz
RNA	: Ribonükleik asit
SAC	: Sukroz
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SOR	: Sorbitol
TDA	: Triptofan deaminaz
URE	: Üre
VP	: Voges proskauer
WHO	: Dünya sağlık örgütü

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Tarım, dünya nüfusunun yeteri kadar beslenebilmesi için çok önemli bir sektördür. Dünya nüfusunun artmasıyla kişi başına düşen tarım ürünü miktarı azalmış, bununla birlikte tarım sektörü önemini arttırmıştır. Hızla artan dünya nüfusunun yeterli ve dengeli beslenebileceği kaynakların sağlanması günümüzün önde gelen sorunlarından biridir. Açlık sorunu, dünyamızda ortaya çıkmasıyla, küresel bir felaket haline dönüşmüştür. Dolayısıyla, artan besin ihtiyacının karşılanması amacıyla tarımsal üretimde verimin ve kalitenin artırılması gerekmektedir. Bu nedenle, birim alandan elde edilen ürün miktarının artırılması birinci derecede önemli olmakla birlikte; ürünün üretimden tüketime kadar uygun bir şekilde korunması da büyük önem taşımaktadır. Tarımsal ürünlerin hasattan tüketimlerine kadar en az düzeyde kayıpla korunması bir zorunluluktur (Ferizli ve Emekçi, 2000a).

Türkiye, iklimi, yerşekilleri, toprak yapısı, sulama imkanları gibi özelliklerinden dolayı birçok tarım çeşidinin verimli ve kaliteli olarak üretilebilen bir ülke konumundadır. Bundan dolayı ekonomisinin büyük bir kısmını tarım gelirleri oluşturur. Fakat geçmiş yıllarda tarım alanlarında kendi ihtiyaçlarını karşılayabilen konumdayken şu anda önemli bir tarım ithalatçısı olmuş durumdadır. Bunun temel sebeplerinden biri azalan tarım alanlarında birim alana düşen ürün miktarının arttırılamamasıdır. Birim alandaki ürünün miktarının arttırılması için ise öncelikle ürünün zararlılara karşı korunması gerekmektedir.

Belli bir zamanda yetişen tarım ürünleri eski zamanlardan beri kurutulularak saklanmaktadır. Kurutulularak ürünün suyu belli oranda uzaklaştırılır ve çürümesi önlenir. Bunun yanı sıra suyu uzaklaştırılan ürünün lezzeti de artar ve daha çok tercih edilir. Fakat ürünün, üretimden tüketime kadar geçen sürede iyi korunması gerekmektedir. Bunun için hasat sonrası kurutulularak tüketime sunulan tarım ürünlerinin üretimden tüketime kadar en az düzeyde kayıpla korunması ve depolanması şarttır.

Ülkemiz tahıllar ve kurutulmuş meyve gibi ürünler bakımından dünya üretim ve ihracatında önemli bir yere sahiptir. İç tüketim ve dış satımda büyük öneme sahip olan bu ürünler depolanabilmektedir. Hasat sonrası depolanmış ürünlerde görülen zararlıları önemli düzeylerde nitel ve nicel açıdan zarar yapmaktadır. Ferizli ve Emekçi (2000a)'ye göre, tahıl ürünlerinde meydana gelen kayıp % 10 civarındadır.

Ege bölgesinde kuru incirde *Ephestia cautella*, *Plodia interpunctella* ve *Ephestia figuliella* tarafından meydana getirilen kayıp % 39-68 oranında değişmektedir. Karadeniz Bölgesinde fındık üzerinde de etkili olan bu zararlılar % 20 oranında zarar meydana getirmektedir. Bu zarar oranı bulaşma düzeyine göre daha da artabilmektedir. Ülkemiz iklim özellikleri ve üretim çeşitliliği nedeniyle çok sayıda depolanmış ürün zararlısının gelişmesine olanak vermektedir. Bu kapsamda depolanmış ürün zararlıları ile savaşım kaçınılmaz olmaktadır (Ferizli ve Emekçi 2000a). Depolanmış ürün zararlısı olan böcekler bulaştıkları üründe beslenerek doğrudan ve dolaylı şekilde zarar verebilmektedir. Depolanmış ürün zararlıları, bulaştıkları ürünlerde yoğun bir biçimde beslenmesi sonucu ağırlık, teknolojik değer ve tohumluk kayıplarına sebep olurlar. Bu kayıpların yanı sıra zararlıların gömlek kalıntıları, pislikleri ve salgıladıkları ağımsı maddeleri nedeniyle ürün nitelik kayıplarına uğrar. Yoğun bulaşmalarda üründe küflenme, kızışma ve kokuşmalar ortaya çıkabilmektedir. Bunlara ek olarak zararlılarla bulaşık ürünlerin tüketilmesi insan sağlığı yönünden de sakıncalar taşımaktadır (Boxall, 2001).

Bu süreçte son elli yıldır, tarımda kimyasal ilaçların kullanılması kesin çözüm olarak düşünülmüştür. Zararlılarla mücadele işlemleri çoğunlukla kimyasal mücadele ile özdeşleşmiştir. Ancak kimyasal savaşım ilaç kullanımı yaygınlaştıkça ortaya birçok sorunlar çıkmıştır. Zararlılarla mücadelede pestisitlerin yaygın olarak, aşırı dozda ve bilinçsiz kullanılışı, arzu edilmeyen yan etkilerinin oluşumunu kaçınılmaz hale getirmiştir. Bu nedenlerle de son zamanlarda kimyasal ilaçların çok az kullanıldığı veya hiç kullanılmadığı alternatif yöntemler üzerinde araştırmalara hız verilmiştir.

Farklı yöntemler de kullanılmasına rağmen, tüm dünyada olduğu gibi günümüzde ülkemizde de zararlı böceklerin mücadelesinde çeşitli kimyasal insektisitler hala etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Bu insektisitlerin ekolojik dengeyi bozarak doğal çevreye zarar vermesi, hedef organizmalar dışında yararlı böcekler üzerinde öldürücü etki göstermesi, insan sağlığını olumsuz etkilemesi gibi nedenlerle yasaklanmaya başlanmış ve hatta birçoğu da kullanımdan kaldırılmıştır. Bunlardan en önemli depo zararlılarına karşı kullanılan metil bromit Montreal Protokolü uyarınca 2004 yılında ülkemizde depolarda kullanımı yasaklanmıştır. Kimyasal insektisitlerin yerine diğer birçok zararlılarda olduğu gibi depolanmış ürünlerde zarar veren böceklerin mücadelesinde de alternatif yollar araştırılmaya başlanmıştır.

Bu süreçte biyolojik mücadele büyük önem kazanmış ve bu konudaki çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu, alternatif yöntem arayışı içerisinde tek başına veya entegre programları dahilinde biyolojik mücadele ön plana çıkan yöntemler arasındadır.

Biyolojik mücadele, zararlı, hastalık ve yabancı otların diğer canlıların yardımıyla ekonomik zarar eşiğinin altında tutulmasıdır. Bir başka deyişle, doğada zararlı olan canlıları tamamen yok etmeden doğal dengeyi koruyucu, onarıcı ve destekleyici önlemlerin uygulamasıdır. Biyolojik mücadelede etkili olan doğal düşmanlar predatörler, parazitoidler ve patojenler olarak üç ana grupta toplanmıştır. Predatörler, zararlılar üzerinde doğrudan beslenerek etkili olan faydalı böceklerdir. Parazitoidler, yumurtalarını diğer bir böceğin ergin ya da ergin öncesi dönemleri dediğimiz yumurta, larva ve pupa gibi gelişme dönemleri içerisine bırakarak etkili olan genellikle arı grubundan olan faydalılardır. Patojenler ise diğer canlılarda olduğu gibi zararlılarda da hastalık yapan etmenlerdir. Hastalık oluşturan patojenler funguslar, bakteriler, virüsler ve nematodlar gibi canlılardır (Weeden vd., 2007). Biyolojik mücadelede üç temel yaklaşım vardır: (i) Mevcut doğal düşmanların korunması ve etkinliklerinin artırılması, (ii) doğal düşman popülasyonunun çoğaltılması ve desteklenmesi ve (iii) doğal düşmanların ithal edilmesi. Bu üç yöntem, birbirinden bağımsız olarak düşünülmemelidir. Çünkü bu yöntemler birbirinin tamamlayıcısı durumundadır. Bunlar, aynı zamanda bir zararlıya karşı uygulanacak biyolojik mücadelenin aşamalarını teşkil eder.

Biyolojik mücadelede kullanılan etmenler bakteriler, virüsler, funguslar, nematodlar, protozoonlar ve rekombinant tekniklerle geliştirilen organizmalardan oluşmaktadır (Peter, 1984). Belirtilen gruplara ait etmenler zararlı böceklerde değişik hastalıklar oluşturarak böcek popülasyonlarının dengede tutulmasını ve zararlıların en az seviyeye inmesini sağlayarak zararı minimum seviyede tutmaktadır. Bunların büyük bir çoğunluğu konağa özgü olduğu için yalnızca mücadele edilmek istenilen organizma üzerinde etkilidir. Bu özellikleriyle mikrobiyal etmenler, faydalı ve predatör böcekler, yüksek organizasyonlu ve insanlar gibi hedef dışı organizmalar üzerinde herhangi bir risk oluşturmaz. Bunlar, tamamen doğal olmaları sebebiyle ekosistemde herhangi bir kirliliğe yol açmazlar. Bu özellikleri, kimyasal insektisitlerin yerini gelecekte biyolojik etmenlerin alacağını göstermektedir.

EDWIP (The Ecological Database of the World's Insect Pathogens) ve VIDIL (Viral Diseases of Insect in the Literature Database) verilerine göre, 2.285 farklı mikroorganizma türünün, 9.407 böcek türüyle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Toplam 2.285

mikroorganizmanın 1.504'ünü protozoonlar, 411'ini funguslar, 168'ini virüsler, 146'sını nematodlar, 51'ini bakteriler ve 5'ini de diğer organizmalar oluşturmaktadır (Braxton vd., 2003). Bu verilerin sayısı her geçen gün yeni buluşlarla artmaktadır.

Zararlı böcekler, depolanmış ürünlerde, orman, tarla ve bahçe bitkilerinde, seralarda, süs bitkilerinde, koruma altına alınmış bölgelerde yetişen bitki türleri üzerinde, veterinerlik ve tıbbi alanlarda büyük zararlara yol açarlar (Lacey vd., 2001).

Tarım ürünlerinde, üretimin düşmesindeki en önemli nedenlerden birisi zararlı böceklerdir. Tarım ürünlerinin gerek tarladaki ürünlerde gerekse kurutma veya depolama sırasındaki ürünlerde birçok tarımsal zararlı yaşamaktadır. Bunlar, ürünler üzerinde çeşitli derecelerde zararlar meydana getirerek büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Dünyada, kuru incir kurdu ile kimyasallar, çeşitli parazitler, predatörler ve mikroorganizmalar kullanılarak mücadele edilmeye çalışılmaktadır. Fakat yapılan tüm bu çalışmalar bu böceğin popülasyonunun zarar seviyesinin altında tutmak için yeterli olmamış ve zararlıyla mücadele halen etkin bir sorun olmaya devam etmektedir.

Kuru incir kurduna karşı uygulanacak bir biyolojik mücadele etmeninin hangi dönem ve koşullarda, nasıl verileceğini belirlemek için öncelikle zararlıyı çok iyi tanımak ve biyolojisini bilmek gerekir. İkinci husus ise biyolojik mücadelede kullanılacak etmenin tespit edilmesidir. Böyle bir etmenin tespit edilebilmesi için ilk olarak mevcut biyolojik etmenlerin zararlı üzerinde test edilmesi ve zararlı böcekte muhtemel hastalık oluşturabilen yeni bir patojenin araştırılması gerekmektedir.

Bu bilgiler ışığında, ülkemiz ekonomisinde büyük bir yeri olan başta incir olmak üzere, çok sayıda depolanabilir ürünlerde zarar oluşturan Kuru incir kudu (*Ephesia cautella*)'nın, uygulanmakta olan mücadele yöntemleriyle uyumlu hatta onlara alternatif oluşturabilecek bir bakteriyal mücadele etmeninin tespiti çok büyük önem taşımaktadır. Bu süreçte, çalışmada *E. cautella*'ya karşı mikrobiyal mücadelede kullanılabilmesi amacıyla zararlının kültüre edilebilir bakteriyal florası belirlendi. İzole edilen bakterilerin zararlı üzerindeki öldürücü etkileri test edildi. Ayrıca, farklı böceklerden izole edilmiş, öldürücü etkileri yüksek, KTÜ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı entomopatojen koleksiyonunda depolanan bakteriyal etmenlerden *Bacillus* cinsine ait 2 izolatin zararlı üzerindeki öldürücü etkileri tespit edildi.

1.2. Önemli Depolanabilir Tarım Ürünleri ve Türkiye Ekonomisindeki Yeri

İnsanlar ürünlerini daha sonradan tüketme amacıyla saklarlar. Ülkemiz geniş tarım alanları ve uygun iklim koşulları nedeniyle çok sayıda değişik ürünün büyük kapsamda yetiştirilmesine imkan veren koşullara sahip bulunmaktadır. Özellikle nem içeriği düşük ürünler depolanabilmekte ve tüm yıl boyunca piyasaya sunularak tüketim yıl boyunca karşılanabilmektedir (Ferizli ve Emekçi, 2000a).

Ülkemiz kurutulmuş meyve üretimi açısından dünyanın önde gelen üreticileri arasında birçok üründe lider konumundadır. Ülkemizde kurutulmuş incir üretimi dünya üretiminin %60-75'ini oluşturmaktadır. Kuru incir üretimi özellikle Aydın ve İzmir illerinde yapılmakta olup ihracat gelirimiz son yıllarda gittikçe artan bir eğilim göstermektedir (Tablo 1) (Akova, 2009a).

Tablo 1. Yıllara göre ülkemiz kuru incir üretim ve ihracat miktarı (ton) ve ihracat geliri (1.000 ABD doları)

Yıl	Üretim	İhracat Miktarı	İhracat Geliri
2001	48.028	39.284	66.216
2002	52.462	35.935	72.375
2003	54.571	42.095	78.064
2004	55.631	49.073	85.596
2005	56.327	52.594	105.076
2006	60.393	54.237	120.697
2007	48.012	40.101	150.527

Türkiye, toplam tahıl ve baklagil üretimi ve tüketimi bakımından dünyanın önde gelen ülkelerindedir. Ülkemiz hububat üretimi 2008 yılında tahminen 29,3 milyon ton olarak gerçekleşmiştir (Tablo 2) (Akova, 2009a).

Tablo 2. Yıllara göre ülkemiz tahıl üretimi (1000 Ton)

Yıl	Buğday	Arpa	Çavdar	Yulaf	Mısır	Pirinç	Toplam
2003	19.000	8.100	240	240	2.800	223	30.658
2004	21.000	9.000	270	275	3.000	294	34.046
2005	20.500	9.500	270	270	4.200	360	36.472
2006	20.010	9.551	271	209	3.535	389	34.643
2007	17.234	7.307	241	189	3.535	389	29.257
2008	17.782	5.923	255	207	4.274	457	29.316

Ülkemiz tarımsal üretimi içerisinde önemli paya sahip olan bir diğer ürün ise fındıktır. Türkiye fındık üretimi için gerekli en uygun iklim özelliklerine sahip az sayıdaki ülkelerden birisidir. Dünya ihracatında ise ülkemiz en büyük ihracatçı ülke olup Türkiye'yi İtalya, Azerbaycan ve Gürcistan takip etmektedir. ITC verilerine göre 2007 yılı itibariyle ülkemizin dünya iç fındık ihracatındaki payı yaklaşık % 72'dir. Toplam fındık ihracatımızın % 43'ü işlenmiş olarak ihraç edilmektedir (Tablo 3) (Babadoğan, 2009).

Tablo 3. Yıllara göre ülkemiz fındık üretim ve ihracat miktarı (ton) ile ihraç geliri (1000 ABD Doları)

Yıl	Üretim	İhracat Miktarı	İhracat Geliri
2002	600.000	247.478	572.669
2003	480.000	223.261	642.514
2004	350.000	350.000	1118.109
2005	530.000	210.013	1919.991
2006	661.000	247.381	1456.197
2007	530.000	236.104	1509.622

Türkiye, yaş üzüm üreticiliğindeki güçlü konumuna paralel olarak, dünya çekirdeksiz kuru üzüm üretiminde de önemli bir yere sahiptir. Ülkemiz, 2008 yılı itibariyle 300 bin tonluk kuru üzüm üretim miktarı ile dünya toplam kuru üzüm üretiminin % 36,3'ünü tek başına karşılamıştır (Tablo 4) (Akova, 2009b).

Tablo 4. Yıllara göre ülkemiz kuru üzüm üretim ve ihracat miktarı (ton) ile ihracat geliri (1.000 ABD doları)

Yıl	Üretim	İhracat Miktarı	İhracat Geliri
2002	200.000	205.209	156.255
2003	215.000	196.020	183.959
2004	280.000	211.893	231.400
2005	250.000	226.597	239.728
2006	274.000	244.212	289.230
2007	220.000	240.599	316.827
2008	300.000	199.234	349.539

İşlenmiş tahıl ürünlerinin başında un gelmektedir. Ülkemizin yıllık yaklaşık 36 milyon tonluk buğday işleme kapasitesi mevcuttur. Türkiye'nin buğday unu üretimi 2004 yılı itibariyle 11,8 milyon tondur. 2005 ila 2008 yılları arasında ihracatımız 1 milyon tonun

üzerinde gerçekleşmiş ve bunun karşılığında elde edilen ihracat geliri yaklaşık 500 milyon ABD dolarına ulaşmıştır (Aytaç, 2009).

1.3. Ülkemizde Karşılaşılan Depolanmış Ürün Zararlıları

Ülkemiz uygun iklim koşullarından dolayı çok sayıda depolanmış ürün zararlısının gelişimi için mükemmel koşullar sunmaktadır. Depolanmış tahıllarda görülen zararlılar yaklaşık % 10 oranında ürün kayıplarına neden olmaktadır (Ferizli ve Emekçi, 2000a).

Ephestia cautella, *Ephestia figuliella*, *Plodia interpunctella* ve *Carpophilus hemipterus* Ege bölgesinde kurutulmuş incirde sıklıkla karşılaşılan zararlılardır ve diğer kurutulmuş meyvelerde de görülebilmektedir. Tahıllarda başlıca zararlılar arasında *Sitophilus* spp., *Trogoderma granarium*, *Sitotroga cerealella* ve *Rhyzopertha dominica* sayılmakta ve bunlar sağlam danelerde zarar meydana getirmektedirler (Tablo 5). Diğerleri ise önceden zarar görmüş ya da kırıklı danelerde beslenebilen başka zararlılarda mevcuttur. *Trogoderma granarium* genellikle Güney ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde karşılaşılan diğerleri tüm bölgelerde görülebilmektedir (Ferizli ve Emekçi, 2000a).

Tablo 5. Ülkemizde depolanmış ürünlerde sıklıkla karşılaşılan zararlı türler

Ürün	Tür
Tahıllar	<i>Sitophilus granarius</i>
	<i>S. oryzae</i>
	<i>S. zeamais</i>
	<i>Tribolium confusum</i>
	<i>T. castaneum</i>
	<i>Gnathocerus cornutus</i>
	<i>Rhyzopertha dominica</i>
	<i>Tenebrio molitor</i>
	<i>Trogoderma granarium</i>
	<i>Latheticus oryzae</i>
	<i>Tenebrioides mauritanicus</i>
	<i>Oryzaephilus surinamensis</i>
	<i>Laemophleus ferrugineus</i>
	<i>Sitotroga cerealella</i>
	<i>Ephestia kuehniella</i>
	<i>Pyralis farinalis</i>
	<i>Acarus siro</i>
	<i>Glycyphagus domesticus</i>
	<i>Lepidoglyphus destructor</i>
	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>

Tablo 5'in devamı

Kurutulmuş meyveler ve fındık	<i>Gohieria fusca</i> <i>Ephestia cautella</i> <i>Ephestia figulielle</i> <i>Plodia interpunctella</i> <i>Oryzaephilus surinamensis</i> <i>Paralipsa gularis</i> <i>Carpophilus hemipterus.</i> <i>Carpoglyphus lactis</i>
Baklagiller	<i>Acanthoscelides obtectus</i> <i>Callosobruchus chinensis</i>
Tütün	<i>Ephestia elutella</i> <i>Lasioderma serricorne</i>

1.4. Zararlılarla Mücadele Yöntemleri

Tarımsal ürünün ve gıdanın depolanmış ürün zararlılarından korunması üretici, işletme ve ihracatçılar için büyük öneme sahiptir.

Zararlı böceklerin depolanabilir tarım ürünlerine verdiği zararlar öncelikle bahçede başlar kurutma ve depo aşamasında devam eder. Dolayısıyla depolanabilir tarım ürünleriyle mücadele öncelikle bahçede başlatılır. Bahçelerdeki bakım ile bahçe temizliğinin yapılması, kuru dalların budanması, hasat zamanının doğru ayarlanması gibi toprakla ilgili mücadele yapılmaktadır. Ayrıca ürünün koyulacağı depoların temizliği, zararlı giriş çıkışına izin vermeyecek düzeyde olması gibi bulaşma olmaması için alınan bu tedbirlerle zararlılarla kültürel mücadele yapılmaktadır.

Depolanabilir ürünlerde zararlılarla en sık, maliyetsiz ve kolay mücadele çeşitlerinden biri tuzaklar kullanarak yapılan mücadeledir. Işık, yem, yapışkan feromon gibi tuzaklar bu tip mücadelenin en fazla kullanılanlarıdır.

Depolanmış ürünlerle mücadelede hem ülke sınırları içinde hem de ülke sınırları dışında ürünlerin transferi sırasında ürünün kontrol edilerek iç ve dış karantina, ambargo, muayene veya sertifika uygulamaları şeklinde mücadele yapılmaktadır.

Ülkemizde özellikle depolanmış organik ürünlerde zaman zaman uygulanan bir başka yöntem ise düşük sıcaklık uygulamalarıdır. Depolanmış ürün zararlıları - 10°C ile - 18°C'de kısa sürede donarak ölürlür. Bu nedenle depolanmış ürünlerin ısısının istenen düşük sıcaklıklara getirilerek bir süre tutulması ile zararlılar öldürülebilmektedir. Depolanmış organik ürünlerde ayrıca yüksek sıcaklıklardan yararlanılarak zararlılarla mücadele yapılabilmektedir. Ancak sıcaklık derecesi ve uygulama metodu ürüne zarar

vermeyerek, zararlıya zarar verecek şekilde ayarlanmalıdır. Yüksek sıcaklık uygulaması, ülkemizde özellikle organik ürün işleyen işletmelerde zaman zaman uygulanan bir yöntem konumundadır (Sarıyörük ve Köseoğlu, 1987; Bülbül, 1993; Ferizli vd. 2004). Fakat uygulama maliyeti ülkemizde enerji fiyatlarının yüksekliği nedeniyle oldukça yüksektir. Dolayısıyla genellikle organik ürünlerde uygulanmaktadır.

Depolanmış ürün zararlıları ile savaşmada özellikle de organik ürünlerde kullanılmaya başlanmış uygulama olarak CO₂ ve N₂ gazı ile oluşturulan değiştirilmiş atmosfer kullanılmaktadır. Değiştirilmiş atmosfer uygulamaları maliyeti nispeten ucuz ve kalıntı bırakmayan bir yöntem olarak ülkemizde özellikle organik kurutulmuş incir işleyen işletmelerde başarıyla uygulanmaktadır (Ferizli ve Emekçi, 2000b, Ferizli vd. 2004). Uygulamada karşılaşılan sıkıntı ise uygulama süresinin nispeten uzun oluşudur. Bu kapsamda CO₂ gazı ile yüksek basınç uygulaması özellikle nem içeriği düşük ürünlerde kısa sürede zararlılar ile savaşmada kullanılan bir yöntem olarak uygulanmaktadır.

Ülkemizde yüksek basınç + CO₂ gazı uygulaması birkaç organik işletmede kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemin önemli üstün özelliği uygulama süresinin kısa olmasına rağmen, yatırım ve işletme maliyeti çok yüksek olup, normal atmosferik basınçta değiştirilmiş atmosfer uygulamasına kıyasla yaklaşık 10 katı maliyetlidir. Dolayısıyla kıymetli ürünler haricinde uygulama imkanı bulamayan bir yöntem konumundadır (Ferizli ve Emekçi, 2000b).

Depolanabilir ürünlerle mücadelede farklı yöntemlerde mevcuttur. Düşük orantılı nemden yararlanma; depolanmış ürün zararlıları % 50'nin altındaki orantılı nemde yaşayamaz ve çoğalamazlar. Mineral Tuzlardan Yararlanma; mineral tuzların veya küllerin akar ve yumuşak vücutlu böceklerin vücudunda çizikler meydana getirip, vücut suyunun kaybolmasına sebep olarak, ölümlerine neden olmaktadır. Manyetik Alandan Yararlanma; yüksek gerilimli bir elektrik alanı meydana getirilerek bunun arasından zararlıyla bulaşık olan ürün geçirilmek suretiyle ürün içinde bulunan zararlılar öldürülebilmektedir (URL-1, 2013).

1.4.1. Kimyasal Mücadele

Depolanabilir ürün zararlılarıyla mücadelede en fazla yapılan mücadele çeşididir. Dünyada ve ülkemizde depolarda ve işletmelerde ürünlerin zararlılardan korunmasında yaygın olarak bu pestisitler kullanılmaktadır. Kimyasal mücadele kullanılan kimyasallar

zararlıları kısa sürede öldürmesinin yanı sıra çevreye ve insan sağlığına zarar vermektedirler. Ülkemiz 1998 yılında hasat sonrası uygulamalarda yaklaşık olarak 297 ton pestisit kullanıldığı kayıtlıdır. Kullanılan kalıcı pestisitlerden yaklaşık 255 ton insektisitlerden, 20 tonu boş depo ilaçlamalarında ve 235 tonu ise direkt ürüne uygulanmıştır. Yine bu dönemde fümigantlardan metil bromit (Mbr) kullanımını yaklaşık 40 ton olmuştur (Emekçi ve Ferizli, 2000). Depolarda kullanılan birçok pestisite zararlıların direnç geliştirdiği bilinmektedir. Depolarda kullanılmakta olan malathiona, chlorpyrifos-methyl, fenitrothion, pirimiphos-methyl, etrimfos, ve benzeri bir çok etkili maddeye karşı bazı ülkelerde önemli bazı depolanmış ürün zararlılarında direnç geliştiği bildirilmektedir (Arthur, 1996). Uygun olmayan sıcaklık ve nem koşullarında malathion'nun hızlı parçalanması, fumigant aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişmesi; ürün tarafından fumigantın absorbe edilmesi ve koruyucu insektisitlerin üründe kalıntı bırakması (Alaoglu, 1989) çok önemli diğer sorunlardır. Hatta çok yüksek konsantrasyonlarda zararlıların ölmediği ve koruyucu narkoza girdiği bilinmektedir. Kısmi başarılı fumigasyon uygulamalarından arta kalan canlı böcekler, özellikle de gelişmekte olan ülkelerde, fosfine dirençli popülasyonların giderek artmasına neden olmuştur (Teyler vd., 1983; Zettler, 1997; Bell, 2000).

Depolanmış ürün zararlılarıyla mücadele için hem dünyamız hem de ülkemizde en fazla kullanılan yöntemlerden biri fumigasyon uygulamasıdır. Gerek boş gerek dolu depolar belli kimyasallarla fumige edilerek zararlılardan koruyucu ve zararlıları azaltıcı önlemler alınmaktadır. Günümüzde yaygın olarak uygulama alanı bulmuş iki fümigant bulunmaktadır, bunlar metil bromit ve fosfindir (PH₃). Bu iki fümigantın da dünya genelinde depolanmış ürünlerdeki kullanım miktarları tam olarak bilinmemekle birlikte fosfin kullanımının yaklaşık 1900 ton, metil bromit kullanımının ise 6700 ton olduğu bildirilmektedir (Banks, 1994).

Metil Bromit, organik bromür bileşiklerinin en küçük molekülüdür. Seri olarak stratosferdeki ozon molekülleri ile reaksiyona girerek ozonu oksijene indirgemekte ve bu nedenle ozon tabakasını inceltici maddeler grubunda ele alınmaktadır. Bu zararından dolayı Birleşmiş Milletler Montreal protokolüne göre metil bromit, hali hazırda gelişmiş ülkelerde 2005 ve gelişmekte olan ülkelerde ise 2015 yılına kadar kullanımdan kaldırılması planlanmıştır (UNEP, 1995). Ülkemizde ise metil bromit, 2004 yılı itibariyle (karantina ve yükleme öncesi uygulamalar hariç) kullanımdan kaldırılmış bir fümiganttır. Bu nedenle ülkemizde fümigant olarak sadece fosfin (PH₃) bulunmaktadır. 1930'lu Yıllardan bu yana

kullanılmakta olan bu fümigant ülkemizde metalik fosfin formülasyonu olan alüminyum veya magnezyum fosfit içerikli formülasyon olarak ruhsatlıdır. Metalik fosfin havanın nemi ile reaksiyona girerek fosfin gazı (PH₃) açığa çıkarır. Yapılan yoğun çalışmalara rağmen fosfinin etki mekanizması tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte genel olarak cystinin kükürt bağımlı zayıflattığı, dolayısıyla proteinlerdeki disülfid bağlarının kırılmasına neden olduğu, reaktif oksiradikallerin oluşmasına neden olduğu ve mitokondri solunumunu etkilediği bildirilmektedir (Chaudhry, 1997). Fosfin, böcekler için O₂ gerektiren bir bileşiktir. Ortamda O₂'nin olmaması durumunda fosfin alımı gerçekleşemez ve dolayısıyla böceklerde ölüme neden olmaz (Rajendran, 1993).

1.4.1.1. Kimyasalların Çevreye Olan Etkileri

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de zararlı böceklerin mücadelesinde çeşitli kimyasal insektisitler kullanılmaktadır. Fakat kullanılan bu insektisitler doğal çevre ve hedeflenmemiş organizmalar üzerinde olumsuz etkilere sahiptir (Ecevit, 1988; Ünal, 1998). Özellikle 1950'lerden sonra insektisitlerin olumsuz etkilerinin ortaya çıkarılması, zararlı böceklerin mücadelesinde yapılan çalışmaların daha etkili ve güvenli mücadele etmenleri bulmaya yönlendirmiştir.

Zararlı böceklerle mücadelede 1800'lü yılların ortalarına kadar, zararlıların toplanması veya yakılması şeklinde mücadele ediliyordu. Bu tarihten sonra önce kükürt ve arsenik, daha sonraları ise kurşun asetat, cryolite ve borik asit gibi çok az kimyasal madde böcekler için kullanıldı. Dikloro-difenil-trikloroetan (DDT)'nin 1938-1940 yıllarında insektisit özelliğinin keşfedilmesinden sonra kimyasal mücadelede yeni bir çağ açıldı.

Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre insektisitlere dayanıklılık, "normal bir popülasyondaki bireylerin çoğunu öldürdüğü tespit edilen zehirli bir maddenin bir dozuna karşı, aynı türün diğer bir popülasyonundaki bireylerin tolerans kazanma yeteneğinin gelişmesi" olarak tarif edilmektedir. Başka bir tanıma göre ise dayanıklılık, "bir arthropod türünün bir irkinin, aynı türün duyarlı popülasyonunda saptanmış olan LD₁₀₀ değerinin iki katı olan ilaç dozundan etkilenmemesi" olarak açıklanmaktadır.

Zararlı böceklerle ilgili toksisite denemelerinde her zararlının kendine has bir doz ölüm eğrisi vardır. Kullanılan ilaç dozu arttığında ölüm oranı da artar. İşte bu durumda eğer doz arttığında ölümden artışı yavaş yavaş azalıyorsa, o canlıya karşı kullanılan toksik maddeye karşı bir mukavemet başlamış demektir.

Arthropodların insektisitlere karşı dayanıklılığı ilk olarak 1908 yılında San Jose kabuklu biti (*Quadraspidiotus perniciosus*)'nde gözlenmiş ve her geçen yıl bu sayı artmıştır. DDT'nin piyasaya sürülmesiyle dayanıklı populasyonların görülme oranı birden bire ve belirgin bir şekilde artış göstermiştir. Pestisitlere karşı ilk direnç olayı İsveç'te 1946 yılında DDT'ye karşı karasineklerde gözlenmiş, 1948'te ise Aldrin ve Dieldrin kimyasallarının toprakta en fazla kalıcı insektisitler olduğu açıklanmıştır (Ağar vd., 1991). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalara göre 447 böcek türünün insektisitlere karşı dayanıklı olduğu belirlendi. Bu sayının her geçen yıl arttığı ve günümüzde 1000 türün üzerinde olduğu düşünülmektedir. Bu türlerin başta Diptera ve Coleoptera olmak üzere arthropodların 14 farklı takımına ait olduğu bilinmektedir.

Insektisitlere dayanıklı zararlıların oluşmasıyla, doz arttırımı yapılmakta ve uygulamalar arasındaki süre kısaltılmaktadır. Bu yöntemden de sonuç alınamaması durumunda daha etkili ve zehirli insektisit kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun maddi bedeli ölçülemeyecek kadar yüksek olmaktadır. Hatta yüksek dozlarda ve daha zehirli insektisit kullanımı yüzünden insan zehirlenmeleri bile görülebilmektedir.

Aşırı dozda ilaç kullanımı zararlı üzerine etkili olmaktan daha çok, çevre kirliliği ve diğer yan etkileri ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca, insektisitlere dayanıklılığın sonucu olarak sosyal harcamalarda da artış görülmüştür. Zararlılarla mücadele için uygulanan kimyasallar, hedef zararlı böceğin haricinde diğer canlıları da olumsuz yönde etkilemektedir. Kimyasalların yoğun bir şekilde kullanılması, zaman içinde zararlı böceklerde insektisitlere karşı dayanıklılık mekanizmasının gelişmesine neden olmaktadır. Gerçekleşen bu dayanıklılık mekanizması, ilaçtan kaçma gibi davranışsal olabileceği gibi birbirine çok yakın akraba türler arasında dahi zararlıya direnç gösterebilecek ırkların oluşabilmesi şeklinde de gerçekleşebilir. Bazen de böceklerin vücut yapılarından kaynaklanan yapısal dayanıklılık söz konusudur. Örnek vermek gerekirse, böyle bir durumda böcek, kalın kutikula tabakası sayesinde uygulanan insektisite karşı dirençlidir. Fosfin ile fümigasyonda çok yüksek konsantrasyonlarda dahi zararlıların ölmediği ve koruyucu narkoza girdiği bilinmektedir (URL-1, 2013).

Insektisitlerin etki tarzı bakımından zararlı ve faydalı böcekler arasında bir farklılık yoktur. Fakat, etkileri bakımından farklılık vardır. Faydalı böcekler olarak kabul edilen predatör ve parazitler insektisitlerden daha fazla etkilenmektedir. Ne yazık ki parazit ve predatörlerdeki dayanıklılığın oluşumu, zararlı böceklerdeki kadar çabuk olmamaktadır.

Bunun sonucu olarak, zararlı popülasyonları üzerinde dengeleyici olan predatörler ve parazitler ortadan kalkmakta ve zararlılar daha çabuk yayılmaktadır (Ecevit, 1988).

İnsektisitlerin kullanıldığı alanlarda doğal olarak yaşayan polinatör canlılar da yok olduğu için bu alanlardaki zirai ürünlerde tozlaşma oranı azalmaktadır (Ecevit, 1988). Bitkilerde tozlaşmada önemli rol oynayan bal arıları ve yaban arıları insektisitlerden etkilenen önemli bir canlı grubunu oluşturmaktadır. Kimyasal insektisitler yalnızca böcek türlerine değil, doğada bulunan bitki örtüsüne de zarar vermektedir. Kimyasal insektisitlerin doğada toprak ve bitkilerde birikmelerinden dolayı yok olmaları çok uzun sürmektedir. Oluşan bu birikim topraktaki normal mikrobiyal popülasyonu bozarak toprak veriminin düşmesine neden olduğu gibi bitkiler aracılığıyla besin zincirine dahil olarak besin zincirinin en üst seviyesindeki canlılara kadar ulaşmaktadır. Belli bir alana uygulansalar dahi kolayca yok olmadıklarından dolayı, rüzgar ve yağmur gibi doğal olaylarla çok daha geniş alanlara yayılabilmeleri insektisitlerin zararını daha da artırmaktadır (Ünal, 1998).

Herhangi bir yolla sulara erişen kimyasal maddeler balıklar tarafından alınır. Balıkların büyüme, üreme, kaçma ve saklanma gibi bazı yetenekleri, insektisitlerin bünyelerinde birikimlerine göre azalır veya tamamen yok olur. Rakipler karşısında daha kolay avlanmaları sonucu bazı türlerin bütünüyle ortadan kalkması söz konusu olabilir (Ünal, 1998). Ekonomik öneme sahip balık türlerinde biriken insektisitler beslenme yoluyla insanlara geçer. İnsektisitlerin balıkları öldürme etkilerinden başka sulardaki oksijen miktarını da düşürerek, su canlılarının yaşamını tehdit etmektedir.

İnsektisitler kullanıldıkları alanlardaki bitkilerin çimlenmesi, vejetasyonu ve üremesi üzerine de olumsuz etkiler yapmaktadır. Bazen bitkilerin belirli doku kısımlarında, özellikle yaprak ve sürgünlerinde yanma denilen bir takım lekeler ile renk değişimlerinin meydana gelmesine sebep oluşturmaktadır. Hatta bazen tüm bitkinin öldüğü görülür (Ecevit, 1988). Bitkilere bulaşan insektisitler, bitki üzerinde bıraktıkları kalıntılarla, besinin tat ve kokusunu bozabildiği gibi, beslenme yoluyla insan vücuduna alınarak toksik etkilere de yol açmaktadır.

1.4.1.2. İnsektisitlerin İnsanlar Üzerine Olan Etkileri

İnsektisitler doğrudan doğruya veya dolaylı olarak insan sağlığını etkilemektedir. Bu etkiler akut ve kronik toksisite olarak iki grup altında toplanabilir (Ecevit, 1988).

Bir kimyasalın bir kez veya kısa bir zaman diliminde (Örneğin, 24 saat) birkaç kez alınması sonucunda vücutta oluşan hasar akut toksisite olarak tanımlanır (Ünal, 1998). Akut toksisite ilacın üretimi sırasında çalışanların ilaçlardan zehirlenmesi sonucu ortaya çıkabildiği gibi bu ilacın taşınması, depolanması ve kullanılması esnasında güvenli kullanım kurallarına uyulmaması sonucu da ortaya çıkabilir (Ecevit, 1988). Bursa’da 1963 yılında, parathionla ilaçlanmış şeftaliyi yiyen 32 kişiden 7’sinin aynı gün ölmesi akut toksisiteye örnek verilebilir. İnsektisitlerin üretim ve kullanımları sırasında meydana gelen iş kazaları, bu ilaçların insan sağlığına karşı olumsuz etkilerini çok çabuk bir şekilde göstermesine sebep olmaktadır. Örneğin, Hindistan’ın Bhopal kentinde 1984 yılında, ABD’ye ait Union Carbide Şirketi’nin bir fabrikasından çevreye yayılan yaklaşık 45 ton metil izosiyonat gazı, civardaki 2500 kişiyi uykularında öldürmüştü ve fabrika çevresindeki çok geniş bir alanı yaşanmaz hale getirmiştir. Aradan 4 yıl geçtikten sonra bile, fabrika çevresindeki köylülerden her yıl ortalama 500 kişinin ölmesi, tehlikenin boyutlarını göstermesi açısından oldukça önemlidir (Ünal, 1998).

Kronik toksisite ise bir kimyasalın akut toksisiteye neden olmayacak kadar düşük dozlarda uzun süre alınması halinde sıcakkanlıklarda meydana getirdiği fizyolojik düzensizlik olarak tanımlanır (Ünal, 1998). İnsektisitlerle bulaşık veya bekleme süresi dolmadan insektisit kalıntısı içeren bitkisel besinlerin yenmesiyle de kronik toksisite meydana gelebilmektedir. Örneğin, Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde heksaklorobenzenli (HCB) insektisitle ilaçlanmış tohumluk buğdayı yiyen 3000 kişide Porfiriya (Karayara) hastalığının görülmesi ve bunlarda %11 oranında ölüm meydana gelmesi, dünya çapında ilgi uyandıran bir zehirlenme olayıdır (Ünal, 1998). Ayrıca, düşük dozlarda alınan bu insektisitlerin insan vücudunda birikimi sonucu, gelecek kuşaklarda neler meydana getireceğini de şimdiden tahmin etmek oldukça zordur. İnsektisitlerin sinir sistemi üzerindeki enzimlere etkili oluşu, önemlerini bir kat daha arttırmaktadır. Bugün özellikle fazla miktarlarda kullanılan klorlandırılmış hidrokarbonların insan ve hayvanların beyin, karaciğer, böbrek ve yağ dokularında toplanarak toksik etkide bulunduğu bilinmektedir (Ecevit, 1988).

Depolarda metil bromitin yasaklanmasıyla yerine sıklıkla fosfin kullanılmaya başlanmıştır ve gaz haldeki fosfin solunduğunda akciğerdeki nemle reaksiyona girerek fosforik asit oluşturur, bu da ölümcül olabilir.

Dünya Sağlık Örgütü’nün 1985 yılı raporlarına göre, her yıl 1.000.000 kişi pestisitlerden zehirlenmekte ve bunların yaklaşık 20.000’i ölümlerle neticelenmektedir.

Dünya pestisit tüketiminin 1/3'ü az gelişmiş ülkelerde gerçekleşmesine rağmen, dünya pestisit ölümlerinin % 75'i bu ülkelerde meydana gelmektedir (Ünal, 1998).

Zararlı böceklerle mücadelede kullanılan insektisitlerin anlatılan yan etkilerinden dolayı, kimyasal mücadelenin günümüzde mümkün olduğunca kısıtlanması ve bunun yerini çevresel açıdan daha güvenli olan biyolojik mücadelenin alması gerektiği düşünülmektedir.

Son 25 yılı aşkın bir süredir, zararlı böceklerle mücadelede yukarıda bahsedilen zararlı etkileri nedeniyle kimyasal insektisit kullanmanın yerine alternatif veya destek yöntemleri araştırmaya başlanmış (Bernard ve Jack, 2003) ve böylece biyolojik mücadele çağı başlamıştır. Biyolojik mücadele kapsamında geliştirilen ürünlerin kimyasal mücadeleye kıyasla geliştirme masrafının daha az olması, daha az direnç oluşturması, yan etkisinin çok az olması, zararlılarla özdeşleşmesi ve başarı oranının çok yüksek olması gibi nedenlerden dolayı biyolojik mücadele çalışmaları hız kazanmıştır (Tablo 6).

Tablo 6. Kimyasal mücadele ile biyolojik mücadelenin karşılaştırılması (Uygun vd., 2010)

	Kimyasal Mücadele	Biyolojik Mücadele
Denene Bileşik /Tür Sayısı	> 1 milyon	2000
Başarı Oranı	1:10000, 1:200000	1:10
Geliştirme Masrafı	100-400 milyon Euro	1 milyon Euro
Geliştirme Süresi	10 yıl	10 yıl
Fayda/Masraf Oranı	2: 1	20: 1
Dayanıklılık Riski	Yüksek	Düşük
Zararlıya Özelleşme	Çok düşük	Çok Yüksek
Yan Etki	Çok	Yok/ Çok az

1.4.2. Biyolojik Mücadele

“Biyolojik mücadele” sözcüğü ilk defa 1919 yılında Kalifornia Üniversitesi’nden Harry Smith tarafından “zararlı populasyonlarının doğal düşmanları vasıtasıyla kontrol altına alınması” için kullanılmıştır. Bununla birlikte, teknolojik gelişmelerle bu tanım önemli araştırmalara temel oluşturmuştur. Van den Bosch vd. (1982), biyolojik mücadele teriminin hem “uygulamalı biyolojik mücadele” yani “insanlar tarafından doğal

düşmanların zararlılara karşı kullanılması ve hem de “doğal biyolojik mücadele” yani “insanın müdahalesi olmadan doğada kendiliğinden oluşan mücadele” ifade etmek üzere kullanıldığını belirtmektedir.

Debach (1974), biyolojik mücadeleyi doğal mücadelenin bir parçası olarak kabul etmekte ve ekolojik anlamda “parazitoit, predatör ve patojenlerle, herhangi bir zararlıının popülasyon yoğunluğunu, bu etmenlerin olmadığı zamanki yoğunluğundan daha düşük düzeyde tutulmasını sağlayan düzenlemeler” olarak tarif etmektedir. Aynı zamanda Debach (1974), doğal biyolojik mücadeleyi ise “doğada canlı popülasyonlarının belirli bir zaman periyodunda iniş ve çıkışlarının bir veya daha çok doğal faktörler kombinasyonu tarafından düzenlenmesi” şeklinde tarif etmektedir. Hagler (2000), biyoloji mücadeleyi “zararlıların mücadelesinde doğal düşmanların insanlar tarafından kullanılmasıdır” şeklinde tarif etmekte ve ayrıca ABD Ulusal Bilimler Akademisi’nde bir grubun, biyolojik mücadele tanımında bulunan canlı organizmalara gen ve gen ürünlerini de ekleyerek biyolojik mücadelenin çalışma alanını genişletmek istemektedir (Uygun vd., 2010).

Günümüzde biyolojik mücadele, “zararlı böceklerin yapmış olduğu zararı en aza indirmek için bu böceklerin doğal düşmanlarını kullanma” olarak tanımlanabilir. Doğal düşman terimi, predatör ve parazitlerle birlikte hastalık oluşturan mikroorganizmaları da kapsamaktadır (Peter, 1984). Ancak, böceklerde hastalık oluşturan mikroorganizmaların kullanımı, genellikle mikrobiyal mücadele olarak adlandırılır.

Biyolojik mücadele, kimyasal mücadelenin tüm olumsuz yönlerini ortadan kaldırması bakımından son yıllarda tercih edilmesi gereken bir mücadele yöntemi haline almıştır.

Biyolojik mücadelenin bir alt kolu olan mikrobiyal mücadele, zararlı böceklerle mücadelede patojen mikroorganizmaların kullanılmasını kapsar. Entomopatojen olarak adlandırılan bu mikrobiyal mücadele etmenleri (bakteriler, virüsler, funguslar, nematodlar, protozoonlar) zararlı böceklerde hastalık oluşturarak böcek popülasyonlarının dengede tutulmasını ve zararlarının en aza indirilmesini sağlamaktadır. Bu entomopatojenlerin büyük bir çoğunluğu konağa özel olduğu için yalnızca mücadele yapılmak istenilen organizma üzerinde etkili olur. Bu özelliğiyle, faydalı ve predatör böcekler, hayvanlar ve insanlar gibi hedef dışı organizmalar üzerinde herhangi bir risk oluşturmazlar. Tamamen doğal olmaları sebebiyle ekosistemde herhangi bir kirliliğe yol açmazlar. Bu özellikleri, gelecekte kimyasal insektisitlerin yerini bu biyolojik etmenlerin alacağını göstermektedir.

Biyolojik mücadele, diğer mücadele yöntemlerine göre doğal dengenin kurulmasına yardımcı olması, uzun vadede kalıcı sonuçlar vermesi ve nihai hedefe ulaştırabilmesi bakımından en çok tercih edilmesi gereken mücadele yöntemidir (Oğurlu, 2000).

Biyolojik mücadeleyi asıl önemli kılan, ekosistemi bozmaması ve zararlı türler üzerinde kalıcı ve dinamik bir etki meydana getirmesidir. Bu iki özellik diğer mücadele yöntemlerinde bulunmaz. Biyolojik mücadele diğer mücadele yöntemlerine göre yan etkilerinin olmayışı, başlangıçta masraflı olsa da ilerleyen yıllarda ilk kuruluş harcamalarını tolere ederek en az masrafla en iyi sonucun alınabilmesine imkan vermesi, etkisini uzun süre devam ettirebilmesi, zararlılarda dayanıklılığa ve bağışıklığa yol açmaması ve zararlıyı direkt olarak öldürmekten başka, üreme gücünü azaltma ve gelişiminde dengesizlikler yaratma gibi dolaylı faydalar sağlaması bakımından birçok avantajlara sahiptir. Buna karşın esaslı bilgi gerektirmesi, başlangıçta risk taşıması ve neticenin geç alınması gibi tolere edilebilecek dezavantajları bulunmaktadır.

Biyolojik mücadelenin ilk uygulama dönemleri çok eski tarihlere dayanmaktadır. Bilimsel anlamda bilinen ilk biyolojik mücadele, çinli turunçgil yetiştiricilerinin zararlı böcekleri kontrol altına almak amacıyla yaklaşık 1700 yıl önce predatör karıncaları kullanmalarıyla uygulanmıştır. Hatta karıncaların ticari olarak üretilip satıldıkları belirtilmektedir. Bin ikiyüzlü yıllarda Yemen’de palmye ağaçlarındaki zararlılara karşı karıncaların kullanıldığı ve Arabistan’da her yıl dağlardan getirilen avcı karınca kolonilerinin, hurma ağaçlarında zarar yapan bir diğer karınca türüne karşı kullanıldığı kayıtlıdır (Oğurlu, 2000).

İngiltere’de 1770’li yıllarda tarım arazileri ve seralardaki çeşitli bitkilere zarar veren afişlerle mücadelede gelin böceklerinden faydalanılmıştır. Türkiye’de incir depolarında *Ephestia cautella*, Walker (Lep.: Pyralidae) zararının artmasıyla 1900’lü yılların başlarında Almanya’dan getirilen incir kurdunun parazitoiti olan *Bracon hebetor*’un Ege Bölgesi’ndeki incir depolarında kitle üretim ve salımı çalışmaları yapılmıştır (URL-2, 2013). Fransa’da kavak ağaçlarında zarar yapan *Lymantria dispar* L. (Lep: Lymantriidae) tırtıllarıyla mücadelede, 1840 yılında koşucu böceklerden faydalanıldığı bilinmektedir. Bir kurbağa türü olan *Bufo marinus* L. (Anura: Bufonidae) zararlı böceklerle karşı kullanılmak üzere, 1884 yılında Jamaika’dan Barbados’a nakledilmiştir. *Poecilia reticulata* (Lepistes, Guppy), lepistes balıkları sivrisineklerle mücadelede bataklık bölgelerde halen kullanılmaktadır.

Biyolojik mücadelede elde edilen bu başarılar, uygulayıcıları cesaretlendirmiş ve günümüze kadar büyük bir gelişme göstererek ilerletilmiştir. Son yıllarda çalışmalar ağırlıklı olarak böceklerde hastalık oluşturan entomopatojenlerin izolasyonu, karakterizasyonu ve biyolojik mücadelede kullanımına yönelmiştir.

1.4.2.1. Biyolojik Mücadelede Kullanılan Etkin Gruplar

Biyolojik mücadelede etkili bir şekilde kullanılan organizmalar predatörler, parazitler ve mikroorganizmalar olarak 3 ana grup altında toplamak mümkündür. Zararlı böceklerin doğal düşmanları olan bu canlılar, zararlılarla mücadelede büyük potansiyele sahiptir.

1.4.2.1.1. Predatörler

Böcek predatörleri, böcekleri yakalayan ve besin kaynağı olarak yiyen hayvanlardır. Bu predatörleri balıklar, amfibiler, sürüngenler, kuşlar, böceklerle beslenen çeşitli omurgasız hayvan grupları ve karnivor böcekler oluşturur. Ormanlarda zarar veren böcekler düşünüldüğünde, bu gruplardan kuşlar ve karnivor böceklerin biyolojik mücadelede kullanılma potansiyeli olduğu söylenebilir. Kuşlar için mutlak yararlı veya mutlak zararlı denilmemekle birlikte, kuşları orman için genelde faydalı hayvanlar olarak saymak mümkündür. Zira zararlı böceklerin erginlerini, pupalarını, larvalarını ve yumurtalarını yiyen pek çok kuş türü, bu yönleriyle doğal dengenin sağlanmasında önemli rol oynamaktadır (Oğurlu, 2000).

1.4.2.1.2. Parazitler

Böcek parazitleri, hayatını tek bir konukçu ferdi üzerinde tamamlayan ve konukçusunu zayıflatan, geriletken, gelişmesine mani olan veya öldüren organizmalara denir. Konukçu ise paraziti taşıyan canlıya verilen isimdir. Buna göre parazitin ya belirli bir süre ya da tüm hayat döngüsü boyunca, kendisinden daha gelişmiş başka bir canlının üzerinde veya içinde yaşaması gerekir. Bu süre zarfında parazit, konukçunun vücut ısısından, besininden ve hatta hormonlarından faydalanarak konukçu organizmanın zararına gelişmekte ve çoğalmaktadır. Böcek parazitleri kendi gelişimleri tamamlandığında her zaman böceği öldürürler.

Böcek parazitizmi oldukça sık rastlanılan bir durumdur ve birçok böcek kendisiyle bağlantılı bir veya çoğunlukla birkaç parazit türe sahiptir. Bütün parazit böcekler bağlandıkları konağın hayat döngüsü içindeki belli bir safhaya özelleşmiş durumdadır. Bu yüzden bazıları pupa ve yumurta safhası ile sınırlanmışken, bazıları da larval parazitlerdir.

1.4.2.1.3. Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalardan üretilen insektisitlerin, hedef böcek türleri için oldukça seçici olmaları, bakteriler sayesinde ayrıştırılabilir olmaları ve zararlı böceklerde bu bileşiklere karşı direnç gelişiminin yavaş olması bakımından oldukça avantajlıdır. Fakat, düşük tesirli olmaları ve yüksek üretim maliyetleri açısından bakıldığında farklı uygulamalar için kullanımları kısıtlanmış olur. Ancak, rekombinant DNA teknolojisi bunun gibi birçok negatif özelliğin üstesinden gelebilmek için çeşitli imkanlar sağlar. Özellikle *Bacillus thuringiensis*'lerin insektisidal aktiviteleri ve böcek bakülovirüs sistemleri, etkili, güvenli ve seçici olarak geliştirilmiş biyolojik mücadele etmenleridir.

Doğada, böceklerin hastalanmalarına ve ölümlerine neden olan bakteri, virüs, mantar, nematod veya protozoa gruplarından pek çok mikroorganizma mevcuttur (Lipa, 1975). Bu mikroorganizmalar entomopatojen olarak adlandırılır. Doğada bulunan entomopatojenler böcek popülasyonlarının dengelenmesinde büyük öneme sahiptir. Birçok entomopatojen mikroorganizma, tarla ve bahçe bitkilerinde, seralarda, süs bitkilerinde, koruma altına alınmış alanlarda yetişen bitki türleri üzerinde, orman arazilerinde, depolanmış ürünlerde, veterinerlik ve tıbbi alanlarda zararlara yol açan vektör ve zararlı böceklerin biyolojik mücadelesinde kullanılır (Lacey ve Kaya, 2000; Lacey vd., 2001).

Entomopatojenlerin yakın gelecekte, mikrobiyal mücadele etmeni olarak, sadece fiyat ve etkinlik bakımından değerlendirildiğinde bile kimyasal pestisitlere göre daha kullanışlı hale geleceği düşünülmektedir. Buna ilave olarak, bu entomopatojenlerin mikrobiyal mücadele etmeni olarak kullanılmalrı, ekosistemdeki biyolojik çeşitliliğin sürdürülmesi, zararlı türlerin doğal düşmanlarının korunması, besinler üzerinde kalıntı bırakmaması, hedeflenmemiş diğer organizmalar ve insanlar açısından güvenli olması gibi birçok avantajlara sahiptir (Lacey vd., 2001).

Zararlı böceklerin diğer doğal düşmanları gibi entomopatojenler de tek bir tür veya gruba özeldir ve bazıları zararlı böceklerin uzun zaman periyotları boyunca mücadelesini sağlayabilir (Lacey vd., 2001). Entomopatojenlerin zararlı böceklerle karşı kullanım

taktikleri temelde diğer biyolojik etmenlerinin kullanımlarıyla aynıdır (Hamm, 1984; Harger, 1987). In vitro koşullarda üretilip uygulanabildiği gibi uygun koşullarda saklanıp doğal ortamda tekrar aktif hale geçebilirler.

Birçok virüsün böceklerin hastalanmasına neden olarak böcek salgınlarını etkiledikleri bilinmektedir (Steinhaus, 1956). Çiğneyici ağız yapısına sahip böcekler, özellikle yaprak yiyenler, virüs enfeksiyonlarına karşı daha hassastır. Bu durumda yaprak yiyen Lepidoptera tırtıllarıyla, Hymenoptera'nın yalancı tırtılları, viral etmenlerden daha fazla zarar görürler (Weiser, 1969). Bu virüsler genellikle 2-3 yılda bir meydana çıkan epidemilerde çoğalarak birçok larvayı öldürürler ve böylece böceklerin zararlarını ortadan kaldırırlar (Lipa, 1975). Virüsler birçok böcek takımıyla ilişkilidir. Bununla birlikte büyük bir kısmı Lepidoptera (% 83), Hymenoptera (% 10) ve Diptera (% 4) takımlarında bulunmaktadır. Şimdiye kadar sınıflandırılan böcek virüslerinin büyük bir kısmı Baculoviridae, Reoviridae, Poxviridae, Picornaviridae, Densoviridae, Rhabdoviridae, Orthomyxoviridae ve Iridoviridae familyalarına aittir. Bu böcek virüslerinden, Baculoviridae familyası sadece eklembacaklar için seçicidir (Demirbağ ve Beldüz, 1997). Çoğu baculovirüsler sadece bir veya yakından ilişkili birkaç böcek türünü enfekte edebilir (Arif ve Kurstak, 1991). Hastalanan larva önce uyuşuk bir hal alır ve sonra beslenmeyi bırakır. Ölmeden önce ağacın tepesine tırmanır ve arka bacaklarından bitkiye asılı olarak ölür. Dokuları koyulaşır, ayrışır ve vücutları sıvı hale geçer (Lipa, 1975). İnsanlar ve diğer hedeflenmemiş organizmalar için güvenli bir mikrobiyal etmen olması, bu virüslerin biyolojik mücadelede kullanılma potansiyelini arttırmaktadır (Granados ve Federici, 1986; Gröner, 1986).

Entomopatojenik funguslar, değişik habitatlarda yaşayan birçok böcek türünü enfekte edebildikleri için farklı çevresel faktörlere uyum sağlamışlardır. Bu nedenle, entomopatojenik fungusların biyolojileri büyük çeşitlilik göstermektedir. Bazı gruplar zorunlu hücre içi parazitken, bazıları ortamda canlı konağın olmadığı durumlarda saprofit olarak hayatta kalabilen fırsatçı patojenlerdir (Hajek, 1997).

Böceklerde parazit olarak yaşayan ve bazı durumlarda ölümlerine yol açan birçok nematod türü bulunmaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda birçok nematod familyasına ait türlerin, böcekler ve diğer omurgasız hayvanlarla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Poinar, 1979, 1990; Kaya ve Stock, 1997). Yapılan çalışmalar, zararlı böceklerin biyolojik mücadelesinde kullanılma potansiyeli taşımaları bakımından 7 familya üzerinde yoğunlaşmıştır. Bunlar Mermithidae, Tetradonematidae,

Allantonematidae, Phaenopsitylenchidae, Sphaerulariidae, Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarıdır (Kaya ve Stock, 1997). Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyaları günümüzde, özellikle toprak böceklerinin mikrobiyal mücadelesinde en sık kullanılan gruplardır (Glazer ve Lewis, 2000; Liu vd., 2000; Lacey vd., 2001). Bu nematodlar, *B. thuringiensis*'den sonra, Amerika'da yıllık 2-3 milyon dolarlık satışlarıyla en fazla kullanılan mikrobiyal mücadele etmenleridir (Georgis, 1997).

Protozoonların zararlı böcek popülasyonlarında meydana getirdikleri salgınlar, az rastlanılan bir durum olmasına karşın, neden oldukları ferdi ve küçük gruplar halindeki ölümler, zararlı böcek popülasyonlarının zarar eşiğinin altında tutulması bakımından önemlidir (Maddox, 1987; Brooks, 1988). Protozoa enfeksiyonları böcek popülasyonlarını dengede tutması bakımından büyük bir öneme sahiptirler (Maddox, 1987; Brooks, 1988). Entomopatojenik protozoonlar genellikle konağa özgüdür. Böceklerde oluşturdukları hastalıklar yavaş ilerler. Öldürücü etkileri düşüktür ve çoğu kez böceklerde kronik enfeksiyonlar oluştururlar. Öldürücü etkileri düşük olması nedeniyle protozoonların enfekte ettiği böceklerin ölümü bazen haftalar sürebilir (Hoffman ve Frodsham, 1993). Çoğu entomopatojenik protozoonun hayat döngüsü komplekstir. Sadece canlı konak içersinde gelişebilirler ve çoğu türün gelişimini tamamlayabilmesi için bir ara konağa ihtiyacı vardır.

En yaygın şekilde kullanılan mikrobiyal mücadele etmeni *Bacillus thuringiensis* Berliner bakterisidir. Birçok böcek ordosuna ait türlere karşı aktif olan yeni suşların izole edilmesi ve yapılan genetik düzenlemeler, bu bakterinin kullanım alanlarını genişletmiştir (Lacey vd., 2001). Mikrobiyal insektisitlerin satışları son yıllarda büyük artış göstermiştir. Ancak, bu miktar, toplam ürün koruma satışlarının % 1-1,5'lik kısmını teşkil etmektedir. Bunun çok büyük bir kısmını (% 95) *Bacillus thuringiensis* kökenli insektisitler oluşturmaktadır (Gaugler, 1997; Georgis, 1997).

B. thuringiensis kökenli insektisitlerin özellikle malathiona direnç kazanmış güve larvalarına etkinliği, sıcakkanlılara karşı emin olması ve seçiciliği bir mikrobiyal insektisit olarak ticari preparatlarının geliştirilmesini teşvik etmiştir (Subramanyam ve Cutkomp, 1985). Esasen kültür bitkilerinde zararlı olan birçok Lepidopter türü ile mücadelede uzun süreden beri ticari preparatları kullanılmaktadır. *B. thuringiensis*'in depolanmış ürün zararlısı Lepidopterlere karşı da kullanılması amacıyla yapılan çalışmalardan çok olumlu sonuçlar alınmıştır.

Mikrobiyal mücadele etmenlerinin geniş spektrumlu insektisitlere alternatif olarak kullanılma potansiyelleri vardır. Fakat daha yaygın olarak kullanılabilmeleri için;

- Virülanslarının ve öldürme hızlarının artırılması,
- Değişen çevre koşullarına karşı (soğuk havalarda, kuraklık şartları gibi dayanıklılıklarının artırılması,
- Ürettikleri toksinlerin etkinliklerinin artırılması,
- Uygulanan diğer mücadele yöntemleriyle uyumlarının daha iyi araştırılması,
- Diğer çevresel avantajlarının belirlenmesi gerekmektedir.

1.4.2.1.3.1. Bakterilerin Mikrobiyal Mücadelede Kullanımı

Entomopatojen bakteriler, günümüzde zararlı böceklere karşı en fazla kullanılan mikroorganizmalardır. Spor oluşturanlar ve spor oluşturmayanlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Böceklerle mücadelede, daha çok spor oluşturan bakteriler kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar, bunların sporlarının kuraklık ve yüksek sıcaklığa karşı dayanıklı olduğunu göstermiştir. Spor oluşturmayan bakteriler ise olağanüstü koşullar karşısında oldukça dayanıksız ve hassastır. Buna göre, böceklere karşı yapılacak mücadelede, spor oluşturan ve fakültatif bakterilerin kristal taşıyanlarının kullanılması tavsiye edilmektedir (Oğurlu, 2000).

Son yıllarda patojenik potansiyeli hayli yüksek bir bakteri olan *Bacillus thuringiensis* üzerinde durulmaktadır. Bu bakterinin biyolojik mücadelede, diğer birçok bakteriye nazaran daha etkili olduğu bilinmektedir. *B. thuringiensis*'in çok sayıda varyetesi vardır. Bunlar, başta Lepidoptera olmak üzere Diptera ve Coleoptera takımlarına karşı da kullanılmaktadır. Bu bakterinin spor ve kristalleri piyasaya toz, ıslanabilir toz veya sulu karışım halinde sunulmaktadır. *B. thuringiensis*'den hazırlanan karışımların uygulandığı böcekler, bu karışımların ihtiva ettiği toksin sebebiyle ölürler.

1.4.2.1.3.2. *Bacillus thuringiensis*'lerin Genel Özellikleri

Bacillus thuringiensis, Bacillaceae familyası içerisinde yer almaktadır. Bacillaceae familyasının üyeleri endospor üreten Gram-olumlu hareketli ya da hareketsiz çubuk şekilli bakterilerdir (Beegle ve Yamamoto, 1992) (Şekil 1). Bu familyanın *Bacillus* ve *Clostridium* olmak üzere iki önemli cinsi vardır. Bu cinsler birbirlerinden çoğunlukla

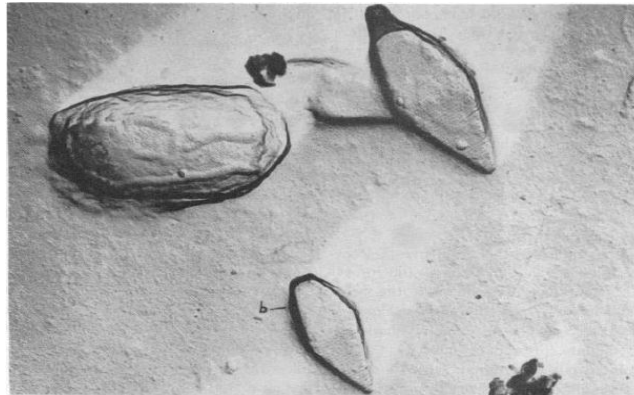
oksijen ihtiyaçlarına göre ayrılırlar. *Bacillus* cinsine ait türler aerobik, *Clostridium* cinsine ait türler ise anaerobiktirler. Her iki cins de zincirler oluşturan çubuk şekilli hücelere sahiptir (Tanada ve Kaya, 1993).

B. thuringiensis, *Bacillus* cinsi içinde *B. cereus* grubu içersinde yer almaktadır. Bu grup altı türden oluşmaktadır. Bunlar, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides* (Turnbull vd., 1990), *B. pseudomycoides* (Nakamura, 1998) ve *B. weihenstephanensis* (Lechner vd., 1998) bakterileridir.

B. thuringiensis ilk kez 1901 yılında Japon bakterioloğu Ishiwata (1901) tarafından hastalıklı ipek böceği larvalarından izole edilmiştir. Aoki ve Chigasaki (1915) adlı araştırcılar bakteriyi tanımlamışlardır. Spor bulunan hücelerde inklüzyon yapılarının varlığını Berliner (1911; 1915) ve Mattes (1927) rapor etmişlerdir. Angus (1954), ipek böceği larvalarının orta bağırsaklarında *B. thuringiensis*'in spor oluşmuş hücelerinde toksik bir maddenin oluştuğunu bulmuştur. Daha sonra aynı araştırcı (Angus, 1956) toksik maddenin parasporal yapı içinde olduğunu keşfetmiştir. Hannay ve arkadaşları (1955) bu yapının protein yapıda olduğunu belirlemişlerdir.

Hastalıklı ve sağlıklı böceklerden, bitkilerin yaprak yüzeylerinden ve depolanmış ürünlerden de izole edilmiştir (Carozzi vd., 1991; Burges ve Hurst, 1977; Kaelin vd., 1994).

Son zamanlarda yapılan araştırmalara göre *B. thuringiensis*'in Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera ve Mallophaga gibi böcek takımlarında ve ayrıca, nematodlar, keneler ve protozoonlar gibi canlılarda aktivitesi tespit edilmiştir (Feitelson vd., 1992; Feitelson, 1993).



şekil 1. *Bacillus thuringiensis* bakterisinin spor ve kristallerinin elektron mikroskopik görünümü (Monro, 1959).

1.4.2.1.3.2.1. İnektisidal Kristal Proteinin Hedef Böceklerdeki Etki Mekanizması

B. thuringiensis'in biyolojik aktivitesi Coleoptera, Diptera ve Lepidoptera gruplarındaki hassas böceklere karşı kristal protein (*cry*) genlerinin oluşturduğu aktif inektisidal kristal proteinler (ICP) sayesinde. Bu proteinin etkili olabilmesi için sindirilmesi gerekmektedir (Visser vd., 1993).

ICP'ler, normal koşullar altında çözünmeden bulunur, bu nedenle insanlar ve diğer yüksek organizma grupları için bir risk oluşturmazlar. Buna karşılık pH 9,5'de çözünebilir özellik taşımaları, kristal proteinlerine yoğun bir inektisit özelliği kazandırmaktadır. Endotoksinler ortabağırsakta çözünerek protoksine dönüşür. Daha sonra bağırsak enzimleri tarafından protoksinler parçalanarak aktif toksinler elde edilir. Aktif toksinler bağırsak epitel hücrelerinin reseptörlerine tutunarak böceğin bağırsak duvarını felce uğratar ve burayı tahrip ederek gözenekler oluşturur. Böylece, bağırsakta bulunan besin artıkları böcek vücuduna ve kana karışır (Şekil 2). Zehirlenen böcek, toksin aktivitesi (toksemi) sebebiyle hemen ölebileceği gibi 2-3 gün içerisinde kan zehirlenmesi (septisemi) sonucu da ölebilir. *B. thuringiensis*'in larvalar üzerinde sebep olduğu belirtiler, yavaş hareket etme, beslenmeyi bırakma, sıvı halde dışkı çıkarma, kusma ve vücut içeriklerinin kahverengiden siyaha dönüşmesi olarak sayılabilir (Knowles, 1994).

B. thuringiensis'in hedef böcek üzerindeki mekanizması Schnepf ve arkadaşları (1998) tarafından özetlenmiş olup, bu mekanizma aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır.

1) Spor ve ICP'lerini taşıyan, *B. thuringiensis*'in larva tarafından alınması ve *cry* toksinlerinin sindirilmesi,

2) ICP'lerin orta barsakta çözünmesi,

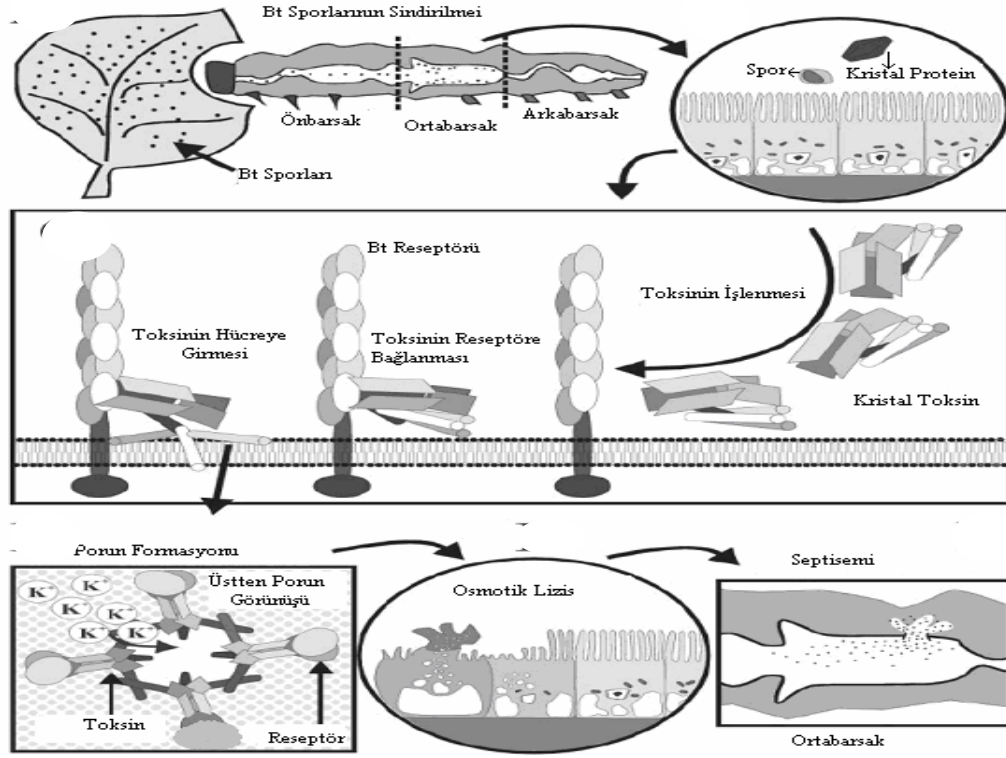
3) ICP'lerinin proteazlar ile aktifleştirilmesi,

4) Aktif ICP'lerinin orta barsak hücre membranlarındaki özgün reseptörlere bağlanması,

5) Hücre membranlarının tahribatı ve barsak hücre membranında kanallar ve deliklerin oluşumu ve epitel hücrelerinin parçalanması (Lüthy ve Ebersold, 1981; Smedley ve Ellar, 1996),

6) Orta barsaktan açılan kanaldan barsak muhteviyatının hemosöle karışması,

7) Larvada fazla miktarda *B. thuringiensis*'in çoğalmasının ve oluşan kan zehirlenmesinin ölümü artırması.



Şekil 2. *Bacillus thuringiensis*'in Cry toksininin hedef böceklerdeki mekanizması (Whalon vd., 2003).

ICP'lerin özgün reseptörlere bağlanmasının insektisidal spektrum ile ilgili olduğu tespit edilmiştir (Denolf vd., 1997). Van Rie ve arkadaşları (1989), tütün (*Heliothis virescens*) ve domates kurtlarının (*Manduca sexta*) fırça şeklindeki membran vesiküllerine bağlandıklarını göstermiştir. Fakat bağlanma yerlerinin sayısı farklıdır ve değişik biyolojik aktiviteler gösterir. Bağlanma yerleri için bütün böceklerde toksin ilgisi aynı değildir.

1.4.2.1.3.3. Böcek Populasyonlarının *Bacillus thuringiensis*'e Dirençliliği

Laboratuvar koşullarında farklı böcek türlerinde *B. thuringiensis*'e karşı dirençlilik tespit edilmiştir (Schnepf vd., 1998). Dirençlilik tespit edilen böcek türleri *Plodia interpunctella*, *Ephesia cautella*, *Leptonatarsa decemlineata*, *Chrysomela scripta*, *Trichoplusiani*, *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens*, *Ostrinia nubilalis* ve *Culex quinquefasciatus*'tur (Schnepf vd., 1998). Direnç oluşturan *B.*

thuringiensis suşları, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* ve diğer *B. thuringiensis* alt türleridir.

Bir çeşit güve olan *Plutella xylostella*'nın, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ve *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*'ya karşı direnç geliştirdiği Hawaii, Filipinler, Endonezya, Malezya, Orta Amerika ve bazı Amerika şehirlerinde görülmüştür (Schnepf vd., 1998). *B. thuringiensis*'lerin direnç mekanizması Schnepf ve arkadaşları (1998) tarafından ayrıntılı olarak incelenmiştir.

1.4.2.1.3.4. *Bacillus thuringiensis* Suşlarının Biyoteknolojisi

B. thuringiensis suşları zararlı kontrol ajanı olarak günümüzde yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. *B. thuringiensis* ürünleri biyopestisit pazarının % 95'ini oluşturmaktadır. Bu ürünlerin çoğu 33 yıl önce izole edilen *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 izolat kaynaklıdır (Dulmage, 1970). *B. thuringiensis*'in oluşturduğu β -ekzotoksin ve δ -endotoksinler tarım zararlılarına karşı kullanılmaktadır. En fazla kullanılan δ -endotoksin; Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera gruplarındaki larvalara karşı etkilidir. Tarım zararlısı Lepidoptera grubuna karşı kullanılan *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* ve diğer suşlarından elde edilen ticari ürünler Tablo 7'de görülmektedir.

Tablo 7. Lepidopteraların kontrolü için ticari olarak kullanılan *B. thuringiensis*'ler

Ticari Adı	Firmanın Adı	<i>B. thuringiensis</i> suşları
Bactospeine	Abbott	<i>kurstaki</i> HD-1
Biobit	Abbott	<i>kurstaki</i> HD-1
Dipel	Abbott	<i>kurstaki</i> HD-1
Florbac	Abbott	Aizawai
Foray	Abbott	<i>kurstaki</i> HD-1
XenTari	Abbott	Aizawai
Cordalene	Agrichem	<i>kurstaki</i> HD-1
BMP 123	Becker	<i>kurstaki</i> HD263
Biobest-Bt	Biobest	<i>kurstaki</i> HD-1
Bacticide	Cequisa	<i>kurstaki</i> HD-1

Tablo 7'nin Devamı

Worm Wipper	Cape Fear Chemicals	<i>kurstaki</i> HD-1
Collapse	Calliope	<i>kurstaki</i> HD-1
Baturad	Cequisa	<i>kurstaki</i> HD-1
Condor	Ecogen	<i>kurstaki</i> EG2348
Crymax	Ecogen	<i>kurstaki</i> EG7841
Cutlass	Ecogen	<i>kurstaki</i> EG2371
Lepinox	Ecogen	<i>kurstaki</i> EG7826
Raven	Ecogen	<i>kurstaki</i> EG2424
Ecotech Bio	Ecogen/ AgrEvo	<i>kurstaki</i> EG2371
Ecotech Pro	Ecogen/ AgrEvo	<i>kurstaki</i> EG2348
Jackpot	Ecogen/ Intrachem	<i>kurstaki</i> EG2424
Rapax	Ecogen/ Intrachem	<i>kurstaki</i> EG2348
Forwarbit	Forward International	<i>kurstaki</i> HD-1
Bio-Worm Killer	Green Light Co	<i>kurstaki</i> HD-1
Bactospeine Koppert	Koppert	<i>kurstaki</i> HD-1
Guardjet	Mycogen/ Kubota	<i>kurstaki</i> Cry1Ac
Maatch	Mycogen	<i>Kurstaki</i> Cry1Ac ve <i>aizawai</i> Cry1C
M/C	Mycogen	<i>aizawai</i> Cry1C
M-Peril	Mycogen	<i>kurstaki</i> Cry1Ac
MVP	Mycogen	<i>kurstaki</i> Cry1Ac
Bactec BT 16	Plato Industries	<i>kurstaki</i> EG2348
Bactec BT 32	Plato Industries	<i>kurstaki</i> HD-1
Insectobiol	Samabiol	<i>kurstaki</i> HD-1
Bactosid K	Sanex	<i>kurstaki</i> HD-1
Soilserv BT	Soil Serv Inc	<i>kurstaki</i> HD-1
Agrobac	Tecomag	<i>kurstaki</i> HD-1
Able	Thermo Trilogy	<i>kurstaki</i> M-200
Agree	Thermo Trilogy	<i>aizawai</i> GC-91
Costar	Thermo Trilogy	<i>kurstaki</i> SA-12
Delfin	Thermo Trilogy	<i>kurstaki</i> SA-11
Desing	Thermo Trilogy	<i>aizawai</i> GC-91
Javelin	Thermo Trilogy	<i>kurstaki</i> SA-11

Tablo 7'nin devamı

Thuricide	Thermo Trilogy	<i>kurstaki</i> HD-1
Turex	Thermo Trilogy	<i>aizawai</i> GC-91
Vault	Thermo Trilogy	<i>kurstaki</i> SA-11
Larvo-Bt	Troy Biosciences	<i>kurstaki</i> HD-1
Troy-Bt	Troy Biosciences	<i>kurstaki</i> HD-1
Ringer BT	Verdant Inc	<i>kurstaki</i> HD-1
Safer BT	Verdant Inc	<i>kurstaki</i> HD-1
BT 320	Wilbur Ellis Inc	<i>kurstaki</i> HD-1

Copping (1998), CDMS (1998), CEPA/DPR (1998)

1.5. Kuru İncir Kurdu'nun (*Ephestia (Cadra) cautella*, Walker, Lep.: Pyralidae) Sistematikteki Yeri

Lepidoptera takımına ait olan Kuru incir kurdu, Pyralidae familyasında yer alan çok önemli polifag bir depo zararlısıdır. Bahçede, sergide ve depodaki kuru meyvelerle beslenir. *E. cautella* başta kuru incir olmak üzere, kurutulmuş fındık, fıstık, ceviz, kayısı, diğer kurutulmuş meyveler, tahıllar, hayvan yemi, kakao, baharat, tahıl ürünleri, kahve taneleri, baklagiller, deri ürünleri ve kabuğu yaralanmış turunçgil meyvelerinde beslenerek zarar yapmaktadır.

- Takım: Lepidoptera
 - Familya: Pyralidae
 - Cins: *Ephestia*
 - Tür: *Ephestia (=Cadra) cautella* Walker (1863)

1.5.1. Tanımı ve Yaşayışı

1.5.1.1. Ergin

Ephestia cautella'nın erginleri 9-11 mm boyunda, kanat açıklığı 14-21 mm, ön kanatlar gri, apikal ve kaide kısımlarına yakın zigzaglı enine bant şeklinde iki bant bulunmakta, kaidedeki bant koyu renkte, kanat kenarına dik inmekte, oldukça geniş ve iç kenarı boyunca soluklaşmakta, apikaldeki bant çok donuk ve bariz olarak görülmemekte,

arka kanatlar açık gri renktedir. Kanatlardaki bu zigzaglı çizgiler *Ephestia* cinsini diğer birçok depo zararlısı cinslerinden ayıran bir özelliktir. Üst kanat boyu gri, üst kanattaki iç bant koyu ve kenarlara dik iner. Bu bant oldukça geniş ve devamlı, iç kenarı boyunca soluklaşır. Dış bant ise, çok donuk ve belirgin değildir, alt kanat ise daha açık gri renktedir. *Ephestia* türlerini birbirinden ayırmada alt kanat damar aralarındaki açıklıklar kullanılarak yapılır. Fakat en kesin ayırma yöntemi kelebeklerin dişi ve erkek organlarının farkıdır. Ergin dişiler kuyruk kısımları yukarı kalkık olmasıyla erkeklerden ayırt edilebilir.

1.5.1.2. Yumurta

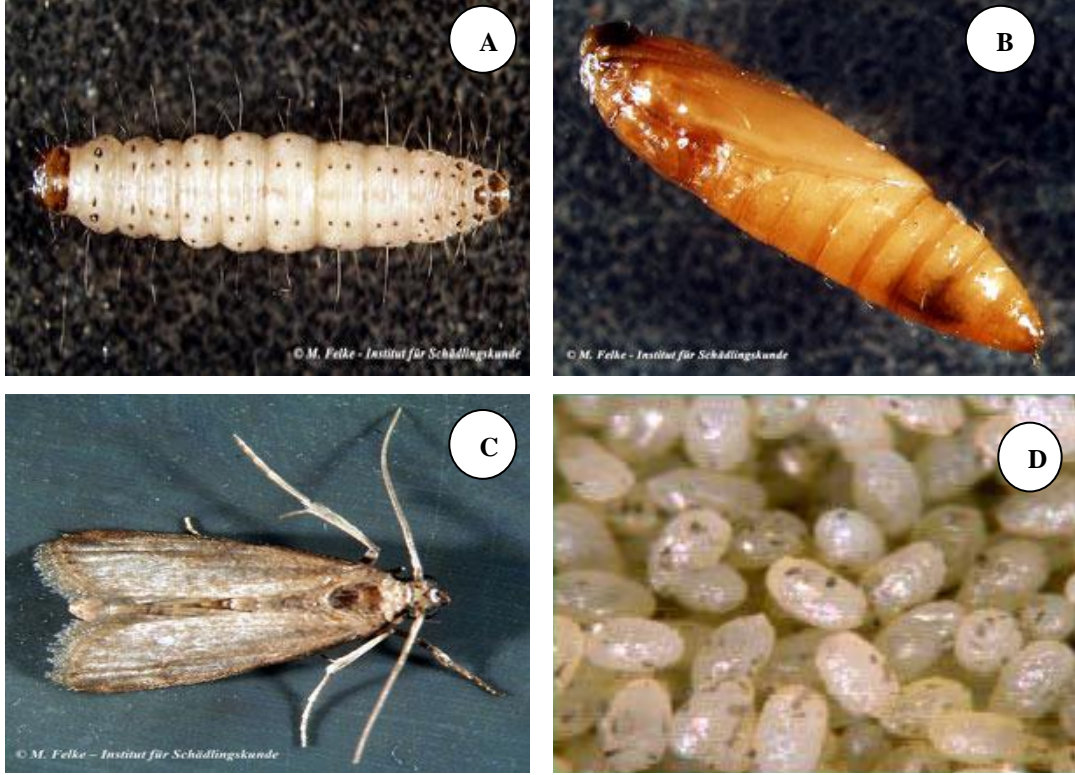
Ergin dişi, çiftleştikten kısa bir süre sonra yumurta koymaya başlamakta, yumurta bırakma süresi 3-4 gün kadar sürmekte, yumurtalarının çoğunu birinci ve ikinci günlerde koymaktadır. Bir dişi, 134-356 adet yumurta bırakmakta, yumurtalarını bahçe, sergi yerinde ve depolarda kurumakta olan kuru incirlerin boyun noktası yakınlarındaki girintilere veya incirin ağız noktasındaki pulcuklar arasına teker teker yerleştirmekte, çuvala doldurulmuş veya üzeri örtülü incirlerde ise örtü materyali ile incirin temas ettiği girinti yerlerine teker teker bırakmaktadır. Yumurta ilk bırakıldığında saydam beyaz, sonradan kirli beyaz, kirli sarı ve açılmaya yakın açık turuncu renktedir ve yaklaşık olarak 0,4 mm boyundadır (Şekil 3). Yumurta bırakma zamanı gece veya alaca karanlıktır. Ergin bir tehlike hissedince yumurtalarını gruplar halinde de bırakabilmektedir. Yumurtalar normal şartlarda 3-4 günde açılmakta, çıkan larvalar 5-7 gömlek değiştirerek pupa olmaktadır (URL-2, 2013).

1.5.1.3. Larva

Olgun larva kirli beyaz, pembemsi krem ve açık yeşile kadar değişir. Dorsali pembemsi olup yaklaşık olarak 10 mm boyundadır. Abdominal segmentlerin I. ve II. kılları dibinde pigmentler bulunur. Kılların çıkış yerlerindeki pigmentleşmiş tabakadan dolayı ilk bakışta abdomen çizgili bir görünüş arzeder (Şekil 3). Bu pigmentleşme *E. cautella*'yı *P. interpunctella*'dan ayıran bir özelliktir.

1.5.1.4. Pupa

Olgunlaşan larva bulunduğu yerde ağ örür. İncirlerin bulunduğu yerlerde veya depodaki yarık ve çatlaklarda yerleşir ve burada ağ öreerek pupa evresine girer.



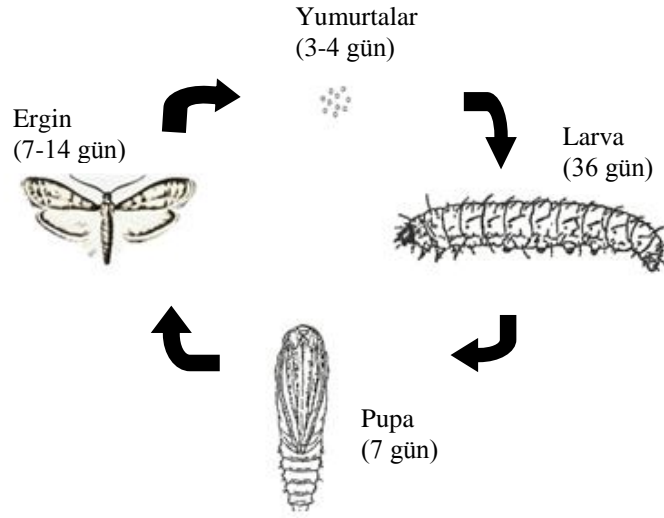
Şekil 3. *Ephestia cautella*'nın biyolojisi A) Larva B) Pupa C) Ergin ve D) Yumurta (URL-3, 2012).

1.5.2. *Ephestia cautella*'nın Hayat Evresi

E. cautella erginleri geceleri daha aktiftir. Erginler geceler ışığa gelmekte ve yumurta bırakmaktadırlar. Daha önce *E. cautella*'nın gelişme süresi, yaşam süresi ve yumurta verimiyle ilgili birçok çalışma yapılmıştır. *E. cautella*'nın farklı besinlerle beslenmesinin gelişme süresi, yaşam süresi ve yumurta veriminde önemli farklılıklara neden olduğu sonucuna varılmıştır.

Ergin böcekler, yumurtalarını, bahçede kurumuş meyvelere, sergide kurumakta olan meyvelere ve kurutularak depolara alınmış meyvelere bırakır. Yumurta bırakma, gece veya alaca karanlıkta olur ve 3-4 gün sürmektedir. Yumurtaları genellikle meyvelerin girintilerine bırakır. Erginler 1-2 hafta yaşarlar. Bırakılan yumurtalar uygun koşullarda 3-4

gün içersinde açılır. Çıkan larvalar kuru meyvenin içersine girerek beslenmeye başlar. Larvalar 5-7 gömlek değıştirerek meyve içlerinde, depoların kırık ve çatlaklarında pupa olur. Larvaların gelişme süresi yaklaşık olarak 36 gündür. Pupa evresi ise yaklaşık olarak 7 gün sürmektedir. Yumurtadan ergin oluncaya kadar geçen süre 40-57 gün arasındadır (Şekil 4). Karadeniz Bölgesi fındık depolarında üç, Ege Bölgesi incir depolarında ise sergilerde yumurta bıraktıkları incirlerin depolara alınması sebebiyle dört döl vermektedir (URL-2, 2012).



Şekil 4. *Ephestia cautella*'nın hayat evresi

1.5.3. Zarar Şekli, Ekonomik Önemi ve Yayılışı

Ephestia cautella depolanabilir meyve üretimi fazla olan ülkemizde (İzmir, Manisa, Aydın, Denizli, Muğla ve Malatya) yoğun olup, Yunanistan, İtalya, Sicilya, Fransa, Portekiz, İspanya, İsviçre, Almanya, İngiltere, Rusya, Çin, Japonya, Tunus, Cezayir, Yeni Zelanda, Brezilya ve Avustralya gibi dünyanın birçok yerinde yayılış göstermektedir (Ertürk, 1963). Polifag bir depo zararlısı olup başta Ege bölgesinde kurutulmuş incir olmak üzere kestane, iç fındık, kuru kayısı, ceviz, antepfıstığı, badem, susam, ayçiçeği, keçiboynuzu, hububat ve mamüllerinde, hatta süt tozunda zarar oluşturmaktadır.

Yumurtadan çıkan larvalar buldukları gıda ortamında beslenerek ürün kayıplarına neden olur. Buna ek olarak çıkardıkları pislikler ve değıştirdikleri gömlek ve baş kapsülü kalıntıları ile ürünün niteliğinin bozulmasına neden olurlar (Şekil 5). Larvalar

beslenirken ağ örerek tahıl tanelerini kümeleştirmekte, yoğun bulaşmalarda üründe kızışma sonucu sıcaklık yükselmekte ve kötü kokular oluşmaktadır (Subramanyam ve Cutkomp, 1985).

Tüm bunların neticesinde de ürünün değeri iç ve dış pazarda kaybolmuş olur. Zararın görülüp ilaçlama yapılmadığı durumlarda, böcek kısa sürede çoğalır ve zararı büyük boyutlara ulaşır.



Şekil 5. *Ephestia cautella*'nin çeşitli zarar şekilleri (URL-4, 2013 ve URL-5, 2012).

1.5.4. *Ephestia cautella* ile Mücadele Yöntemleri

Günümüze kadar birçok yöntem kullanılarak hem dünyada hem Türkiye'de *Ephestia cautella* ile mücadele edilmeye ve zararı en az seviyede tutulmaya çalışılmaktadır. Bir ergin *E. cautella*'nin 134-356 yumurta bıraktığı göz önüne alınca bulaşmayı önlemenin önemi daha çok fark edilmektedir.

E. cautella, zararı bahçede, sergi (kurutma) ve depo dönemlerinde vermektedir. Bundan dolayı zararlıyla mücadelede bu üç farklı dönemde mücadele etmek gerekir. Asıl amaç depoya zararlılardan arındırılmış ürün koymaktır. Öncelikli olarak zararlıyla mücadele bahçe döneminde başlatılır, bulaşmanın devam etmesi durumunda sergi ve depolarda mücadele şeklinde devam etmektedir.

Bahçelerde zararlıyla bulaşık olan meyveler toplanıp imha edilmel ve incir bahçelerinde incirin dölleni için bahçelere koyulan ilek incirleri dölleni sonunda toplanıp imha edilmelidir. Zararlı erginleri gece aktif oldukları için kurutmaya bırakılan meyveler gece kapatılmalıdır. Depolarda gece ışık yakılmamalıdır. Ayrıca kurutulan ürünler depoya alınmadan önce, depolarda *E. cautella* son dönem larvalarının pupa olmasına imkan sağlayan depolarda kırık ve çatlak yüzeylerin olmamasına dikkat edilmeli ve depoya ürün gelmeden depo temizlenmelidir.

Depoya alınan ürünün korunması için çeşitli tuzaklar kullanılır. Bunların başında yapışkan feromon tuzaklar gelmektedir. Bu tuzaklar *E. cautella* erginleri için kullanılmaktadır.

Gamma ışınlamasının *E. cautella* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) erginlerinin üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, ışınlamanın ergin ömür uzunluğunu etkilediği, verimliliği azalttığı ve yüksek derecede steriliteye neden olduğu tespit edilmiştir (Calderon ve Gonen, 1971).

İngiltere’de 1970’li yılların sonundan beri *E. kuehniella* (Zell.), *Ephestia cautella* (Walk.), *E. elutella* (Hbn.) gibi depolanmış ürünlerde zarar veren Lepidoptera türlerinin izlenmesinde ve belirlenmesinde (9Z-12E)-9,12-tetradecadienyl acetate dişi cinsiyet feromonunun kullanılmakta olduğu bilinmektedir.

İtalya’da gıda fabrikalarında zarar yapan *Plodia*, *Ephestia* ve *Trogoderma* spp’nin izlenmesinde seks feromonlu tuzakların kullanılabileceği, ayrıca kimyasal uygulamaları minimuma indirmek amacıyla tuzakların da kullanıldığı Entegre Mücadele yönetiminin uygulanması gerektiğini vurgulamışlardır (Coşkuncu, 2005).

Bodwitch ve Madden (1996), bir şeker fabrikasında *E. cautella* erginlerini izlemek amacıyla bir feromon tuzak sistemi kurmuşlar ve pyrethrin uygulamalarının *E. cautella*’nın yayılmasına ya da erkek güvelerin yakalanma oranına çok az etkili olduğunu tespit etmişler. Başarılı bir mücadele için *E. cautella* erginlerinin feromon tuzaklarla izlenmesi yanında depo temizliğine önem verilmesinin ilaç uygulamasından daha etkili olacağı sonucuna varmışlardır.

Sifner ve arkadaşları (1983), bir çikolata fabrikasında yaptıkları 2 yıllık bir kitle halinde yakalama çalışmasında, *E. cautella* erginlerinin düşük populasyonları için kitle halinde yakalama yönteminin kullanılabileceğini ve yüksek populasyonlarda başlangıçta bir insektisit uygulaması ile populasyonun düşürülmesinin uygun olacağı sonucuna varmışlardır.

Hali hazırda diğer depolanabilir ürün zararlıları için kullanılan kimyasal ilaçların büyük bir kısmı *E. cautella* için de kullanılmaktadır. Kimyasal ilaçlama *E. cautella* için öncelikle meyvenin bahçede olduğu dönem başlatılır. Fakat kurutmaklık incir, bahçe döneminde dölleniş için ilek incirleri kullanılır ve bu dölleniş ilek sinekleri aracılığıyla gerçekleşir. *E. cautella*'ya bahçede yapılacak olan ilaçlamada incirin döllenişini sağlayan ilek sinekleri de etkilenecektir. Bundan dolayı bahçe ve sergi döneminde bulaşmayı önlemek için diğer mücadele teknikleri uygulanmaktadır. Asıl kimyasal ilaçlama ürünün depoya alınmasından önce ve sonra gerçekleşir. Bu ilaçlama fumigasyon şeklinde gerçekleşir. Aluminium phosphide, bromophos, chlorpyrifos methyl, dichlorvos, malathion ve methyl bromide, *E. cautella* için en çok kullanılan fumigantlardır. Fakat depolarda kullanılan birçok pestisit'e zararlıların direnç geliştirdiği bilinmektedir. Depolarda kullanılmakta olan malathion, chlorpyrifos-methyl, fenitrothion, pirimiphos-methyl, etrimfos ve benzeri birçok etkili maddeye karşı bazı ülkelerde önemli bazı depolanmış ürün zararlılarında direnç geliştiği bildirilmektedir (Arthur, 1996).

Metil bromitin Montreal protokolüne göre getirilen sınırlama ile *E. cautella* için daha çok metalik fosfin kullanılmaya başlanmıştır. Uslu ve arkadaşlarının (2010) yaptığı bir çalışmada *E. cautella*'nın bütün evrelerinin (yumurta, larva, pupa ve ergin) 20°C'de düşük düzey fosfine maruz bırakılmasıyla *E. cautella*'nın bütün evrelerinde 2 günün sonunda % 100'lük bir ölümün gözleendiği bildirilmiştir.

Bell (1976) *E. cautella*'nın farklı evrelerinin, değişik sıcaklıklarda PH₃'e olan hassasiyetlerini çalışmıştır. Araştırmacı, bu türde genç yumurtaların yaşlı olanlarına kıyasla daha dayanıklı olduğunu saptamıştır. Çalışmada 25°C'de 0,2 mg/l PH₃ konsantrasyonunda (144 ppm), 24 saatlik uygulama sonucunda 0-1 günlük *E. cautella* yumurtalarında ölüm oranının % 27 olduğu saptanmıştır. Aynı koşullarda 1-2 günlük *E. cautella* yumurtalarında ölüm oranının % 90'ın üzerinde olduğu; 2-4 günlük *E. cautella* yumurtalarında ise ölüm oranının % 100 olduğu saptanmıştır. Çalışmada uygulama süresi 72 saate çıkarıldığında ise *E. cautella*'nın tüm yaş grupları için ölüm oranlarının % 100 olduğu bildirilmektedir.

Donahaye ve Navarro, 2001 yılında yaptıkları bir çalışmada *E. cautella*'nın kontrol edilebilmesi için düşük oranda metil bromide (MeBr) ve karbon dioksit (CO₂) gaz karışımı kullanmışlar ve *E. cautella*'nın bütün evrelerinin (yumurta, larva, pupa ve ergin) % 10 CO₂ ve MeBr karışımında yaklaşık olarak 30,8 mg.h/L'de tamamen kontrol edildiği bildirmişlerdir.

Akan ve Ferizli (2011), yasaklanmış olan Metil bromidin yerini dolduracak özellikte ve fosfine alternatif bir fümigant olan “sülfürlü florit (SO_2F_2)’in *Ephestia cautella*’nın pupa evresine etkisini” çalışmışlardır. Sülfürlü florit; ahşap zararlılarına ve termitlere karşı Amerika Birleşik Devletleri’nde 1960’larda ruhsatlandırılmış olup, en yüksek kalıntı limiti değerlerinin belirlenmesinin ardından birçok ülkede olduğu gibi ülkemizde de 2009 yılında depolanmış ürünlerde kullanımı amacıyla ruhsatlandırılmıştır. Kontrol gruplarında ölüm oranının % 4 - 5 olarak belirlendiği araştırmada, 10 g/m^3 dozda % 100 orana ulaşıldığı için, mutlak ölüm için doz 10 g/m^3 olarak belirlenmiştir.

Birçok zararlıının olduğu gibi *E. cautella*’nın da birçok doğal düşmanı mevcuttur. Zararlıyla yapılan bir diğer mücadele şekli de bu düşmanları yani parazitoitlerini kullanarak yapılan mücadeledir. *E. cautella*’nın doğal düşmanları; *Cepholonomia tarsalis*, *Holepyris hawaiiensis*, *Apentelca serula*, *Bracon hebetor*, *Phonerotoma fravitestacea*, *Euchalcida nigripes*, *Diadegma chrysosticta*, *D. ohryacetieta*, *Hessestorun transfuga*, *Mesostenus transfuga*, *Nemeritis canescens*, *Pachyrepoides vindemiane*, *Mintho praeceps*, *Elattisecius mali*, *Melishares tarsalis*, *Rhinocoris punctiventris*, *Microbracon hebetor* ve *Trichogramma evanescens*’dir.

Bunlardan etkili bir parazitoit olan *B. hebetor*’un, ABD’deki boş fıstık depolarındaki ürün artıklarından çıkan *Cadra cautella* larvaları üzerinde % 97 oranında etkili olduğu belirtilmektedir (Cline vd., 1983). Ülkemizde Aydın-Köşk’de incir depolarında zarar meydana getiren *Ephestia cautella* üzerinde yapılan çalışmalarda parazitoidin etkinliğinin % 94,7’ye ulaştığı tespit edilmiştir (Tunçyürek, 1972). Böylece, Ege Bölgesi’nde kuru incirlerde önemli zararlara sebep olan *Ephestia* türlerine karşı *Bracon hebetor* türü ile ilgili kitle üretim ve salım çalışmaları yapılmıştır. Bu parazitoit baskısının olgun larva popülasyonu üzerinde oldukça etkili olduğu, fakat zararın önlenmesi yönünde yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır (URL-1, 2013).

Ertürk (1963) Ege bölgesinin İzmir ve Aydın illeri çevresinde incir depolarında çok yaygın olan *Microbracon hebetor*’un incir zararlısı *E. cautella*’nın üzerinde oldukça etkin olduğunu bildirmektedir. Yazara göre, incir depolarında *E. cautella* larvaları Eylül başlarında görülmekte, ancak parazit bu zararlıya karşı ekim ayı sonlarında tam anlamıyla etkili olabilmektedir. Bu nedenle yazar bu depolara ağustos ayı sonuna doğru parazitoit salımı yapılmasını önermektedir.

Cline ve arkadaşlarına (1984) göre, parazitoit *B. hebetor* satış için paketlenmiş kuru üzüm ve mısırunu paketlerinin içinde ve çevresinde meydana gelen *E. cautella* bulaşmasını

önemli ölçüde azaltmıştır. Fakat parazitoid, oldukça ince yapıda olan yada zararlı bulaşmasına karşı fazla dayanıklı olmayan paketlerdeki bulaşmayı engellemede yetersiz kalmıştır. Dolayısı ile, biyolojik mücadele çalışmaları açısından böcek zararına karşı dayanıklı paket kullanılmasının parazitoidin etkinliğini artırması açısından önemli olduğu, zararlının paket içine girmesinin engellenmesinin parazitoidin konukçuyu bulmasını kolaylaştırdığı kanıtlanmıştır.

Biyolojik mücadele araştırmaları sadece parazitoidlerle kalmamış, mikrobiyal mücadele alt başlığı altında araştırmalar devam etmiştir. *E. cautella*'nın kontrol altına alınması aşamasında hem çevreye hemde insana zarar vermeyen güvenilir biyopestisitler geliştirilmesi aşamasında önemli adımlar atılmıştır. Bu zararlı için bir mikrobiyal mücadele etmeni araştırmaları entomopatojenik bakteriler ve virüsler üzerinde yoğunlaşmıştır. Özellikle *Bacillus thuringiensis* ile çok fazla çalışma yapılmıştır.

E. cautella ve *P. interpunctella*'nın birinci larva dönemi, *B. thuringiensis*'in 25 mg/kg-buğdaylık dozu ile kontrol edilebilirken, bu türlerin beşinci dönem larvaları ancak 150 mg/kg-buğday dozu ile tam olarak kontrol edilebilmiştir (Nwanze vd., 1975). Tam kontrolün sağlanabilmesi için *E. kuehniella*'nın beşinci dönemi birinci dönemden 21,67 kat, üçüncü dönemi ise birinci dönemden 6 kat daha fazla "gram başına yaşayabilir spor"a gerek duymuştur (Subramanyam ve Cutkomp, 1985). 100 mg/kg diyetlik doz ile *E. cautella*'nın birinci dönemdeki larvaları tamamen öldükleri halde 200 mg/kg'lık dozla *P. interpunctella*'nın aynı yaştaki larvalarının ancak %85'i ölmüştür (McGaughey, 1978a). Patojenin larvalara toksik etkisi dışında larval dönemlerin uzaması ve üreme güçlerinin azalmasına da neden olmaktadır. Gram başına 7×10^5 yaşayabilir spor içeren bir besinle beslenen *E. kuehniella*'nın birinci larva dönemi normale göre 3 kat uzamıştır (Subramanyam ve Cutkomp, 1985). Ayrıca Malathion'a dayanıklı bireylerle yapılan denemelerde, bu bireylerde *B. thuringiensis*'e karşı bir tolerans veya direnç kaydedilmemiştir (Kinsinger ve McGaughey, 1979). İlk defa 1959'da depolanmış mısır ve buğdayda *B. thuringiensis*'in $12,5 \times 10^6$ spor/g-tahıl dozunun 10-14 günlük *P. interpunctella* larvalarını öldürdüğünü göstermiştir (Subramanyam ve Cutkomp, 1985). Depolanmış mısırdaki *E. cautella*, soyada *P. interpunctella* larvaları 10 mg/kg-ürün dozundaki *B. thuringiensis* ile tam olarak kontrol edilebilmiştir (McGaughey, 1975). Buna karşılık 250 mg/kg'lık doz *S. cerealella* larvalarını tam olarak etkilemediğinden bunların % 37'si ergin olmuştur (McGaughey, 1975). Diğer bir araştırmada ise bu türe 600 mg/kg doz uygulandığı halde larvaların % 30'u ergin olmuş, ancak F₂ ergin çıkışı % 86 oranında

azalmıştır. *S. cerealella* larvalarının mücadelesindeki bu zorluğun, yumurtadan çıkan larvaların kısa zamanda tane içine girmesi ve bu arada patojenle beslenme süresinin kısa olması nedeniyle olabileceği düşünülmektedir (McGaughey ve Kinsinger, 1978).

Bakteri preparatının uygulama derinliği de ürün içindeki larvaların etkilenmesi açısından önemli olmaktadır. Depolanmış mısırın 10 cm kalınlığındaki bir tabakasının 125 mg/kg-tahıl dozundaki preparat ilaçlanması ile *P. interpunctella* zararının % 87, *E. cautella*'nın ise % 90 oranında azaldığı gözlenmiştir (McGaughey, 1978b). Aynı dozdaki uygulamalar buğdaydaki bu iki türe ait larvaları 2 yıl süreyle etkilemiş ve tanedeki zarar % 94 oranında azalmıştır (McGaughey, 1980). Rassman (1986) 500 ton çavdarı düz bir zemine yaydıktan sonra 5 cm kalınlığındaki bir tabakaya 100 mg/kg dozunda Thuricide vererek 19 hafta sonra *E. elutella* zararının kontrole göre % 50 oranında azaldığını belirlemiştir. McGaughey ve Dicke (1980), burğu ile siloya aktarılan tahıla, damlatma yolu ile veya depolandıktan sonra yüzey ilaçlaması şeklinde bakteri preparatını vermişler, taneler üzerinde spor dağılımının homojenitesi, spor sayısı ve *E. cautella*'ya etkileri bakımından önemli bir fark gözlememişlerdir. Damlatma metodunda, sulu süspansiyonun devamlı olarak çalkalanarak dengeli bir dağılımın sağlanması, aynı zamanda doğru bir kalibrasyonun yapılması gerekir. McGaughey (1985), ABD'nin 5 eyaletindeki ticari silolarda *B. thuringiensis*'in toz ve ıslanabilir toz (WP) formülasyonlarını mısır ve buğdayda denemiştir. Elevatörle siloya aktarma sırasında verilen toz ve WP preparatı homojen bir dağılım göstermiştir. *P. interpunctella*'ya etkinlikleri buğdayda % 50-60, mısırdaki % 80 oranında ve her iki uygulama için eşit düzeyde olmuştur (McGaughey, 1985). Dolu silonun üst boşluğuna püskürtülmesiyle WP formülasyonunun etkinliğinde bir artış görülmemiştir. Kansas'ta çiftlik ve laboratuvar şartlarında toz Dipel, depolanmış mısırın yüzeyine uygulandıktan sonra kurutma fanları ile tahılın derinliğine doğru hava verilmiş; toz Dipel'in % 25'inin tahılın 2,5-12,5 cm derinliğine kadar işlediği ve *P. interpunctella*'ya % 93 oranında etkili olduğu tespit edilmiştir (McGaughey, 1986).

Hunter ve Hoffmann (1970) tarafından granulosis virüsünün birinci dönem *Ephestia cautella* larvalarındaki patojenitesi test edilmiştir. Bu çalışmada 12×10^1 , 12×10^2 , 12×10^3 , 12×10^4 ve 12×10^5 (kapsül/g) konsantrasyonlarda sırasıyla ortalama olarak % 1, 12, 36, 74 ve 100'lük ölümler gözlenmiştir.

1.6. Çalışmanın Amacı

Yukarıda belirtilen tüm çabalara rağmen, kuru incir kurdu (*Ephestia cautella* Walker., Lepidoptera: Pyralidae)'nun kuru incir ve çeşitli depolanabilir tarım ürünlerindeki zararı ülkemizde ve tüm dünyada hala etkin bir şekilde devam etmektedir. Bunun sonucunda işgücü ve ekonomik değer kaybına sebep olmaktadır. Özellikle bir tarım ülkesi olan ülkemiz için bu ekonomik değer kaybı daha da önemli olmaktadır.

Ayrıca, kuru incir kurdunun başka bakteriyal izolatlar üzerinde çalışma yapılmış olmasına rağmen, kültüre edilebilir bakteriyal flora ve bu flora üyelerinin zararlı üzerindeki patojenite çalışmaları da henüz yapılmamıştır.

Bu zararlının etkinliğini azaltmak veya ortadan kaldırmak elzem bir konu haline gelmiştir. Bu düşünceler ışığında yapılan bu tez çalışmasının amacı, ülkemiz ve dünyada önemli depolanabilir tarım zararlılarından biri olan *Ephestia cautella*'ın kültüre edilebilir bakteriyal florasını belirlemek ve bunların, zararlıya karşı mikrobiyal mücadelede kullanılma potansiyellerini araştırmaktır. Ayrıca, değişik zararlılardan izole edilmiş ve çeşitli zararlılar üzerinde yüksek öldürücü etkiye sahip oldukları bilinen çeşitli *Bacillus* cinsi bakteriyal izolatların (Mnd ve BnBt) zararlı üzerindeki etkilerini tespit etmek ve bu etkileri karşılaştırarak *E. cautella*'ya karşı yeni bir mikrobiyal mücadele etmeni belirlemek amaçlanmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. *Ephestia cautella*'nın Toplanması

Çalışmada öncelikle bakteri izolasyonu için ölü, hastalıklı ve sağlıklı bireyler toplanması gerekmektedir. Bunun için Aydın'nın Erbeyli ilçesinde bulunan Erbeyli İncir Araştırma Enstitüsü atık incir depolarından, bakteri izolasyonu için gerekli *Ephestia cautella* (Lep.: Pyralidae) (kuru incir kurdu) larvaları, Ekim 2010 tarihinde toplandı. Larvalar, toplandıkları yer ve tarih not edildikten sonra, özel kaplara konularak laboratuvara getirildi. Laboratuvarda larvaların makroskopik incelemeleri yapılarak ölü ve hastalıklı olanlar ayrıldı.

2.2. Bakteri İzolasyonu ve Karakterizasyonu

2.2.1. Bakteri İzolasyonu

Laboratuvara getirilen *E. cautella* larvalarından 10 adet, steril petri kapları içerisine konularak % 70'lik etil alkol ile 5 dk yüzey sterilizasyonuna maruz bırakıldı. Sonra içerisinde steril saf su bulunan petrilere alınarak 2-3 kez yıkanıp, alkolden arındırıldı. Daha sonra homojenizatör tüpüne 1 ml nütrient sıvı besiyeri ilave edildi. Steril homojenizatör ile larvaların iyice ezilmesi sağlandı. Elde edilen karışım bir tülbent ile süzülerek, süzüntü başka bir tüpe alındı. Bu karışımdan 25 µl, 50 µl ve 100 µl alınarak üç ayrı nütrient agar besiyerine ekim yapıldı (Ek-1). Kalan karışım 30°C'de 5-6 saat inkübe edildi. Bu inkübasyonun amacı, karışımda çok düşük sayıda olabilecek mikroorganizmaların sayısını artırarak, sonraki ekimde tespit edilmelerini kolaylaştırmaktır. Bu inkübe edilen karışımdan da 25 µl ve 50 µl alınarak yine nütrient agar besiyerlerine ekim yapıldı. Ayrıca, bu inkübe edilen karışım seyreltildi ve her tüpten 25 µl, 50 µl ve 100 µl alınarak ayrı ayrı nütrient agar besiyerine ekim yapıldı (Sezen vd., 2007).

Son olarak, karışımdan 1 ml alınıp, ependorf mikrosantrifüj tüp içerisinde 80°C'de 10 dk. bekletildi. Bundan da 25 µl, 50 µl ve 100 µl alınarak üç ayrı nütrient agar besiyerine ekim yapıldı. Böylece, yüksek sıcaklığa dayanıklı bakterilerin izolasyonu da sağlandı.

Nütrient agar besiyerine yapılan ekimlerin hepsi 30°C'lik etüvde 2-3 gün süreyle inkübe edildi.

2.2.2. Saf Kùltürlerin Hazırlanması ve Stoklanması

İnkübasyonun ardından nùtrient agar besiyeri üzerinde büyüyen bakteriyel koloniler, binokùler mikroskop altında incelendi ve farklı koloni renk ve morfolojilerine sahip olanlar steril edilmiş platin özeyle dikkatlice seçilerek çizgi ekimleri yapıldı ve saf kùltürler elde edildi. Elde edilen kùltürler, numaralandırılarak, sonraki çalışmalarında kullanılmak üzere % 20'lik steril gliserol içersinde – 80 °C' ve – 20 °C' de stoklandı.

2.2.3. İzolatların Boyanma Özellikleri

2.2.3.1. Gram Boyama

Gram boyama, bakterilerin hücre duvarının içeriği hakkında bilgi veren bir boyama yöntemidir. Gram negatif olarak boyanan bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglikan tabaka, gram pozitif olarak boyanan bakterilere göre çok daha incedir. Gram boyama için herbir izolat nùtrient sıvı besiyerine ekildi ve 30°C'ye ayarlı çalkalamalı inkübatörde 12-16 saat inkübasyona bırakıldı. Büyüyen kùltürlerden bakteriyal smear hazırlandı ve alevden geçirilerek tespit edildi. Hazırlanan smear, 1 dk kristal viole ile muamele edilerek dH₂O ile yıkandı. Kuruması beklenmeden 1 dk Gram iyodu ile muamele edildi. Aseton-alkolle renk giderilinceye kadar yıkandıktan sonra renk kaybını durdurmak için hemen dH₂O ile yıkandı. Safranin ile 30-60 saniye muamele edildi ve smear tekrar dH₂O ile yıkandı. Açık havada kurutulduktan sonra mikroskop altında incelemeye alındı. Mor renkle boyanan bakterilerin gram pozitif, pembe renk ile boyanan bakterilerin ise gram negatif olduğuna karar verildi (Cappuccino ve Sherman, 1992).

2.2.3.2. Endospor Boyama

İzolatların endospor oluşturup oluşturmadığını ve varsa endosporun hücre içersindeki pozisyonunu belirlemek amacıyla, yalnız Gram olumlu izolatlar nutrient sıvı besiyerine ekildi ve 48-72 saat 30°C'ye ayarlı su banyosunda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından bakteriyal smear hazırlandı ve alevden geçirilerek tespit edildi. Hazırlanan smearlar küçük bir filtre kağıdıyla kapatılarak, malaşit yeşiliyle 5 dk su buharı üzerinde boyandı. Daha sonra dH₂O ile yıkandı ve 30-60 saniye safranin ile muamele edildi. Tekrar

dH₂O ile yıkanarak açık havada kurutuldu. Mikroskop altında incelenerek kırmızı renkli hücreler içerisinde yeşile boyanmış sporların varlığı araştırıldı (Cappuccino ve Sherman, 1992).

2.2.4. İzolatların Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.4.1. İzolatların Optimum Büyüme Sıcaklıklarının Belirlenmesi

İzolatların optimum büyüme sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla nütrient sıvı besiyeri içinde yapılan 16-24 saatlik kültürlerden, OD₆₀₀ = 0,1 olacak şekilde yeniden nütrient sıvı besiyerine ekim yapıldı. Hazırlanan kültürler 16, 30, 37, 40, 45, 50 ve 55 °C'lerde büyütüldü. Yapılan bu kültürlerden saat başı örnekler alınarak spektrofotometrede OD₆₀₀'de absorbans değerleri ölçülerek bakterilerin optimum olarak büyüdüğü sıcaklıklar ortaya çıkarıldı (Cappuccino ve Sherman, 1992).

2.2.4.2. İzolatların Büyüyebildiği pH Aralıklarının Belirlenmesi

Büyüyebildikleri pH aralığının belirlenmesi için izolatlar değişik pH değerlerine (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12) sahip nütrient sıvı besiyerlerine inoküle edildi ve 30°C'ye ayarlı etüvde üç gün inkübe edildi. İnkübasyon neticesinde üreme olup olmadığına spektrofotometrede (OD₆₀₀'de) ölçümler yapılarak karar verildi.

2.2.4.3. İzolatların NaCl Toleranslarının Belirlenmesi

İzolatların NaCl toleranslarının belirlenmesi amacıyla % 1, 3, 5, 7, 9, 11 oranında NaCl eklenmiş nütrient sıvı besiyerleri hazırlandı. Bu besiyerlerinden 4'er ml deney tüplerine alınarak herbir izolattan bunlara ekim yapıldı ve 2 gün boyunca 30°C'ye ayarlı etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda üreme olan ve olmayan tüpler belirlenerek, izolatların hangi oranlarda tuzu tolere edebildiklerine karar verildi (Sneath, 1968).

2.2.5. İzolatların Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.5.1. Nişasta Hidroliz Testi

İzolatların nişastayı hidroliz edip etmediklerinin belirlenmesi için “nişasta agar besiyerleri” hazırlandı (Ek-1). Bu besiyerini içeren petrilere herbir izolattan çizgi ekim yapıldı ve petrilere 3-7 gün boyunca 30°C’ye ayarlı etüvde bekletildi. İnkübasyondan sonra petrilere lugol ilave edildi ve koyu kahverengi rengin oluşumu nişastanın hidroliz olduğunu, mavi rengin oluşumu ise nişastanın hidroliz olmadığını gösterdi (Benson, 1985).

2.2.5.2. Katalaz Testi

Bakteriler, aerobik solunum sırasında hidrojen peroksit (H_2O_2) ve bazı durumlarda ise tamamen toksik olan süperoksitler üretmektedir. Mikroorganizmalar, oluşan bu ürünlerin olumsuz etkisinden, bu maddeleri katalaz ve peroksidaz enzimlerinin yardımıyla yıkarak kurtulmaya çalışırlar. İzolatların katalaz enzimi üretilip üretilmediğini ortaya çıkarılması amacıyla “triptik soy agar besiyeri” hazırlandı (Ek-1). İzolatlar bu besiyeriye içeren petrilere ekildikten sonra, 24-48 saat 30°C’de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından petrilere % 3’lük H_2O_2 çözeltisi ilave edildi ve oluşan gaz kabarcıklarına göre testin pozitif olduğuna karar verildi (Cappucino ve Sherman, 1992).

2.2.5.3. Oksidaz Testi

İzolatların oksidaz enzimi üretilip, üretilmediğinin belirlenmesi amacıyla triptik soy agar besiyerleri hazırlandı. Herbir izolattan bu besiyeriye içeren petrilere çizgi ekim yapıldı ve 30°C’de 24-48 saat inkübe edildikten sonra petrilere oksidaz testi ayırıcı ilave edildi. Oluşan siyah renge göre testin pozitif olduğuna karar verildi (Benson, 1985).

2.2.5.4. Metil Kırmızısı Testi

Bu test fermentasyon esnasında glukozdan yüksek miktarda asit üreten bakterileri, nötral aseton üretenlerden ayırmak için yapılır. Eğer bir bakteri glukozdan yüksek miktarda organik asit üretirse, metil kırmızısı ortama ilave edildiğinde kırmızı olarak kalır. Bu

pH'nın 4,4'ün altında olduğunu gösterir. Fermentasyon sonucunda nötral maddeler üretilirse, metil kırmızısı sarıya dönüşür. Bu pH'nın 6,0'nın üzerinde olduğunu gösterir.

Bu test için "MR broth besiyeri" hazırlandı (Ek-1) ve steril edilmiş, kapaklı deney tüplerine 4'er ml döküldü. Herbir izolattan besiyeri içeren tüplere ekim yapıldı. 30°C'de, 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından herbir izolatın bir tüpüne, 250 µl metil kırmızısı ilave edildi. Kırmızı renk oluşumunun MR testi için pozitif, sarı renk oluşumunun negatif sonuç olduğuna karar verildi.

2.2.5.5. Üre Hidroliz Testi

Bazı bakteriler üreaz enzimi üreterek, üreyi alkalik bir son ürün olan amonyak ve CO₂'e dönüştürürler. İzolatlarda üreaz enziminin varlığının belirlenmesi amacıyla "üre hidroliz besiyerleri" hazırlandı (Ek-1). Herbir izolattan besiyerine ekim yapılarak, 30°C'de 48-72 saat inkübe edildi. Eğer izolatlar üreaz enzimi üretiyorlarsa, ürenin amonyağa parçalanması sonucu alkali bir ortam oluşur. Bu da, besiyeri içerisinde indikatör olarak bulunan fenol kırmızısının, besiyerinin rengini koyu pembeye dönüştürmesine yol açar. İnkübasyonun sonucunda besiyerinin koyu pembeye dönüşüp dönüşmediğine bakılarak testin sonucuna karar verildi (Cappucino ve Sherman, 1992).

2.2.5.6. İndol Oluşumu Testi

Triptofan aminoasidi bazı bakteriler tarafından karbon, azot ve enerji kaynağı olarak kullanılırken, bazı bakteriler tarafından da maddelerin enzimatik yollarla oksidasyonlarını arttırmak amacıyla kullanılır. Bakteriler triptofan aminoasidi içeren besiyerlerinde büyüdüklerinde, triptofanaz enzimi üretilir, triptofanı parçalayarak indol, pirüvik asit ve amonyum oluşumunu sağlarlar. Bakterilerin triptofanı kullanıp kullanmadıkları, ortamda indolün varlığı veya yokluğu ile anlaşılır.

Bu test için "triptofan broth besiyeri" hazırlandı (Ek-1). Steril tüplere 3'er ml döküldü ve herbir izolattan tüplere ekim yapıldı. 30°C'de, 48 saat inkübe edildi. Daha sonra tüplere ayıraç olarak 1 ml kovak kimyasalı (Ek-1) ilave edildi. Tüpün üst kısmında kırmızı bir halkanın oluşup oluşmamasına göre testin sonucunun pozitif veya negatif olduğuna karar verildi.

2.2.6. API 20 E Panel Test Sistemi

API 20 E panel testi gram negatif bakterilerin tür seviyesinde tanımlamalarında kullanılmaktadır. Bu test uygulanırken Triptik Soy Agar besiyeri üzerinde büyütülmüş gece kültürleri bir spatulayla alınarak “API % 0.85 NaCl” solüsyonu içerisinde iyice karışması sağlanır. Hazırlanan bu kültür daha sonra API 20 E panelindeki tüm kuyucuklara dolduruldu. Bu aşamada kuyucuk içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilir.

Tablo 8. API 20 E panel sisteminin içerdiği testler

Testler	Substrat	Belirlenen Reaksiyon	Negatif Sonuçlar	Pozitif Sonuçlar
ONPG	ONPG	Beta-galaktosidaz	Renksiz	Sarı
ADH	Arginin	Arginin dihidrolaz	Sarı	Kırmızı / Turuncu
LDC	Lisin	Lisin dekarboksilaz	Sarı	Kırmızı / Turuncu
ODC	Ornitin	Ornitin dekarboksilaz	Sarı	Kırmızı / Turuncu
CIT	Sitrat	Sitrat kullanımı	Açık yeşil / Sarı	Mavi-Yeşil / Mavi
H ₂ S	Na thiosulfate	H ₂ S üretimi	Renksiz / Gri	Siyah tortu
URE	Üre	Üre hidrolizi	Sarı	Kırmızı / Turuncu
TDA	Triptofan	Deaminaz	Sarı	Kahverengi / Kırmızı
IND	Triptofan	İndol üretimi	Sarı	Kırmızı (2 dk)
VP	Na piruvat	Aseton üretimi	Renksiz	Pembe / Kırmızı (10 dk)
GEL	Kömür jelatin	Jelatinaz	Siyah tabaka dağılmamış	Siyah tabaka dağılmış
GLU	Glukoz	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi-Yeşil	Sarı
MAN	Mannitol	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
INO	İnositol	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
SOR	Sorbitol	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
RHA	Ramnoz	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
SAC	Sucrose	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
MEL	Melibiose	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
AMY	Amigdalın	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
ARA	Arabinoz	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı

Daha sonra bu API panelleri 18-24 saat inkübasyona tabii tutuldu. Elde edilen sonuçlar Tablo 8’de tanımlandığı gibi renklerine bakılarak renk değişimi okuma tablosuna

göre değerlendirildi. Sonuçlar bilgisayar ortamında API tanımla programı kullanılarak elde edildi.

2.2.7. API 50 CH Panel Test Sistemi

API 50 CH, mikroorganizmaların karbonhidrat metabolizmasının çalışabilmesini sağlayan 49 biyokimyasal testten oluşan bir tanımlama sistemidir (Tablo 9). Gram pozitif bakterilerin tür seviyesinde tanımlamaları ve biyokimyasal bazı özelliklerinin belirlenmesinde kullanılır. İzolatların bu test sisteminde değerlendirilmelerinin yapılabilmesi için bir gece önceden bakterilerin genel bir besiyeri olan tripton soy agar (TSA) besiyerine çizgi ekimleri yapıldı. İnkübasyon sonunda elde edilen tek kolonilerden “API 50 CHB/E” besiyeri içerisinde süspansiyon haline getirildi. Hazırlanan bu bakteri karışımı test panellerinin başlangıç gözeneğine ilave edilip panel, dik tutularak bakteri karışımının tüm test kuyucuklarına aynı anda ulaşması sağlanır. Ekimi yapılmış paneller özel bölmelerine yerleştirildikten sonra 24 saat ile 48 saat arasında inkübasyona tabi tutulur. Bu panel sistemini API 20 E’den uygulandığındaki farkı panele sonradan ayıraç ilavesi yapılmamasıdır. Elde edilen sonuçlar Tablo 9’de tanımlandığı gibi renklerine bakılarak yapıldı. Sıfırncı tüp hiçbir kimyasal madde içermediğinden kontrol olarak kullanıldı ve diğer kuyucuklardaki renk değişimi bu kuyucuğa göre değerlendirildi. Veriler bilgisayara aktarılarak tanımlama yapıldı.

Tablo 9. API 50 CH panel sisteminin içerdiği testler

Test	Adı	Test	Adı
GLY	Glycerol	SAL	Salisin
ERY	Erythriol	CEL	D-celiobiose
DARA	D-arabinose	MAL	D-maltose
LARA	L-arabinose	LAC	D-lactose(bovineorgine)
RIB	D-ribose	MEL	D-melibiose
DXYL	D-xylose	SAC	D-saccharose(sucrose)
LXYL	L-xylose	TRE	D-trehalose
ADO	D-adonitol	INU	İnulin
MDX	Methyl-βD-xylopyranoside	MLZ	D-melezitoz

Tablo 9'un devamı

GAL	D-galactose	RAF	D-raffinose
GLU	D-glucose	AMD	Amidon (starch)
FRU	D-fructose	GLYG	Glycogen
MNE	D-mannose	XLT	Xylitol
SBE	L-sorbose	GEN	Gentiobiose
RHA	L-rhamnose	TUR	D-turanose
DUL	Dulcitol	LYX	D-lyxose
INO	İnosidol	TAG	D-tagatose
MAN	D-mannitol	DFUG	D-fruktoz
SOR	D-sorbitol	LFUC	L-fruktoz
MDM	Methyl- α D-mannopyranoside	DARL	D-arabitol
MDG	Methyl- α D-glucopyranoside	LARL	L-arabitol
NAG	N-asetylglucosamine	GNT	Potasyum glukonat
AMY	Amygdalin	2KG	Potasyum 2-ketoglukonat
ARB	Arbutin	5KG	Potasyum 5-ketoglukonat
ESC	Esculin-ferric sitrate		

2.2.8. İzolatların MacConkey Agar (MCA)'da Büyütülmesi

İzolatların API 20 E test sonucunun değerlendirilmesi için gereken testlerden biri de MCA besiyerinde büyüüp büyümemesi testidir. MCA, hem seçici hem de ayırt edici bir besiyeridir (Ek-1). Seçici madde olarak bile tuzu ve kristal violet boyası ihtiva eder. Bunların ikisi de Gram pozitif bakterilerin büyümelerini engeller. Ayırt edici madde olarak laktozu ve indikatör olarak da nötral kırmızısı içermektedir. Eğer organizma laktozu fermentlerse koloniler kırmızı renk alır.

Bakteriyal izolatların MCA'a çizgi ekimleri yapıldı ve 16 saat inkübasyondan sonra petrielerde oluşan renk değişimleri incelendi. Oluşan kırmızı-pembe renkli koloniler pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

2.2.9. API of Medium Testi

API of medium, bakterilerin oksidatif veya fermantatif glikoz metabolizmasının belirlenmesinde kullanılan ampullerden oluşmuş bir testtir. Testin uygulanışı: ampullerin kapakları çıkartılarak sıcak su banyosunda yaklaşık 2 dakika bekletilerek eritildi. Dik şekilde tutularak oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Böylelikle katı olan besiyerinin üst yüzeyinin pürüzsüz olması sağlandı. Soğuyan besiyerine iğne uçlu steril öze kullanılarak alınan bakteri kolonilerinden ekimler yapıldı. Oksidasyon ve fermentasyon testleri olduğundan her bir bakteri izolatu için 2 ayrı ampule ekim yapıldı ve fermentasyon testi için ekşmeden sonra besiyerinin üzeri 1 cm mineral yağ ile kaplandı. 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı ve sonuçlar kaydedildi. Sarı renk görünümü pozitif asidifikasyon olarak, yeşil ve mavi renkler negatif sonuç olarak kaydedildi.

2.2.10. Hareketlilik Testi

Hareket testi, bakterilerin tanımlanmasında kullanılan rutin testlerden biridir. Test için ampullerde "API M Medium" besiyeri kullanıldı. Ampullerin kapakları çıkartılarak sıcak su banyosunda yaklaşık 2 dakika bekletilerek eritildi. Dik şekilde tutularak oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Böylelikle katı olan besiyerinin üst yüzeyinin pürüzsüz olması sağlandı. Soğuyan besiyerine iğne uçlu steril öze kullanılarak alınan bakteri kolonilerinden ekimler yapıldı. 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı ve sonuçlar kaydedildi. Hareketli suşlar inoküle edilen bölgenin çevresine hareket ederek besiyerini bulanık hale getirdiğinden bulanık besiyeri pozitif sonuç olarak kaydedildi.

2.2.11. İzolatların Moleküler Karakterizasyonları

2.2.11.1. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA'nın izolasyonu, Sambrook vd., (1989) göre gerçekleştirildi. Bir gün önceden 3 ml Leura-Bertani (LB)'ye (Ek-1) ekim yapılarak 30°C'de inkübasyona bırakılan bakteriler, ependorf tüpler içerisinde 13.000 rpm'de 3-4 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 500 µl TE tamponu eklendi. Sonra pellet iyice çözüldü ve üzerine 10 mg lizozim ilave edilerek ve 37°C'de 1 saat bekletildi.

Hücrelerdeki proteinlerin parçalanması için 50 µl % 10'luk SDS eklenerek 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Daha sonra her tüpe 3 M'lık 55 µl sodyum asetat eklendi ve 65°C'de, 30 dk alt-üst edilerek hücrelerin parçalanması sağlandı. Tüplere 500 µl fenol-kloroform-izoamil alkol ilave edildi. Tekrar alt-üst edilerek karıştırıldı ve 14.000 rpm'de 4 dk santrifüj edildi. Sonra tüplerin içerisindeki karışımın üst fazı alınarak yeni tüplere aktarıldı. Bu tüplere 500 µl kloroform eklendi ve alt-üst edilerek 14.000 rpm'de 4-5 dk santrifüj edildi. Üst faz alınarak yeni tüplere aktarıldı ve buna 55 µl 3 M'lık sodyum asetat ve 1.000 µl % 96'lık etil alkol ilave edildi. Karışım -20°C'de 45 dk bekletildi. Daha sonra 13.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi ve sıvı kısım uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 500 µl % 70'lik alkol ilave edilerek 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Üst kısımdaki sıvılar boşaltıldı ve pellet açık havada kurutuldu. Elde edilen DNA pelleti, 50-100 µl steril TE tamponunda çözülerek +4°C'de saklandı.

2.2.11.2. 16S rDNA Geninin PCR ile Çoğaltılması

16S rDNA genleri, herbir izolattan saflaştırılan genomik DNA'dan UNI16S-L (5'-ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA-3') ileri ve UNI16S-R (5'-ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3') geri primerleri kullanılarak PCR yardımıyla çoğaltıldı. PCR işleminde Go Taq Polimeraz enzimi (Promega) kullanıldı. PCR tüpüne 12 ng kalıp DNA, 5 µl 10 x PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM steril KCl), 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM U Taq DNA polimeraz, 0,25 mM ileri primeri, 0,25 mM geri primeri, 170 mM dATP, 170 mM dCTP, 170 mM dGTP ve 170 mM dTTP karışımı ilave edildi ve steril saf su ile 50 µl'ye tamamlandı. Çoğaltma işlemi 200 µl'lik tüplerde, " Bio-Rad Thermal Cycler " cihazında gerçekleştirildi. Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri ise ilk denatürasyon basamağı 95°C de 2 dk olarak gerçekleştirildikten sonra, 94°C'de 1 dk (denatürasyon için), 56°C'de 1 dk (hibridizasyon için) ve 72°C'de 2 dk (polimerizasyon için), 36 döngü olarak gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin 5 µl'si %1,1'lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür boyası (0,5 µg/ml) ile boyandıktan sonra "Gel Logic; Kodak" sistemiyle görüntüledi.

2.2.11.3. 16S rDNA Geninin Baz Dizisinin Belirlenmesi ve Gen Bankasındaki Sıralarla Karşılaştırılması

Yukarıda açıklanan primerler kullanılarak genomik DNA'dan çoğaltılan 16S rDNA genleri klonlama vektörü olan pGEM-T easy (Promega) vektörüne klonlandı ve doğruluğu teyit edilen klonların baz dizin analizi MacroGen firması (Kore) tarafından gerçekleştirildi (Ek-2). Elde edilen yaklaşık 1400 bp uzunluğundaki 16S rDNA dizileri Gen Bankasında var olan dizilerle karşılaştırılarak aralarındaki benzerlik oranları ortaya çıkarıldı. Mega (5.05) programı ile de bu dizilerin birbirleriyle olan benzerlikleri karşılaştırıldı. Bu programda analiz için Neighbor-Joining metodu, filogeni testi için 1.000 tekrarlı Bootstrap metodu kullanılarak izolatların filogenetik ağacı çizildi, ağaçta % 70'nin üzerindeki benzerlikler gösterildi. Sonuçlar değerlendirildi.

2.2.11.4. Bakteriyal İzolatların *cry* Gen İçeriğinin Belirlenmesi

Bakteriyal izolatların *cry* gen içeriklerinin tespit edilebilmesi için PCR işlemi yapıldı. Çalışmada kullanılan genel primerler: *cry1* (ileri, 5'-CAT GAT TCA TGC GGC AGA TAA AC-3'; geri, 5'-TTG TGA CAC TTC TGC TTC CCA TT-3') ve *cry2* (ileri, 5'-GTT ATT CTT AAT GCA GAT GAA TGG G-3'; geri, 5'-CGG ATA AAA TAA TCT GGG AAA TAG T-3') (Ben-Dov vd., 1997). PCR reaksiyonu, 2.2.11.2.'de olduğu gibi gerçekleştirildi. 2.2.11.2.'den farklı olarak 16S rRNA primerleri yerine *cry1* ve *cry2* genel primerleri kullanıldı ve bağlanma sıcaklığı *cry1* için 66°C, *cry2* için 61°C olarak ayarlandı. Genel primerler ile tespit edilen *cry* genleri ve ürün büyüklükleri *cry1* 274-277 bp, *cry2* 689-701 bp şeklindedir (Ben-Dov vd., 1997).

2.3. İnsektisidal Aktivite Testleri

2.3.1. Böceklerin Laboratuvar Kültürü

İzolatların insektisidal etkilerini belirlemek için bakterilerin izole edildiği *Ephestia cautella* Walker (kuru incir kurdu) (Lepidoptera: Pyralidae) başta olmak üzere, gerek kuru incirde gerekse diğer kurutulmuş meyvelerde zarar yapan *Plodia interpunctella* Hubner (kuru meyve güvesi) (Lepidoptera: Pyralidae) ve bir başka depo zararlısı olan *E. kuehniella* Zeller (un güvesi) (Lepidoptera: Pyralidae) larvaları kullanıldı.

E. cautella ve *P. interpunctella* larvaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünün Biyolojik Mücadele laboratuvarında yetiştirilen kültürlerden temin edildi. *E. kuehniella* yumurtaları ise İran Urmia Üniversitesi Ziraat Fakültesi Entomoloji Bölümü'nden temin edildi. Üç farklı böcekte $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, % 60-70 oransal nem, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşulların sağlandığı iklim dolabında yetiştirildi.

Denemelerde kullanılan *E. cautella* ve *P. interpunctella*'nin üretiminde Tunca (2005) tarafından önerilen besin karışımı kullanıldı. Buğday kepeği, mısır unu, kuru maya, bal, süt tozu, gliserin 2: 1: 0.25: 0.50: 0.25: 0.25 oranlarında karıştırılarak hazırlandı. *E. kuehniella* için herhangi bir besin karışımı hazırlanmayıp sadece buğday ununda yetiştirildi.

Hazırlanan besinler kullanılmadan önce 72 saat -20°C 'de tutularak steril edildi. Yetiştirmede kullanılan diğer plastik kaplar, fırça gibi malzemeler % 70'lik alkolle dezenfekte edilmiştir. Steril edilen plastik kaplar içerisine bir miktar besin karışımı konularak üzerine böceklerin larvaları konuldu. Düzenli olarak kontrol edilen larvalar kelebek çıkışı olunca kelebekler yumurtlama kabına alınarak yumurta bırakmaları sağlandı. Daha sonra yumurtalar fırça yardımıyla toplanıp ependorf tüpe konularak bir kısmı ileride çıkabilecek kontaminasyon problemine karşı $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı, bir kısmı da tekrar yeni açılan besin karışımına konularak kültürün sürekliliği sağlandı.

2.3.2. Örneklerin Hazırlanışı

2.3.2.1. Bakteriyal İzolatların Hazırlanışı

E. cautella'dan izole edilen ve karakterizasyonları yapılan kültüre edilebilir izolatlar 24-48 saat, 30°C 'ye ayarlı sallayıcıda 5 ml nütrient sıvı besiyeri içerisinde inkübe edildi. İnkübasyon neticesinde bakteri yoğunluğu, spektrofotometrede ölçülerek OD_{600} 'de 1,89 ($1,8 \times 10^9$ bakteri/ml) olacak şekilde ayarlandı. Sonra $3.000 \times \text{g}$ 'de 10 dk santrifüj edilen hücrelerin oluşturduğu pellet, 5 ml steril fosfat tamponun (PBS)'de çözüldü (Ben-Dov vd., 1995).

Ayrıca insektisidal etki çalışmalarında, KTÜ Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilen *B. thuringiensis kurstaki* (BnBt, MnD) suşları da kullanıldı (Katı vd., 2005, Sezen vd., 1999)

2.3.3. *Ephestia cautella*'dan Elde Edilen İzolatların İnsektisidal Aktivitesi

E. cautella ve *P. interpunctella* larvalarına uygulanmak üzere OD₆₀₀'de 1,89 (1,8 × 10⁹ bakteri/ml) olacak şekilde hazırlanan bakteriyal süspansiyonlar, larvalara verilecek olan kuru incirlere emdirildi. Hazırlanan incir örnekleri üzerlerine 2-3 saat aç bırakılmış 10'ar adet larva bırakıldı ve 26°C, %60 nem oranına sahip iklim dolabında 10 gün inkübe edildi. Ölüler günlük kontrol edildi, uzaklaştırıldı ve kaydedildi. Denemeler üçer tekrarlı yapıldı.

E. kuehniella larvalarına uygulanmak üzere OD₆₀₀'de 1,89 (1,8 × 10⁹ bakteri/ml) olacak şekilde hazırlanan bakteriyal süspansiyonlar, 1 gr una emdirilerek oda sıcaklığında kurutuldu. Hazırlanan un örnekleri üzerlerine 2-3 saat aç bırakılmış 10'ar adet larva bırakıldı ve 26°C, % 60 nem oranına sahip iklim dolabında 10 gün inkübe edildi. Ölüler günlük kontrol edildi, uzaklaştırıldı ve kaydedildi. Denemeler üçer tekrarlı yapıldı.

Yapılan virulans testlerinin sonuçları, Abbott (1925) tarafından geliştirilen bu Abbott fomülüne göre hesaplandı. Yöntem şu şekilde formüle edilebilir;

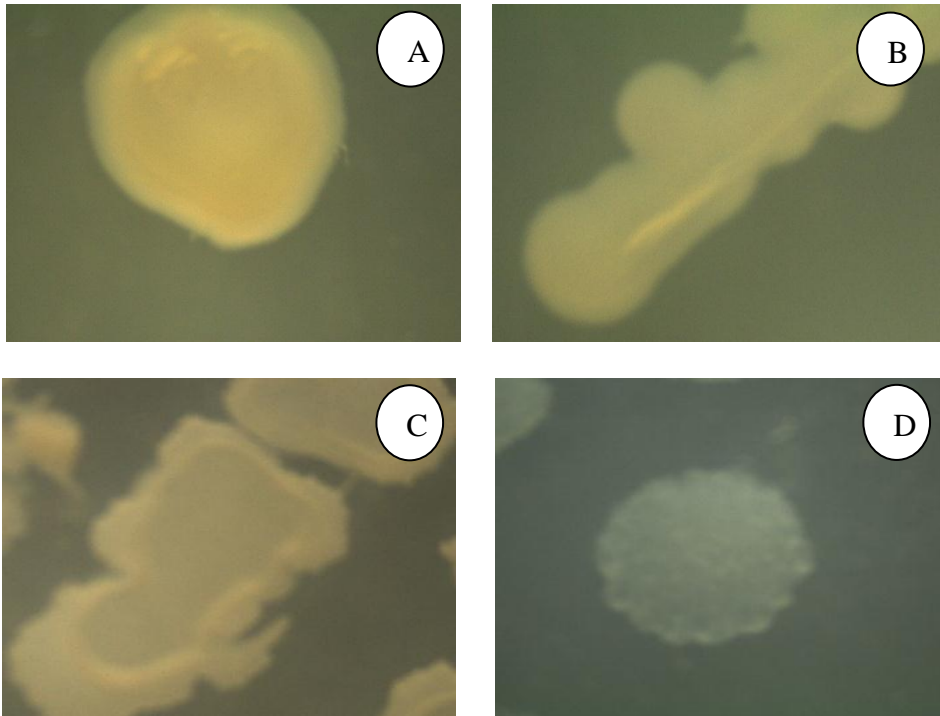
$$(\%) \text{ Ölüm Oranı: } \frac{\text{Toplam ölüm oranı (\%)} - \text{Kontrol grubundaki ölüm oranı (\%)}}{(\%) 100 - \text{Kontrol grubundaki ölüm oranı (\%)}}$$

3. BULGULAR

Kuru incir kurdu (*Ephestia cautella*) ile mikrobiyal mücadelede yeni bir etmen belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmada, zararlıdan bakteri izolasyonu yapıldı. Elde edilen 13 izolat ve daha önceden *Balanicus nucum*'dan izole edilmiş *Bacillus thuringiensis* (BnBt) ve *Malacosoma neustria*'dan izole edilmiş *Bacillus thuringiensis* (MnD)'in zararlı üzerindeki insektisidal etkileri araştırıldı. Yapılan çalışmalardan aşağıdaki bulgulara ulaşıldı.

3.1. *Ephestia cautella* Larvalarından Bakteri İzolasyonu

İzolasyon çalışmaları sonucunda *E. cautella* larvalarından koloni şekli, rengi ve büyüklüğü gibi farklı morfolojik özelliklerinden yararlanarak 13 tane kültüre edilebilir bakteriyel izolatlar elde edildi ve bunlar Eca1, Eca2, Eca3, Eca4, Eca5, Eca6, Eca7, Eca8, Eca9, Eca10, Eca11, Eca12 ve Eca13 olarak kodlandı.



Şekil 6. Farklı izolatlara ait koloni görüntüleri A: Eca1, B: Eca11, C: Eca5, D: Eca9

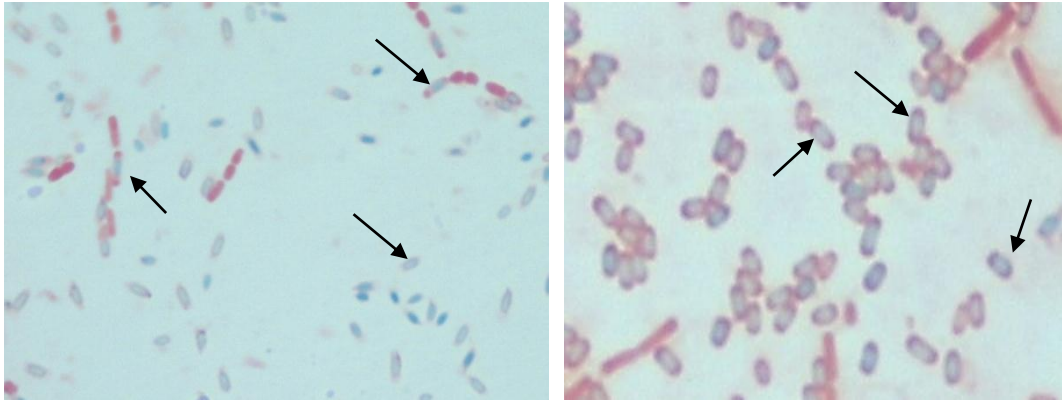
3.2. İzolatların Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Tür Tayinlerinin Yapılması

3.2.1. İzolatların Morfolojik Özellikleri

Binoküler mikroskop incelemeleri sonucunda izolatların koloni morfolojisine göre; Eca1 numaralı izolatın krem renkli düzgün-yuvarlak, Eca2 numaralı izolatın beyaz renkli girintili-yuvarlak, Eca3 numaralı izolatın krem renkli düzgün-yuvarlak, Eca4 numaralı izolatın krem renkli düzgün-yuvarlak, Eca5 numaralı izolatın krem renkli düzgün-dallanmış-mukoit (Şekil 6), Eca6 numaralı izolatın açık krem renkli düzgün-yuvarlak, Eca7 numaralı izolatın açık krem renkli girintili-yuvarlak, Eca 8 numaralı izolatın açık krem renkli düzgün-yuvarlak (Şekil 6), Eca9 numaralı izolatın beyaz renkli düzgün-yuvarlak, Eca10 numaralı izolatın beyaz renkli girintili-yuvarlak, Eca11 numaralı izolatın sarı renkli düzgün-yuvarlak, Eca12 numaralı izolatın beyaz renkli girintili-yuvarlak ve Eca13 numaralı izolatın beyaz renkli girintili-yuvarlak koloni morfolojilerine sahip olduğu belirlendi (Tablo 10).

Yapılan basit boyama sonucunda bütün izolatların basil olduğu ancak Eca1 ve Eca3 numaralı izolatların kokkobasil şeklinde küçük basiller oldukları tespit edildi (Tablo 10).

Gram boyama sonucunda Eca2, Eca4, Eca5, Eca6, Eca7, Eca8, Eca9, Eca10 ve Eca13 numaralı izolatların Gram (+) olduğu ve hepsinin spor ihtiva ettiği belirlendi (Şekil 7) (Tablo 10). Eca1, Eca3 ve Eca11 izolatlarının ise Gram (-) olduğu belirlendi. Ayrıca yapılan hareket testinde, Eca10 izolatının dışındaki tüm izolatların hareketli olduğu belirlendi.



Şekil 7. Eca4 ve Eca5 numaralı izolatlara ait spor boyama

Tablo 10. İzolatların morfolojik özellikleri

İzolatlar	Koloni Rengi	Koloni Şekli	Gram Boyama	Spor Boyama	Hücre Şekli	Kaynak	NB'deki Görünüm	Hareket
Eca1	Krem	Düz.-Yuv.	-	-	Kokkobasil	CL	B	+
Eca2	Beyaz	Gir.- Yuv.	+	+	Basil	CL	B	+
Eca3	Krem	Düz.-Yuv.	-	-	Kokkobasil	CL	B	+
Eca4	Krem	Düz.-Yuv.	+	+	Basil	CL	B	+
Eca5	Krem	Düz.-Dal.-M.	+	+	Basil	CL	B	+
Eca6	Beyaz-Krem	Düz.-Yuv.	+	+	Basil	CL	B	+
Eca7	Beyaz- Krem	Gir.- Yuv.	+	+	Basil	CL	B	+
Eca8	Beyaz- Krem	Düz.-Yuv.	+	+	Basil	CL	B	+
Eca9	Beyaz	Düz.-Yuv.	+	+	Basil	CL	B	+
Eca10	Beyaz	Gir.- Yuv.	+	+	Basil	CL	B	-
Eca11	Sarı	Düz.-Yuv.	-	-	Basil	ÖL	B	+
Eca12	Beyaz	Gir.- Yuv.	+	+	Basil	ÖL	B	+
Eca13	Beyaz	Gir.- Yuv.	+	+	Basil	ÖL	B	+

Düz.: Düzgün, Yuv: Yuvarlak, Dal: Dalgalı, Gir: Girintili, M: Mukoit, CL: Canlı larva, ÖL: Ölü larva, B: Bulanık, Ç: Çökme

3.2.2. İzolatların Fizyolojik Özellikleri

İzolatların büyümeleri üzerine NaCl, pH ve sıcaklık gibi fiziksel faktörlerin etkilerinin araştırılması amacıyla çeşitli testler yapıldı. Fiziksel özellikleri kapsayan bu testler Tablo 11'de verilmektedir.

İzolatların pH toleranslarının belirlenmesi amacıyla yapılan testler sonucunda pH 5'te Eca1, Eca 3, Eca5 ve Eca11 numaralı izolatların, pH 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12'de ise bütün izolatların büyüdüğü tespit edildi (Tablo 11).

İzolatların NaCl'ye olan toleranslarının belirlenmesi amacıyla yapılan testler sonucunda tüm izolatların % 1, 3 ve 5 oranında NaCl içeren besiyerlerinde büyüdüğü görüldü. % 7 NaCl'li besiyerinde Eca1, Eca3, Eca5 ve Eca11 nolu izolatların büyüdüğü, diğerlerinin ise büyümediği tespit edildi. % 9 NaCl'li besiyerinde Eca1 ve Eca11 numaralı izolatların zayıf, Eca5 numaralı izolatın ise normal oranda büyüdüğü tespit edildi (Tablo 11).

İzolatların sıcaklığa olan toleranslarının belirlenmesi amacıyla yapılan testler sonucunda 16-40°C arasında tüm izolatların büyüdüğü belirlendi. 45°C'de Eca2, Eca5, Eca7, Eca9 ve Eca10 numaralı izolatların büyüebildiği belirlendi. 50°C'de Eca5 ve Eca10 normal büyüebilirken Eca2, Eca7 ve Eca9 numaralı izolatların zayıf derecede büyüdüğü belirlendi. 55°C'de ise Eca2, Eca5, Eca9 ve Eca10 numaralı izolatların zayıf derecede de olsa büyüebildiği fakat diğer izolatların hiç büyümediği belirlendi. Ayrıca, hiçbir izolatın 60°C'de büyümediği tespit edildi (Tablo 11).

Tablo 11. İzolatların fizyolojik özellikleri

İzolatlar	pH Testi							NaCl Testi (%)					Sıcaklık Testi (°C)							
	4	5	6	8	9	10	11	12	1	3	5	7	9	11	16	37	40	45	50	55
Eca1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Z+	-	+	+	+	-	-	-
Eca2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	Z+	Z+
Eca3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
Eca4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Eca5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Z+
Eca6	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Eca7	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	Z+	-
Eca8	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Eca9	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	Z+	Z+
Eca10	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	Z+
Eca11	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Z+	-	+	+	+	-	-	-
Eca12	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Eca13	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-

Z: Zayıf

3.2.3. Bakteriyal İzolatların Biyokimyasal ve Metabolik Özellikleri

Bazı enzimlerin varlığı veya yokluğu, bazı enzimlerin üretilip üretilmediği ve izolatların bazı organik maddeleri fermente edip edemediklerini belirlemek bakteri sistematigi açısından büyük önem taşımaktadır. İzolatların bu enzimleri üretilip üretilmediklerinin belirlenmesi amacıyla bir dizi test yapıldı. Bu testler ve sonuçları Tablo 12'de verilmektedir.

Katalaz testi sonucunda Eca1, Eca3 ve Eca5 numaralı izolatların katalaz enzimi ürettiği diğerlerinin katalaz enzimini zayıf ürettiği tespit edildi. Oksidaz testi sonucunda izolatların hiç birinin oksidaz aktivitesi göstermediği tespit edildi (Tablo 12).

Nişasta hidroliz testi sonucunda Eca2, Eca4, Eca5, Eca6, Eca7, Eca8, Eca9, Eca10 ve Eca12 izolatları nişastayı hidroliz ederken, Eca13 izolatının nişastayı zayıf hidroliz ettiği, Eca1, Eca3 ve Eca11 izolatlarının ise nişastayı hidroliz edemedikleri belirlendi (Tablo 12).

Yapılan diğer biyokimyasal testlerden biride üreaz testidir. Bu testin sonucuna göre Eca7, Eca9, Eca10 ve Eca12 üreyi hidroliz edebilmektedir. Eca1, Eca2, Eca3, Eca5, Eca6, Eca8 ve Eca13 üreyi zayıf oranda, Eca4 ve Eca11 ise üreyi hiç hidroliz edememektedir. Ayrıca İndol oluşum testi sonucu hiçbir izolatın indol oluşturamadığı görüldü (Tablo 12).

İzolatların glukoz metabolizması sonucu ürettikleri son ürünlerin niteliğinin belirlenmesi amacıyla Metil Kırmızısı testi yapıldı. Bu testler sonucunda Eca4, Eca6, Eca7,

Eca9, Eca10, Eca12 ve Eca13 izolatların glukoz metabolizması sonucu yüksek miktarda organik asit oluşturabildiği (MR +) belirlendi (Tablo 12).

Tablo 12. İzolatların klasik yöntemlerle belirlenen biyokimyasal özellikleri

İzolatlar	Biyokimyasal Özellikler					
	Katalaz Testi	Oksidaz Testi	Nişasta Testi	Üreaz Testi	Metil-Red Testi	İndol Testi
Eca1	+	-	-	Z+	-	-
Eca2	Z+	-	+	Z+	-	-
Eca3	+	-	-	Z+	-	-
Eca4	Z+	-	+	-	+	-
Eca5	+	-	+	Z+	Z+	-
Eca6	Z+	-	+	Z+	+	-
Eca7	Z+	-	+	+	+	-
Eca8	Z+	-	+	Z+	-	-
Eca9	Z+	-	+	+	+	-
Eca10	Z+	-	+	+	+	-
Eca11	Z+	-	-	-	-	-
Eca12	Z+	-	+	+	+	-
Eca13	Z+	-	Z+	Z+	+	-

Z: zayıf

3.2.3.1. API 20 E ve API 50 CH Panel Test Sistemiyle Tespit Edilen Özellikler

API 20 E test panellerine yapılan ekimler 1 gece 30°C’de inkübe edildikten sonra bazı test kuyucukları direk renk değişimi gözlenmesiyle, bazıları ise (TDA, JAMES, VP1-VP2, NIT1-NIT2) ayıraç ilave edilerek incelendi (Tablo 13). API50 CHB panel test sisteminde yapılan ekimlerin sonunda 0. tüp kontrol olarak alındı ve tüpteki renk değişimine göre sonuçlar değerlendirildi. Büyümesi yavaş olan izolatlar 2 gece inkübe edilerek sonuçlar kaydedildi (Tablo 14).

Tablo 13. İzolatların API 20 E panel test sistemi ile belirlenen özellikleri

Testler	Substrat	Aktivite	Eca1	Eca3	Eca11
ONPG	ONPG	Beta-galaktosidaz	+	+	+
ADH	Arginin	Arginin dihidrolaz	-	-	-
LDC	Lisin	Lisin dekarboksilaz	+	+	+
ODC	Ornitin	Ornitin dekarboksilaz	+	+	-
CIT	Sitrat	Sitrat kullanımı	+	+	+
H ₂ S	Na thiosulfate	H ₂ S üretimi	-	-	-
URE	Üre	Üre hidrolizi	-	-	-
TDA	Triptofan	Deaminaz	-	-	-
IND	Triptofan	İndol üretimi	-	-	-
VP	Na piruvat	Aseton üretimi	+	-	+
GEL	Kömür jelatin	Jelatinaz	+	+	+
GLU	Glukoz	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	+
MAN	Mannitol	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	+
INO	İnositol	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	+
SOR	Sorbitol	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	+
RHA	Ramnoz	Fermantasyon / oksidasyon	-	-	-
SAC	Sukroz	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	+
MEL	Melibioz	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	+
AMY	Amigdalın	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	+
ARA	Arabinoz	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	+
OX		Sitokrom-Oksidaz	-	-	-
NO ₂	Potasyum nitrat	NO ₂ üretimi	+	+	+
N ₂	Potasyum nitrat	N ₂ gazına indirgeme	-	-	-
MOB		Hareket	+	+	+
McC	MacConkey Medium	Üreme	+	+	+
OF-O	Glukoz	Oksidasyon: havaya açık	+	+	+
OF-F	Glukoz	Fermantasyon: Mineral yağ altında	+	+	+

Tablo 14. İzolatların API 50 CH panel test sistemi ile belirlenen özellikleri

Testler	Açık Adı	Eca2	Eca4	Eca5	Eca6	Eca7	Eca8	Eca9	Eca10	Eca12	Eca13
GLY	glycerol	NA	-	+	-	NA	-	NA	NA	NA	NA
ERY	erythriol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DARA	D-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LARA	L-arabinose	NA	-	+	-	-	-	-	-	-	-
RIB	D-ribose	-	-	+	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
DXYL	D-xylose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
LXYL	L-xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADO	D-adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDX	methyl-βD-xylopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAL	D-galactose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FRU	D-fructose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MNE	D-mannose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
SBE	L-sorbose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
RHA	L-rhamnose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
DUL	dulcitol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
INO	inosidol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MAN	D-mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
SOR	D-sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDM	methyl-αD-mannopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDG	methyl-αD-glucoopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NAG	N-asetylglucosamine	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
AMY	amygdalin	-	-	NA	-	-	-	-	-	-	-
ARB	arbutin	-	+	NA	NA	-	+	-	-	+	+
ESC	esculin-ferric sitrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAL	salisin	+	+	+	+	+	+	NA	NA	+	+
CEL	D-celiobiose	NA	NA	+	NA	-	NA	NA	-	+	NA

Tablo 14'ün devamı

MAL	D-maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	D-lactose(bovineorgine)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MEL	D-melibiose	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
SAC	D-saccharose(sucrose)	-	+	NA	+	-	+	-	-	-	+
TRE	D-trehalose	+	+	NA	+	+	+	+	+	+	+
INU	inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	-
MLZ	D-melezitoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAF	D-raffinose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
AMD	amidon(starch)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
GLYG	glycogen	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
XLT	xylitol	-	-	NA	-	-	-	-	-	-	-
GEN	gentiobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
TUR	D-turanose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LYX	D-lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAG	D-tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DFUG	D-fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LFUC	L-fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DARL	D-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LARL	L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GNT	potassium gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2KG	potassium 2- ketogluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 KG		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.2.4. İzolatların Moleküler Karakterizasyonu

3.2.4.1. İzolatların 16S rDNA Gen Sıraları

Bakteri sistematigi çalışmalarında 16S rDNA genlerinin baz dizilerinin ortaya çıkarılması önemli genetiksel özelliklerin başında gelir. Bu amaçla ilk olarak morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler sonucunda birbirleriyle aynı tür olabilecek olan izolatlar dışındaki tüm bakteri izolatlarından elde edilen genomik DNA'dan PCR yardımıyla 16S rDNA geni çoğaltılması sonucunda 1400- 1500 bp büyüklüğünde bantlar gözlemlendi. pGEM-T Easy klonlama vektörüne kopyalanan 16S rDNA gen bölgelerinin nükleotit sırası MacroGen (baz dizisi belirleyen şirket) tarafından belirlendi (Ek 3). Sonuçlar değerlendirilerek filogenetik ağacın Mega 5 programı kullanılarak Neighbor-Joining analizinden yararlanılarak çizildi (Şekil 8 ve 9). Filogenetik ağaç verileri ve 16S rDNA sonuçları birbirlerini desteklemektedir (Tablo 15).

Tablo 15. İzolatların 16S rDNA sekanslarının gen bankasındaki sıralarla karşılaştırmaları

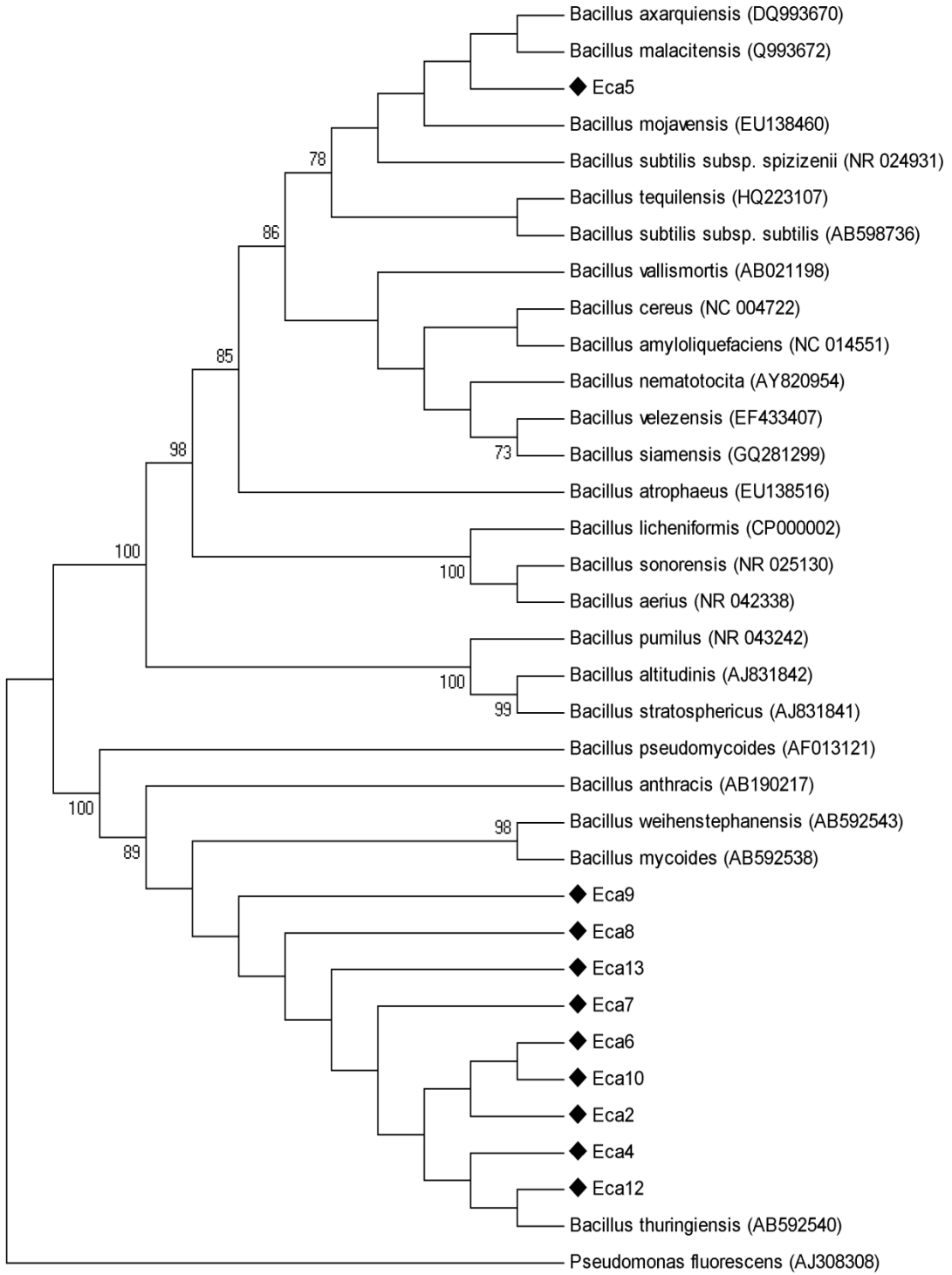
İzolat	Tür ve Cinsler	Benzerlik Oranı (%)	Kayıt Numarası
Eca 1	<i>Serratia marcescens</i>	99	AB679998.1
	<i>Serratia ficaria</i>	98	AJ233428
	<i>Serratia ureilytica</i>	98	AJ854062
	<i>Serratia odorifera</i>	97	AJ233432
	<i>Serratia plymuthica</i>	97	AJ233433
	Eca 2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99
<i>Bacillus anthracis</i>		99	AB190217
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>		99	AB592543
<i>Bacillus samanii</i>		99	EF036537
<i>Bacillus pseudomycooides</i>		98	AF013121
<i>Bacillus mycooides</i>		98	AB592538
Eca3	<i>Serratia marcescens</i>	99	AB679998.1
	<i>Serratia ficaria</i>	98	AJ233428
	<i>Serratia ureilytica</i>	98	AJ854062
	<i>Serratia odorifera</i>	97	AJ233432
	<i>Serratia plymuthica</i>	97	AJ233433
	Eca4	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99
<i>Bacillus anthracis</i>		99	AB190217
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>		99	AB592543
<i>Bacillus samanii</i>		99	EF036537
<i>Bacillus pseudomycooides</i>		98	AF013121
<i>Bacillus mycooides</i>		98	AB592538

Tablo 15'in devamı

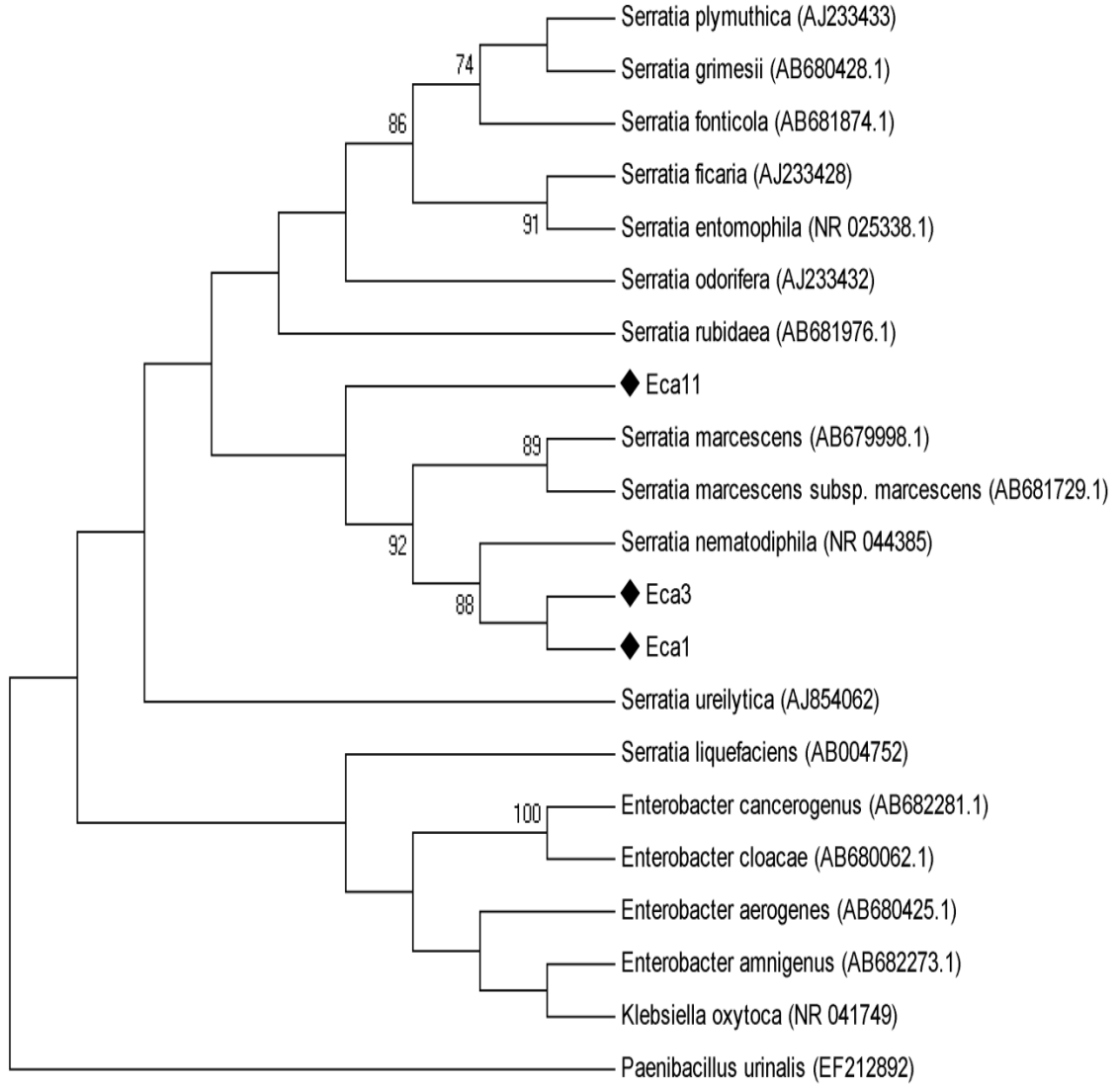
Eca5	<i>Bacillus axarquensis</i>	99	DQ993670
	<i>Bacillus malacitensis</i>	99	Q993672
	<i>Bacillus mojavensis</i>	99	EU138460
	<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	99	NC_014551
	<i>Bacillus tequilensis</i>	99	HQ223107
	<i>Bacillus vallismortis</i>	99	AB021198
	<i>Bacillus stratosphericus</i>	97	AJ831841
Eca6	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99	AB592540
	<i>Bacillus anthracis</i>	99	AB190217
	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99	AB592543
	<i>Bacillus samanii</i>	99	EF036537
	<i>Bacillus mycoides</i>	98	AB592538
Eca7	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99	AB592540
	<i>Bacillus anthracis</i>	99	AB190217
	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99	AB592543
	<i>Bacillus samanii</i>	99	EF036537
	<i>Bacillus pesudomycoides</i>	98	AF013121
	<i>Bacillus mycoides</i>	98	AB592538
Eca8	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99	AB592540
	<i>Bacillus anthracis</i>	99	AB190217
	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99	AB592543
	<i>Bacillus samanii</i>	99	EF036537
	<i>Bacillus pesudomycoides</i>	98	AF013121
	<i>Bacillus mycoides</i>	98	AB592538
Eca9	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99	AB592540
	<i>Bacillus anthracis</i>	99	AB190217
	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99	AB592543
	<i>Bacillus samanii</i>	99	EF036537
	<i>Bacillus pesudomycoides</i>	98	AF013121
	<i>Bacillus mycoides</i>	98	AB592538
Eca10	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99	AB592540
	<i>Bacillus anthracis</i>	99	AB190217
	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99	AB592543
	<i>Bacillus samanii</i>	99	EF036537
	<i>Bacillus pesudomycoides</i>	98	AF013121
	<i>Bacillus mycoides</i>	98	AB592538
Eca11	<i>Serratia marcescens</i>	99	AB679998.1
	<i>Serratia ficaria</i>	98	AJ233428
	<i>Serratia ureilytica</i>	98	AJ854062
	<i>Serratia odorifera</i>	97	AJ233432
	<i>Serratia plymuthica</i>	97	AJ233433
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	97	AB680425.1
	<i>Enterobacter amnigenus</i>	97	AB682273.1

Tablo 15'in devamı

Eca12	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99	AB592540
	<i>Bacillus anthracis</i>	99	AB190217
	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99	AB592543
	<i>Bacillus samanii</i>	99	EF036537
	<i>Bacillus pseudomycoides</i>	98	AF013121
	<i>Bacillus mycoides</i>	98	AB592538
Eca13	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99	AB592540
	<i>Bacillus anthracis</i>	99	AB190217
	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99	AB592543
	<i>Bacillus samanii</i>	99	EF036537
	<i>Bacillus pseudomycoides</i>	98	AF013121
	<i>Bacillus mycoides</i>	98	AB592538



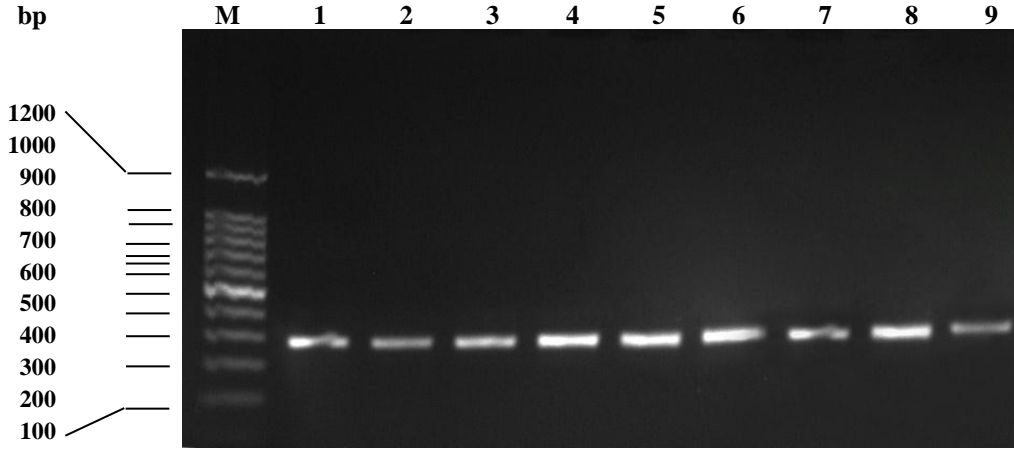
Şekil 8. Gram pozitif izolatların 16S rDNA dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı.



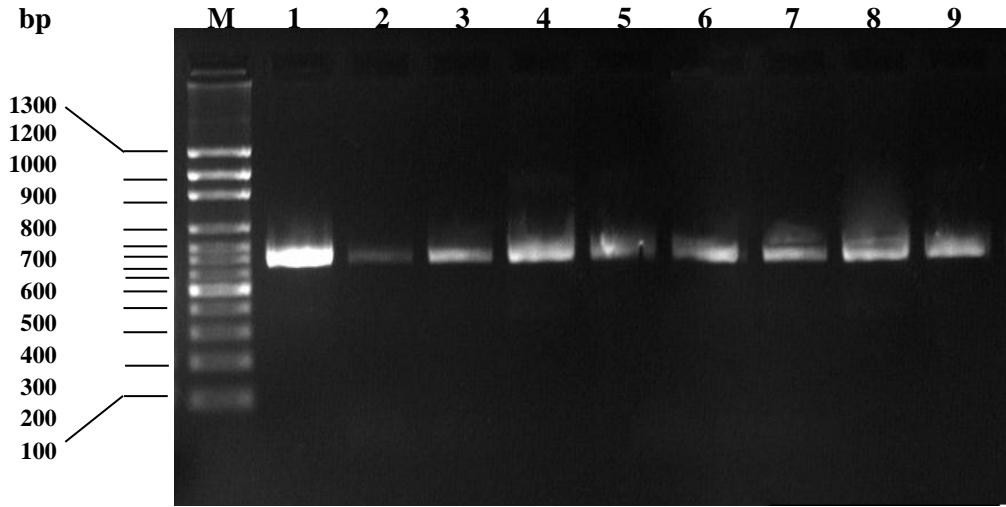
Şekil 9. Gram negatif izolatların 16S rDNA dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı.

3.2.4.1. Bakteriyal İzolatların *cry* Gen İçerikleri

Bacillus thuringiensis'e ait kristal proteinleri kodlayan *cry* genlerini belirleyebilmek için 2 çift genel primer (*cry1*, *cry2*) kullanılarak PCR yönteminden yararlanıldı. Bu sonuçlara göre Eca2, Eca4, Eca6, Eca7, Eca8, Eca9, Eca10, Eca12 ve Eca13 numaralı izolatlarda *cry1* ve *cry2* geninin bulunduğu PCR yöntemiyle tespit edildi (Şekil 10 ve 11).



Şekil 10. İzolatların *cry1* gen primeri kullanarak elde edilen PCR ürünleri. M) Markır (100 bp'lik DNA Markır), 1) Eca2 numaralı izolat, 2) Eca4 numaralı izolat, 3) Eca6 numaralı izolat, 4) Eca7 numaralı izolat, 5) Eca8 numaralı izolat, 6) Eca9 numaralı izolat, 7) Eca10 numaralı izolat, 8) Eca12 numaralı izolat, 9) Eca13 numaralı izolat

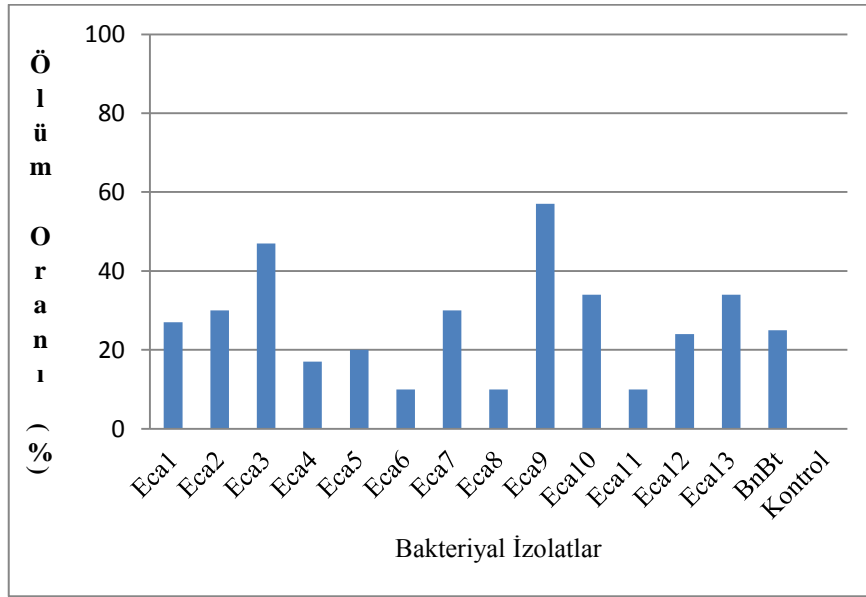


Şekil 11. İzolatların *cry2* gen primeri kullanarak elde edilen PCR ürünleri. M) Markır (100 bp'lik DNA Markır), 1) Eca2 numaralı izolat, 2) Eca4 numaralı izolat, 3) Eca6 numaralı izolat, 4) Eca7 numaralı izolat, 5) Eca8 numaralı izolat, 6) Eca9 numaralı izolat, 7) Eca10 numaralı izolat, 8) Eca12 numaralı izolat, 9) Eca13 numaralı izolat

3.3. İsektisidal Aktivite Çalışmalar

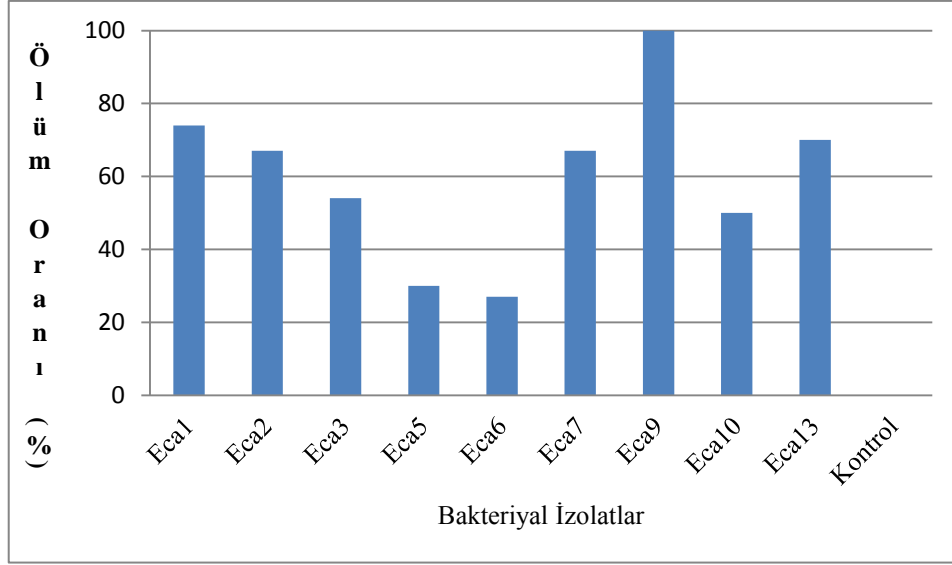
İsektisidal aktivite çalışmaları laboratuvar kültürü haline dönüştürülmüş *Ephestia cautella* (kuru incir kurdu), *Plodia interpunctella* (kuru meyve güvesi), *E. kuehniella* (değirmen güvesi) larvaları üzerinde ve laboratuvar koşullarında gerçekleştirildi. Denemeler üçer tekrarlı ve her tekrarda 10 adet 3. evre larva kullanıldı. Her bir izolatin isektisidal etkisi 10 gün boyunca araştırıldı ve 10. gün sonunda sonuçlar kaydedildi.

Yapılan tüm denemelerde aynı izolatin Lepidoptera takımına ait farklı depo zararlıları üzerinde farklı oranda etki gösterdiği görüldü. *E. cautella* üzerinde en yüksek öldürücü etkiyi % 57 ve % 46 oranlarında bir etkiyle sırasıyla Eca9 ve Eca3 numaralı izolatin gösterdiği tespit edildi (Şekil 12). Daha önce bir lepidopterden izole edilen BnBt bakterisi için % 25 gibi düşük bir oranda ölüm gözlemlendi (Şekil 12).



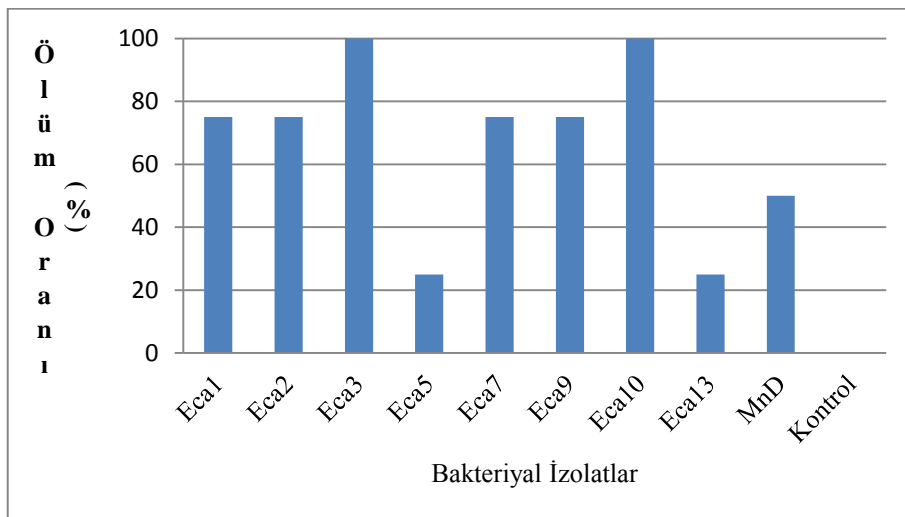
Şekil 12. İzolatların *Ephestia cautella* larvaları üzerindeki isektisidal etkisi

P. interpunctella üzerinde yapılan isektisidal aktivite deneyinde *E. cautella*'ya oranla izolatların daha yüksek öldürücü etki gösterdiği gözlemlendi. En yüksek öldürücü etkiyi % 100'lük bir oranla Eca9 numaralı izolat gösterdi (Şekil 13).



Şekil 13. İzolatların *Plodia interpunctella* larvaları üzerindeki insektisidal etkisi

Lepidoptera takımına ait bir başka depo zararlısı *E. kuehniella* üzerinde yapılan insektisidal aktivite deneyinde, Eca3 ve Eca 10 numaralı izolatların % 100 oranında yüksek insektisidal aktivite gösterdiği tespit edildi. *P. interpunctella* ve *E. cautella* üzerinde en yüksek öldürücü etkiye sahip Eca9 izolatı için % 75 gibi bir ölüm gözlemlendi. Ayrıca bir lepidopterden izole edilen MnD bakterisi, % 50 oranında bir ölüme neden olduğu tespit edildi (Şekil 14).



Şekil 14. İzolatların *Ephestia kuehniella* larvaları üzerindeki insektisidal etkisi

4. TARTIŞMA

Ülkemiz, birçok tarım ürününün yetiştirilmesine uygun şartların varlığı sebebiyle ülkemiz, tarım ürünlerinin çeşidi ve verimi açısından dünyada önemli bir konumdadır. Bazı tarım ürünleri yaş olarak uzun süre saklanamadığı için ve lezzetinin arttırmak için kurutularak depolanmaktadır. Böylece uzun süre saklanabilirler. İncir başta olmak üzere kayısı, üzüm, fındık, ceviz gibi pek çok ürün kurutularak depolanır ve pazara bu şekilde sunulur. Ürünler gerek Avrupa gerekse Amerika, Asya ve Afrika'da pek çok ülkeye pazarlanıp ülke ekonomisine büyük bir gelir kaynağı oluşturmaktadır. Ayrıca, ülkemiz depolanabilir tarım ürünlerinde dünyada üst sıralardadır.

Tarım ürünleri bahçeden pazara kadar pek çok şekilde kayıplar vermektedir. Bunların belki de en önemlilerinden biri de zararlı böceklerdir. Bu kayıpları azaltmak için dünya çapında birçok çalışma yapılmıştır ve halen devam eden birçok çalışma mevcuttur.

Türkiye, depolanabilir tarım ürünlerinden incirin anavatanıdır ve dünya incir üretiminde birinci sıradadır. Bunun yanında yine fındık üretiminde dünyada birinci sırada yer almaktadır. Ayrıca üzüm, ceviz, kayısı gibi ürünlerde de dünya pazarında önemli bir yere sahiptir.

Bunlar gibi depolanabilir tarım ürünlerinde önemli ölçüde zarara sebep olan kuru incir kurdu (*Ephesia cautella*) ile daha önceden kültürel, mekanik ve kimyasal mücadele çalışmaları yapılmıştır. Fakat şu an dünyada, insana, çevreye ve diğer canlılara zarar vermeyen ekonomik, kolay uygulanabilir bir mücadele için çalışmalar yapılmaktadır.

Günümüzde artık böceklerle mücadelede kimyasallar yerine biyolojik etmenler tercih edilmeye başlanmıştır. Bu böceklere karşı kullanılan bakterilerden en fazla tercih edileni *Bacillus thuringiensis* türleridir. Etkili ve güvenilir biyolojik mücadele için mevcut ve türe ait yeni izole edilen bu bakterilerin özelliklerinin belirlenmesi gerekir.

Bu çalışma kapsamında bu zararlıya karşı biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılacak bir bakteri belirleyebilmek için zararlıdan bakteri izolasyonu yapıldı ve bakteriyal izolatların tanımlamalarının yapılabilmesi için ise fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler testler uygulandı.

Yapılan literatür araştırması sonucunda daha önce *E. cautella*'dan bakteri izolasyonu yapılmamıştır. Bu çalışma bugüne kadar *E. cautella*'dan ilk bakteriyal izolasyon çalışmasıdır.

Bakteri izolasyonunda büyüme özellikleri ve morfolojik özelliklerine bakılarak elde edilen izolat sayısı 13'tür. Bu 13 izolatın 10'u tür seviyesinde diğerleri ise cins seviyesinde tanımlandı.

Bu tanı çalışmalarında bakterilerin tür tayininde rutin olarak kullanılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerin dışında, son yıllarda bakterilerin tür tayinlerinin doğru bir şekilde yapılabilmesi için geliştirilmiş üç yeni metot olan 16S rDNA dizin analizi, API 20 E ve API 50 CH tanımlama sistemleri de kullanıldı. Bakterilerin tür tayinleri için Bergey's Manual of Systematic Bacteriology kaynak kitabından yararlanıldı ve yapılan tanımlar API 20 E ve API 50 CH analiz sonuçlarıyla desteklendi (Halda-Alija, 2004; Lian, 2004).

Bu sistemlerin rutin olarak gerçekleştirilen klasik testlere karşı bazı avantajları vardır. Bu avantajlardan en önemlileri izolatların aynı ortam şartları altında değerlendirilmeleri ve bu tür test panellerinin içerdiği testlerin hepsinin klasik yöntemlerle yapılması için gereken masraf ve zamanın çok büyük ölçüde geri kazanılmış olmasıdır.

Bu sistemler sayesinde izolatlarımızın sahip olduğu metabolik aktiviteler ve biyokimyasal özellikleri hakkında çok geniş miktarda bilgi edinildi. Rutin çalışmalarla elde edilen veriler tür tayini için yetmediği durumlarda bu test sistemlerinden elde edilen veriler sayesinde tür tayini yapılabilirdi.

16S rDNA genleri oldukça iyi korunmuş universal sıralara sahiptir (Woese, 1990). Bu genler bakteriler arasındaki akrabalıkları belirlemede ve bakterilerin tür veya cins seviyesinde tanımlamalarının yapılmasında son günlerde oldukça önemli bir araç haline gelmiştir (Sacchi vd., 2002).

16S rDNA alt ünitelerinin genlerine göre gerçekleştirilen moleküler tanımlama tekniklerinin gelişimi ile karmaşık yapıya sahip mikrobiyal komuniteleri anlamak daha da kolay olmuştur. 16S rDNA genlerinin analizi bütün bakterileri tanımlamada kullanılacak bir yöntemdir. Bu yöntem klasik mikrobiyal metotların aksine çok önemli iki avantaj sağlar. Bu avantajlardan ilki oldukça hızlı bir metot olması ikincisi ise tanımlama doğruluğunun oldukça gelişmiş olmasıdır (Springer vd., 1996).

Yapılan morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler çalışmalar sonucunda Eca1, Eca3 ve Eca11 numaralı izolatların spor oluşturmayan, katalaz enzimi üreten, Gram olumsuz, oksidaz (-), hareketli, Voges-Proskauer reaksiyonu, lizin ve ornithine dekarboksilaz pozitif, jelatini hidrolizleyebilen, arginin dehidrolaz ve H₂S üretimi negatif, basil bakteriler olduğu için *Serratia* cinsine dahil edildi (Zhang vd., 2009). *Serratia* cinsi VP pozitif olması, indol üretmemesi, jelatini hidroliz ve glikozun fermantasyonu ile enterobakterlerden ayrılır. Bu izolatlar, metil red (-) olduğundan 16S rDNA analizinin önerdiği *S. ureilytica*, *S. odorifera* ve *S. ficaria* olmadıklarına, ornitin dekarboksilaz aktivitesi göstermediğinden, *S. marcescens* olmadığına, lizin (-) olmasıyla *S. plymuthica* olmadığına karar verildi. API 20 E sisteminin verdiği tanımlama bilgilerinden ve 16S rDNA sekans analiz verilerinin sonuca ulaşmada yetersiz olmasından dolayı Eca1, Eca3 ve Eca11 numaralı izolatların *Serratia* sp. olarak bırakılmasına karar verildi. Bu cinste yer alan *S. marcescens*, *S. entomophila*, *S. proteamaculans*, *S. liquefaciens*, *S. rubidea* ve *S. fonticola* daha önce yapılan birçok çalışmada böceklerden izole edilmiştir (Lepesme, 1937; Steinhaus, 1951, 1956; Steinhaus ve Marsh, 1962; McLaughlin ve Keller, 1964; Bell, 1969; Lipa ve Wiland, 1972; Sikorowski, 1985; Krieg, 1987; O'Callaghan ve Jackson, 1993; Martinez vd., 1994; Klein ve Kaya, 1995; Sezen ve Demirbağ, 1999; Jackson vd., 2001; Kuzina vd., 2001; Osborn vd., 2002; Jeyaprakash vd., 2003; Sezen vd., 2004, 2005, 2007; Bahar vd., 2007; İnce vd., 2008; Sevim vd., 2010; Gökce vd., 2010).

Eca2, Eca4, Eca6, Eca7, Eca8, Eca9, Eca10, Eca12 ve Eca13 kodlu izolatların 16S rDNA dizin analiz sonucuna göre, *Bacillus thuringiensis*'e % 99 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi. Bu izolatların yaklaşık 277 bp büyüklüğünde *cry1* ve yaklaşık olarak 700 bp büyüklüğünde *cry2* genlerini içermesi ve API 50 CHB test sisteminin de bu sonucu desteklemesi ile Eca2, Eca4, Eca6, Eca7, Eca8, Eca9, Eca10, Eca12 ve Eca13 kodlu izolatların *B. thuringiensis* olduğunu göstermiştir. Bu izolatların bazı biyokimyasal test sonuçlarının farklı olması, kendi aralarında 16S rDNA dizilerinin karşılaştırılması sonucunda % 99 benzerlik olması, insektisidal etki denemelerinde farklılık olmasından dolayı hepsinin *B. thuringiensis*'in farklı suşları olabileceği düşünülmektedir. Böceklerin doğal düşmanları düşünüldüğünde bütün mikroorganizmalar arasında, *B. thuringiensis* önemli bir yer tutmaktadır. *B. thuringiensis* Gram-olumlu, spor oluşturan ve farklı habitatlarda yaşayabilen bir bakteridir (Heimpel, 1967; Goldberg ve Margalit, 1977; Martin ve Travers, 1989; Smith ve Couche, 1991; Meadows vd., 1992). Bu bakteri yakın ilişki içerisinde

bulunduğu bakterilerden spor oluşumu esnasında ürettiği kristal yapıları sayesinde ayrılmaktadır. *B. thuringiensis* bilinen en yaygın böcek patojenidir ve bu bakteri biyolojik mücadelede büyük önem taşımaktadır (Lacey vd., 2001). Dünyadaki biyopestisit satışlarının % 95'ini *B. thuringiensis* kökenli ürünler oluşturmaktadır (Gaugler, 1997).

Eca5 nolu izolatin Gram (+), basil, spor oluşturan, katalaz enzimi üreten, glikozu fermente edebilen ve arabinozu fermente edemeyen için bacillaceae familyası özelliklerine sahip olduğu belirlendi. Bu izolatin oksidaz (-) olması dolayısıyla, 16S rDNA analizinin önerdiği *B. malacitensis*, *B. mojavensis* ve *B. subtilis*, *B. amyloliquifaciens* ve *B. vallismortis*'ten ayrılmaktadır. Nişastayı hidroliz edebilmesinden dolayı ise *B. stratosphericus*'tan ayrılır. İndol (-) olmasıyla *B. tequilensis*'ten ayrılır. Tüm bu bilgilerden, API 50 CH test sisteminden ve 16S rDNA dizin analiz sonuçlarından yararlanılarak Eca5 numaralı izolatin *Bacillus axarquiensis* olduğuna karar verildi.

Elde edilen 13 bakteriyal izolatin insektisidal etkilerin araştırılması ülkemiz ve dünyada önemli depo zararlılarından kuru incir kurdu (*E. cautella*), kuru meyve güvesi (*P. interpunctella*) ve değirmen güvesi (*E. kuehniella*)'ne karşı gerçekleştirildi.

Eca9 numaralı izolatin *E. cautella*'ya karşı % 57 oranında öldürücü etkiye sahip olduğu tespit edildi. Ayrıca bakteriyal etmen olarak tanımlanmış daha önceki çalışmalarda *Balaninus nucum*'dan izole ve karakterize edilen ve Lepidoptera grubu üzerindeki etkinliği belirlenmiş bir *Bacillus thuringiensis* suşu olan BnBt izolatinın bu zararlı üzerinde % 25 oranında öldürücü etkiye sahip olduğu belirlendi. *P. interpunctella*'ya karşı en yüksek öldürücü etki yine Eca9 numaralı izolat tarafından % 100 olarak oranıyla belirlendi. BnBt izolatinın ise bu zararlı üzerinde % 22 oranında etki gösterdiği belirtilmektedir (Demeli, 2012). Eca9 numaralı izolatin hem *E. cautella* hem de *P. interpunctella* üzerinde en yüksek öldürücü etkiye sahip olması, *cry1* ve *cry2* genlerini ihtiva etmesinden dolayı bu iki zararlı için potansiyel bir biyolojik mücadele etmeni olarak gelecekte kullanılabileceği düşünülmektedir.

E. kuehniella'ya karşı ise Eca8 numaralı izolatin % 100, Eca9 numaralı izolatin ise % 75 ölüm gösterdiği tespit edildi. Demeli (2012), yaptığı çalışmada BnBt izolatinın bu tür üzerinde yaklaşık olarak % 90 etki gösterdiğini tespit etmiştir.

McGaughey ve Johnson (1987), *B. thuringiensis*'in 51 izolatinın HD-1 izolatina dayanıklı *P. interpunctella* popülasyonuna etkinliğini denemiş, bunlardan 21'inin etkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Aynı araştırmacılar bu izolatların etkinliklerinin, beta

ekzotoksin içeriklerinden kaynaklandığını belirlemişlerdir. *E. cautella* ve *P. interpunctella*'nın farklı populasyonları arasında *B. thuringiensis*'in aynı preparatına duyarlılık bakımından geniş bir varyasyon bulunmaktadır. *E. kuehniella*'nın İngiltere ırkının Mısır ırkına göre patojenin belli bir preparatına daha dayanıklı olduğu gösterilmiştir. Özet olarak; *B. thuringiensis*'in *E. cautella*, *E. kuehniella* ve *P. interpunctella* 'ya toksisitesi güve türleri ve bunların populasyonlarına göre değiştiği gibi, larva yaşına, patojenin varyete ve izolatının patojenite gücüne ve bir pormülasyondaki spor ve kristallerin oransal miktarlarına göre de değişmektedir.

Bu çalışma kapsamında üç depo zararlısı üzerinde de yüksek öldürücü etkiye sahip olan ve Lepidoptera takımı üzerinde oldukça etkin olan *cry1* ve *cry2* genlerini bünyesinde barındıran *B. thuringiensis*'lerin (Eca8 ve Eca9), depo zararlılarına karşı kullanılabilme potansiyelinin olduğu düşünülmektedir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışma sonucunda, dünyada ve ülkemizde depolanabilir tarım ürünlerinde çok ciddi zararlara sebep olan *Ephestia cautella*'dan 13 bakteriyal izolat elde edildi. Elde edilen bu izolatların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler özellikleri belirlenerek üç depo zararlısı üzerinde insektisidal etkileri tespit edildi. Çalışmada elde edilen sonuçlar:

- 1) *E. cautella*'dan 13 bakteriyal izolat elde edildi. Bu izolatların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler özelliklerine göre karakterizasyonları yapıldı ve tanımlanmaları gerçekleştirildi.
- 2) Bunlardan 3 tanesi cins seviyesinde diğerleri ise tür seviyesinde tanımlandı. Bu sonuçlara göre Eca1, Eca3 ve Eca11 *Serratia* sp. olarak, Eca2, Eca4, Eca6, Eca7, Eca8, Eca9, Eca10, Eca12 ve Eca13 *Bacillus thuringiensis* olarak, Eca5 ise *Bacillus axarquensis* olarak tanımlandı.
- 3) Eca2, Eca4, Eca6, Eca7, Eca8, Eca9, Eca10, Eca12 ve Eca13 numaralı bakteriyal izolatların *Bacillus thuringiensis* türüne ait farklı suşlar olabileceğine karar verildi.
- 4) *Bacillus thuringiensis* olduğu belirlenen Eca2, Eca4, Eca6, Eca7, Eca8, Eca9, Eca10, Eca12 ve Eca13 numaralı bakteriyal izolatların hepsinin *cry1* ve *cry2* genini buldukları belirlendi.
- 5) Eca9 nolu bakteriyal izolatın % 57 oranıyla *Ephestia cautella*, % 100 oranıyla *Plodia interpunctella* üzerinde en yüksek ölüm etkisine sahip olduğu belirlendi.
- 6) Farklı zararlılardan izole edilen ve Lepidoptera takımına ait zararlılar üzerinde yüksek öldürücü etkiye sahip olduğu bilinen *Bacillus* türlerinden BnBt'nin *E. cautella* larvaları üzerinde % 25 öldürücü etkiye sahip olduğu belirlendi.
- 7) *Ephestia kuehniella* üzerinde en yüksek öldürücü etkiyi % 100 ölüm oranıyla Eca11 nolu bakteriyal izolatın gerçekleştirdiği belirlendi.
- 8) Böylelikle Eca9 ve Eca11 nolu bakteriyal izolatların bu üç depo zararlısı üzerinde en yüksek öldürücü etkiye sahip olduğu tespit edildi.

6. ÖNERİLER

Bu çalışmada, *Ephestia cautella*'dan 3'ü cins 10'u tür seviyesinde olmak üzere toplam 13 farklı bakteriyal izolatlar elde edildi ve bunların zararlı üzerindeki insektisidal etkileri araştırıldı. Ayrıca, farklı böceklerden izole edilen yüksek insektisidal etkiye sahip bir *Bacillus thuringiensis* türünün *E. cautella* üzerindeki insektisidal etkileri belirlendi. Çalışmada ulaşılan sonuçlardan hareketle, gelecek çalışmalara yönelik olarak aşağıdaki hususlar belirlenmiştir.

- 1) Elde edilen izolatların, başka depolanabilir tarım ürünleri üzerinde zarar oluşturan Lepidoptera takımına ait böcekler üzerindeki insektisidal etkileri araştırılabilir.
- 2) Elde edilen *Bacillus thuringiensis* izolatlarının cry toksin protein içeriği belirlenebilir. *cry1* ve *cry2* genlerinin alt türleri tespit edilebilir.
- 3) Cins seviyesinde tanımlanan bakterinin, G+C içeriği, DNA-DNA hibridizasyonu, DNA'nın GC analizi ve yağ asitlerinin gibi ilave yöntemler kullanarak tür seviyesinde tanımlamaları gerçekleştirilebilir.
- 4) Aynı bakteri türünün farklı bir suşu olduğu düşünülen izolatların alt tür belirleme çalışmaları yapılabilir.
- 5) İnsektisidal aktivite testleri yapılırken zararlı böcek larvalarına sadece tek bir izolat uygulandı. Birden fazla izolatın etkisi aynı anda denenebilir.
- 6) Labaratuvar koşullarında sağlanan yüksek öldürme oranı, alan uygulamalarıyla depo koşullarında denenebilir.
- 7) Farklı özelliklerdeki mikrobiyal etmenlerin (virüs, fungus, protozoa ve nematod gibi) zararlı üzerindeki etkileri belirlenebilir.
- 8) Yüksek öldürücü etkiye sahip olan izolatların mikrobiyal mücadele preparatına dönüştürme çalışmaları başlatılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Abbott, W. S., 1925. A Method of Computing of Effectiveness of on Insecticide, J. Econ. Entomol., 18, 265–267.
- Ağar, S., Aydınoglu, H., Temel, O., İkizunal, K. ve Ece, H., 1991. Pestisit kullanımının tarihçesi, bugünü ve geleceği, Türk Entomol. Derg.,15, 4, 247-256.
- Akan, K. ve Ferizli, A. G., 2011. Sülfürlü Florit (SO₂F₂)'in İncir Kurdu, *Ephestia Cautella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae)'nın Pupa Evresine Etkisi. Bingöl Üniv. Fen. Bil. Dergisi, 1, 2.
- Akova, Y., 2009a. Kuru incir, T.C. Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı İhracatı Geliştirme Etüd Merkezi Raporu, 5s.
- Akova, Y., 2009b. Kuru üzüm, T.C. Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı İhracatı Geliştirme Etüd Merkezi Raporu, 6s.
- Alaoğlu, Ö., 1989. *Bacillus thuringiensis*'in Depolanmış Tahıllardaki Lepidoptera Larvalarının Mücadelesinde Kullanılması, Atatürk Ü. Zir. Fak. Der., 20,1.
- Aoki, K. ve Chigasaki, Y., 1915. Ueber die Pathogenität der Sog Sotto Bacillen (Ishawata) bei Seidenraupen. Mitt. Med. Fak Kais, Univ., Tokyo. 13, 419-440.
- Angus, T.A., 1954. A Bacterial Toxin Paralysing Silkworm Larvae, Nature (Lond), 173, 545-546.
- Angus, T.A., 1956. Association of Toxicity with Protein Crystalline Inclusions of *Bacillus sotto* Ishiwata, Can. J. Microbiol., 2, 122-131.
- Arif, B. ve Kurstak, E., 1991. Viruses of Invertebrates, Kurstak, E. (Ed.), Marcel Dekker, Inc., 179, New York, USA.
- Arthur, F.H., 1996. Grain protectants: current status and prospect for the future. J. Stored Prod.Res.,32, 293-302.
- Aytaç, G.K., 2009. Buğday unu, T.C. Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı İhracatı Geliştirme Etüd Merkezi Raporu, 5s.
- Babadoğan, G., 2009. Fındık ve fındık mamülleri. T.C. Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı İhracatı Geliştirme Etüd Merkezi Raporu, 9s.
- Bahar, A.A. ve Demirbag, Z. , 2007. Isolation of pathogenic bacteria from *Oberea linearis* (Coleoptera: Cerambycidae). Biologia, Bratislava, 62,1, 13-18.

- Banks, H.J. 1994. Fumigation an endangered technology? In: Highley, E., Wright, E.J., Banks, H.J., Champ, B.R. (Eds.), Proceedings of the Sixth International Wkg. Conference on Stored-product Protection, 17-23 April, Canberra, Australia, Vol. 1, CAB International, Oxon, pp. 2-6.
- Beegle, C.C. ve Yamamoto, T., 1992. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner Research and Development, Can. Entomol., 124, 587-616.
- Bell, C.H., 2000. Fumigation in the 21st century Crop Protection, 19, 563-569.
- Bell, C.H., 1976. The tolerance of developmental stages of four stored product moths phosphine. J. of Stored Prod. Res., 12, 76-86.
- Bell, J. V., 1969. *Serratia marcescens* Found in Eggs of *Heliothis zea*: Tests Against *Trichoplusia ni.*, J. Invertebr. Pathol., 13, 151-152.
- Ben-Dov, E., Boussiba, S. ve Zaritsky, A., 1995. Mosquito Larvicidal Activity of *Escherichia coli* with Combinations of Genes from *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*, J. Bacteriol., 2581-2587.
- Ben-Dov E., Zaritsky A., Dahan E., Barak Z., Sinai R., Manasherob R., Khameraev A., Troitskaya E., Dubitsky A., Berezina N. ve Margalith Y., 1997. Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*, Appl. Environ. Microbiol. 63, 4883-4890.
- Benson, H. J., 1985. Microbiological Applications, a Laboratory Manuel in General Microbiology, Brock, Fourth Edition, Wm C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa.
- Berliner, E., 1915. About the Sleep Sickness of the *Ephestia kuehniella Zell* and Its Vector *Bacillus thuringiensis*, Z. Angew. Entomol., 2, 29-56.
- Berliner, E., 1911. Uber die Schlafsucht der Mehlmottenraupe, Z. Gesamte, Getreidewes. 3, 63-70.
- Bernard, R. G. ve Jack J. P., 2003. Molecular Biotechnology - Principles and Applications of Recombinant DNA, Baskı: 3, Amer Society for Microbiology, New York.
- Bodwitch T. G. ve Madden J.L., 1996. Spatial and Temporal Distribution of *Ephestia cautella* (Walker) (Lepidoptera:Pyralidae) in a Confectionery Factory: Causal Factors and Management Implications. Journal of Stored Products Research, 32, 2,123-130.
- Boxall, R.A., 2001. Post-harvest losses to insect-a world overview. International Biodeterioration&Biodegradation 48, 137-152.
- Braxton, S. M., Onstad, D. W., Dockter, D. E., Giordano, R., Larsson, R. ve Humber, R. A., 2003. Description and Analysis of two Internet-Based Databases of Insect Pathogens: EWDIP and VIDIL, J. Invertebr. Pathol., 83, 185-195.

- Brooks, W. M., 1988. Entomogenous Protozoa, In "Handbook of Natural Pesticides", Vol. V: "Microbial Insecticides, Part A: Entomogenous Protozoa and Fungi" (Ignoffo, C. M. ve Mandava, E. D., Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL.1-149.
- Burges, H.D. ve Hurst, J.A., 1977. Ecology of *Bacillus thuringiensis* in Stroge Moths, J. Invertebr. Pathol., 30, 131-139.
- Bülbül, S., 1993. Researchs on the possibilities of the use of cooling technique for the controlling of the dried fig moth, (*Cadra cautella* Wlk. (Lepidoptera: Pyralidae) (in Turkish). Ph.D thesis. Ege University, Graduate School. 114 p.
- Calderon, M. ve Gonen, M., 1971. Effects of gamma radiation on *Ephestia cautella* (Wlk.) (Lepidoptera, Phycitidae) – Effects on adults. Journal of Stored Products Research 7, 2, 85-90.
- Cappuccino, J. G. ve Sherman, N., 1992. Microbiology, a Laboratory Manual, Third Edition, Rockland Community College, Suffern, New York.
- Carozzi, N.B., Kramer, V.C., Warren, G.W., Evola, S. ve Koziel, M.G., 1991. Prediction of Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains by Polymerase Chain Reaction Product Profiles, Appl. Environ. Microbiol., 57, 3057-3061.
- CDMS., "Crop Data Management Systems." <http://www.cdms.net/manuf/manuf.asp>, 12/10/1998.
- CEPA/DPR., "USEPA/OPP Pesticide Products Database." <http://www.cdpr.ca.gov/docs/epa/m2.htm>, 12/10/1998.
- Chaudhry, M.Q. 1997. A Review of the Mechanisms Involved in the Action of Phosphine as an Insecticide and Phosphine Resistance in Stored-Product, Insects Pestic. Sci., 49, 213-228.
- Cline, L. D. , Press, J. W. ve Flaherty, B. R. 1984. Preventing the spread of the almond moth (Lepidoptera: Pyralidae) from infested food debris to adjacent uninfested packages, using the parasite *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). J.Econ. Entomol., 77, 331-333.
- Cline, L. D., Flaherty, B. R. ve Press, J. W. 1983. Response of selected parasitoids and predators of stored-product insects to whitelight or blacklight traps. J. Econ.Entomol., 76, 298-301.
- Copping, L.G. (ed.), 1998. The Biopesticide Manual, British Crop Protection Council, Franham, Surrey, U.K.
- Coşkuncu, K.S., 2005. Depolanmış Ürünlerde Zararlı Böceklerle Mücadelede Feromon Tuzakların Kullanım Olanakları, OMÜ Zir. Fak. Dergisi,20, 2, 92-97.
- DeBach, P., 1974. Biological Control by Naturel Enemies. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Demeli, M., 2012. Fındık ve Tahıl Ambarlarından *Bacillus* İzolasyonu, Karakterizasyonu ve İzolatların İnsektisidal Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Demirbağ, Z. ve Beldüz, A. O., 1997. Baculovirüs'ün Biyolojik Mücadeledeki Önemi, Kükem Dergisi, 20, 1, 49-58.
- Denolf, P., Hendrickx, K., Vandamme, J., Jansens, S., Peferoen, M., Degheele, D. ve Vanrie, J., 1997. Cloning and Characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* Midgut Aminopeptidase N Enzymes Related to *Bacillus thuringiensis* Toxin-Binding Proteins, Eur. J. Biochem., 248: 748-761.
- Donahaye, E.J., Navarro, S. ve Leesch, J.G., 2001. Proc. Int. Conf. Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products, Fresno, CA. Executive Printing Services, Clovis, CA, U.S.A. pp. 113-117
- Dulmage, H.T., 1970. Insecticidal Activity of HD-1, a New Isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*, J. Invertebr. Pathol., 15, 232-239.
- Ecevit, O., 1988. Zirai Mücadele İlaçları ve Çevreye Olan Etkileri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları, 27, Samsun.
- Ertürk, H. 1963. Batı anadolu incirlerinde zarar yapan Lepidopter'lerden Phycitidae familyası türleri ve bunlardan incir kurdu (*Ephestia cautella* Walk.)'un biyolojisi, zarar şekli ve mücadele imkanları üzerinde araştırmalar. Tarım Bakanlığı Bornova Zirai Mücadele Enstitüsü Yayınları. Teknik bülten no:9. İzmir, 118.
- Feitelson, J.S., 1993. The *Bacillus thuringiensis* Family Tree, p. 63-71. In Kim, L. (ed.), Advanced Engineered Pesticides. Marcel Dekker. Inc., New York, N.Y.
- Feitelson, J.S., Payne, J. ve Kim, L., 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and Beyond, Bio/Technology, 10, 271-275.
- Ferizli, A.G., Emekci, M., Tütüncü, S ve Navarro, S., 2004. The efficacy of phosphine fumigation against dried fruit pests in Turkey. IOBC WPRS (OILB SROP) Integrated Protection of Stored Products, 27, 9, 265-269.
- Ferizli, A.G. ve Emekçi, M., 2000a. Depolanmış Ürün Zararlılarıyla Savaşım, Sorunlar ve Çözüm Yolları, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü-Ankara.
- Ferizli, A.G. ve Emekçi M., 2000b. Carbon Dioxide Fumigation as a Methyl Bromide Alternative for the Dried Fig Industry. 2000 Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions. November 6-9, 2000. Orlando, Florida. Proceedings book, 81-1.
- Gaugler, R., 1997. Alternative Paradigms for Commercializing Biopesticides, Phytoparasitica, 25, 179-182.

- Georgis, R., 1997. Commercial Prospects of Microbial Insecticides in Agriculture, In “Microbial Insecticides: Novelty or Necessity?” (Evans, H. F., Chair), Proc. Br. Crop. Prot. Council Symp., 68, 243-252.
- Glazer, I. ve Lewis, E. E., 2000. Bioassays for Entomopathogenic Nematodes, In “Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes” (Navon, A. ve Ascher, K. R. S., Eds.), CAB International Publishing 229-247.
- Gökce, C., Sevim, A., Demirbag, Z. ve Demir, I., 2010. Isolation, characterization and pathogenicity of bacteria from *Rhynchites bacchus* (Coleoptera: *Rhynchitidae*) Biocontrol Science and Technology, 20, 9, 973-982.
- Goldberg, L.J. ve Margalit, J., 1977. A Bacterial Spore Demonstrating Rapid Larvicidal Activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*., Mosq. News, 37, 355-358.
- Granados, R. R. ve Federici, B. A., 1986. The Biology of Baculoviruses, Vol. 2, Practical Applications for Insect Control, Boca Raton, FL.
- Gröner, A., 1986. Specificity and Safety of Baculoviruses, In “The Biology of Baculoviruses, 2, Practical Applications for Insect Control” (Granados, R. R. ve Federici, B. A., Eds.), 177-202. Boca Raton, FL.
- Hagler, J. R., 2000. Biological control of insects (chapter7). In: Recheigl, E.S. and N.A. Recheigl E.d, Insect pest management; Techniques for environmental protection. CRC press LLC.
- Hajek, A. E., 1997. Ecology of Terrestrial Fungal Entomopathogens, In “Advanced in Microbial Ecology” (Jones, J. H., Ed.), 15, 193-249, Plenum Press, New York.
- Halda-Alija, L., 2004. Incidence of antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* species in freshwater wetlands, Letters in Applied Microbiology, 39, 445-450.
- Hamm, J. J., 1984. Invertebrate Pathology and Biological Control, Journal of Georgia Entomol. Soc., 19, 3, 6-13.
- Hannay, C.L. ve Fitz-James, P.C., 1955. The Protein Crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner, Can. J. Microbiol., 1, 694.
- Harger, J. D., 1987. Applied Epizootiology: Microbial Control of Insects, In “Epizootiology of Insect Diseases” (Fuxa, J. R. ve Tanada, Y., Eds.), 473-496, Wiley, New York.
- Heimpel, A.M., 1967. A Taxonomic Key Proposed for the Species of “Crystalliferous” Bacteria. J. Invertebr. Pathol., 9, 364-375.
- Hoffman, M. P. ve Frodsham, A. C., 1993. Naturel Enemies of Vegetable Insect Pests, Cooperative Extension, 63, Cornell University, Ithaca.

- Hunter, D. K. ve Hoffmann, D. F., 1970. A Granulosis Virus of the Almond Moth, *Cadra cautella*, Journal of Invertebrate Pathology 16, 400-407.
- Ince, I. A., Katı, H., Yılmaz, H., Demir, İ. ve Demirbağ, Z., 2008. Isolation and identification of bacteria from *Thaumetopoea pityocampa* Den. and Schiff. (Lep., Thaumetopoeidae) and determination of their biocontrol potential. World J Microbiol Biotechnol., 24, 3005-13015.
- Ishiwata, S., 1901. On a Kind of Severe Flacherie (sotto disease), Dainihon Sanshi Kaiho, 114, 1-5.
- Jackson, T. A., Boucias, D. G. ve Thaler, J. O., 2001. Pathobiology of Amber Disease, Caused by *Serratia spp.*, in the New Zeland Grass Grub, *Costelytra zealandica*, J. Invertebr. Pathol., 78, 232-243.
- Jeyaprasaksh, A., Hoy, M. A. ve Allsopp, M. H., 2003. Bacterial Diversity in Worker Adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) Assessed Using 16S rRNA Sequences, J. Invert. Pathol., 84, 96-103.
- Kaelin, P., Morel, P. ve Gadani, F., 1994. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from Stored Tobacco and *Lasioderma serricorne* (F.), Appl. Environ. Microbiol., 60, 19-25.
- Katı, H., Sezen, K., Beldüz, A.O. ve Demirbağ, Z. 2005. "Characterization of a *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain isolated from *Malacosoma neustria* L. (Lepidoptera: Lasiocampidae)", Biologia, Bratislava, 60, 3, 301-305.
- Kaya, H. K. ve Stock, S. P., 1997. Techniques in Insect Nematology, In "Manuel of Techniques in Insect Pathology" (Lacey, L. A., Ed.), 281-324, Academic Press, London.
- Kinsinger, R.A. ve McGaughey, W.H., 1979. Susceptibility of populations of indianmeal moth and almond moth to *Bacillus thuringiensis*, J.Econ. Entomol., 72, 3, 346-349
- Klein, M. G. ve Kaya H. K., 1995. *Bacillus* and *Serretia* Species for Scarab control, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 90, 87-95.
- Knowles, B. H., 1994. Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal δ -endotoxin, In Advances in Insect Physiology, 24. Evans, P.D., 275-308. Academic Press, London.
- Krieg, A., 1987. Diseases Caused by Bacteria and Other Prokaryotes, In "Epizootiology of Insect Diseases" (Fuxa, J. R. ve Tanada, Y., Eds.), 323-355, J. Wiley, New York.
- Kuzina, L. V., Peloquin, J. J., Vacek, D. C. ve Miller, T. A., 2001. Isolation and Identification of Bacteria Associated with Adult Laboratory Mexican Fruit Flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae), Curr. Microbiol., 42, 290-294.

- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K. ve Vail, P., 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future?, Biol. Control, 21, 230-248.
- Lacey, L. A. ve Kaya, H. K. (Eds.), 2000. Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evolution of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests, Kluwer Academic, Dordrecht.
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K.P., Prüss, B.M., Kaplan, T., Wiessner-Gunkel, E., Stewartz, G.S.A.B. ve Scherer, S., 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. Nov. Is a New Psychrotolerant Species of the *Bacillus cereus* group, Int. J. Syst. Bacteriol., 48, 1373-1382.
- Lepesme, P., 1937. Sur la Presence du *Bacillus prodigious* chez le Criquet Pelerin (*Schistocerca gregaria* Forsk), Bul. Soc. Hist. Aft. N., 28, 406-411.
- Lian, C., Zhao, J., Zhang, Z. ve Liu, W., 2004. Genotype of *Candida* species associated with different conditions of vulvovaginal candidosis, Mycoses, 47, 495-502.
- Lipa, J. J., 1975. An Outline of Insect Pathology, Warsaw, Poland.
- Lipa, J. J. ve Wiland, E., 1972. Bacteria Isolated from Cutworms and their Infectivity to *Agrotis* sp., Acta Microbiologica, Polonica, Series B 4, 127-140.
- Liu, J., Pionar, G. O. ve Berry, R. E., 2000. Control of Insect Pests with Entomopathogenic Nematodes: The Impact of Molecular Biology and Phylogenetic Reconstruction, Ann. Rev. Entomol., 45, 287-306.
- Lüthy, P. ve Ebersold, H.R., 1981. The Entomocidal Toxins of *Bacillus thuringiensis*, Pharmacol. Ther., 13, 257-283.
- Maddox, J. V., 1987. Protozoan Diseases, In "Epizootiology of Insect Diseases" (Fuxa, J. R. ve Tanada, Y., Eds.), 417-452, Wiley, New York.
- Martin, P.A.W. ve Travers, R.S., 1989. Worldwide Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* Isolates, Appl. Environ. Microbiol., 55, 2437-2442.
- Martinez, A. J., Robacker, D. C., Garcia, J. A. ve Esau, K. L., 1994. Laboratory and Field Olfactory Attraction of the Mexican Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) to Metabolites of Bacterial Species, Florida Entomologist, 77, 1, 117-126.
- Mattes, O., 1927. Parasitare Krankheiten der Mehmotten Larven und Versuche uber ihre Verwendbarkeit als Biologisches Bekämpfungsmittel. Gesell. F. Beford., Ges. Naturw. Sitzber., Marburg, 62, 381-417.
- McGaughey, W.H. ve Johnson, D.E., 1987. Toxicity of different serotypes and toxins of *Bacillus thuringiensis* to resistant and suscepible indianmeal moths. (Lep.Pyralidae) J.Econ. Entom. 80, 6, 1122-1126.

- McGaughey, W.H., 1986. *Bacillus thuringiensis* Applied to Stored Corn Using Grain Drying Fans, Abst. Rev. Appl. Entomol., 75, 10, 5672.
- McGaughey, W.H., 1985. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* for Controlling Indian Meal Moths (Lep. Pyralidae) in Form Grain Bins and Silos, J.Econ. Entomol., 78, 5, 1089-1094.
- McGaughey, W.H., 1980. *Bacillus thuringiensis* for Moth Control in Stored Wheat, Canadian Entomologist 112, 3, 327-331
- McGaughey, W.H. ve Dicke, E.B., 1980. Methods of Applying *Bacillus thuringiensis* to Stored Com for Moth Control, J.Econ. Entom., 73, 2, 228-229.
- McGaughey, W.H., 1978a. Effects of Larval Age on The Susceptibility of Almond Moths and Indianmeal Moths to *Bacillus thuringiensis*, J.Econ, Entomol., 71, 6, 923-925.
- McGaughey, W.H., 1978b. Moth Control In Stored Grain: Efficacy of *Bacillus thuringiensis* on Corn and Method of Evaluation Using Small Bins. J.Econ. Entomol., 71, 5, 835-839.
- McGaughey, W.H. ve Kinsinger, R.A., 1978, Susceptibility of Angoumois Grain Maths to *Bacillus thuringiensis*,. J.Econ. Entomol., 71, 3, 435-436.
- McGaughey, W.H., 1975. *Bacillus thuringiensis* for Controlling Three Species of Moths in Stored Grain, Canadian Entom. 108, 105-112.
- McLaughlin, R. E. ve Keller, J. C., 1964. Antibiotic Control of an Epizootic Caused by *Serratia marcescens* Bizio in the Boll Weevil, *Anthonomus grandis* Boheman, J. Insect Pathol., 6, 481-185.
- Meadows, M.P., Ellis, D.J., Butt, J., Jarrett, P. ve Burges, H.D., 1992. Distribution, Frequency, and Diversity of *Bacillus thuringiensis* in an Animal Feed Mill, Appl. Environ. Microbiol., 58, 1344-1350
- Monro, R.E. 1959. The formation of protein inclusions in *Bacillus thuringiensis*. Ph.D. Thesis dissertation University of Cambridge, England. (Abstract-1960, J. Gen. Microbiol, in press).
- Nakamura, L.K., 1998. *Bacillus pseudomycoides* sp., Nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 48, 1031-1035.
- Nwanze, K.F., Partidaa, G.J. ve Mc Gaughey, W.H., 1975. Susceptibility of *Cadra cautella* and *Plodia interpunctella* to *Bacillus thuringiensis* On Wheat, J.Econ, Entomol., 68, 6, 751-752.
- O'Callaghan, M. ve Jackson, T. A., 1993. Isolation and Enumeration of *Serratia entomophila*, a Bacterial Pathogen of the New Zealand Grass Grub, *Costelytra zealandica*, J. Appl. Bacteriol., 75, 307-314.

- Oğurlu, İ., 2000. Biyolojik Mücadele, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın No: 8, Isparta.
- Osborn Fi , Berlioz L , Vitelli-Flores J. , Monsalve W., Dorta B. ve Lemoine, V.R. 2002. Pathogenic effects of bacteria isolated from larvae of *Hylesia metabus* Crammer (Lepidoptera: Saturniidae). J. Invertebr Pathol 80, 7-12.
- Peter, G., 1984. Plant Pests and Their Control, Fenemore, London.
- Poinar, G. O., 1979. Nematodes for Biological Control of Insects, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Poinar, G. O., 1990. Taxonomy and Biology of Steinernematidae and Heterorhabdidae, In “ Entomopathogenic Nematodes in Biological Control” (Gaugler, R. ve Kaya, H. K., Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL.23-61.
- Rassman, W., 1986. Untersuchungen Zur Wirksamkeit Eines *Bacillus thuringiensis* in Der Getreidelagerung, Abst. Rev. Appl. Entom., 75, 1, 424.
- Rajendran, S. 1993. Responses of stored-products insects to phosphine. In: Navarro, S., Donahaye, E. (Eds.), Proceedings of the International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Grain Storages, June 1992, Winnipeg, Canada, Capsid Pres Ltd., Jerusalem, 85-105.
- Sacchi, C. T., Whitney, A.M., Mayer, L. W., Morey, R., Steigerwalt, A., Boras, A., Weyant, R.S. ve Popovic, T., 2002. Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*, Emerg. Infect. Dis., 8, 1117–1123.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. ve Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Baskı: 2, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sarıyörük, N. ve Köseoglu, A., 1987. Effect of freezing methods to the fig insects in the natural dried figs (in Turkish). B.Sc. Thesis. Ege Univ., Food Engineering Dept. 37 p.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. ve Deon, D. H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its Pesticidal Proteins, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 775-806.
- Sevim, A., Demirbağ, Z. ve Demir, İ., 2010. A new study on the bacteria of *Agrotis segetum* Schiff. (Lepidoptera: Noctuidae) and their insecticidal activities, Turk J. Agric. For. 34, 333-342.
- Sezen, K., Demir, İ. ve Demirbağ, Z., 2007. Identification and pathogenicity of entomopathogenic bacteria from common cockchafer, *Melolontha melolontha* L. (Col., Scarabaeidae), New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 35, 79-85.

- Sezen, K., Demir, İ., Katı, H. ve Demirbağ, Z., 2005. Investigations on Bacteria as a Potential Biological Control Agent of Summer Chafer, *Amphimallon solstitiale* L. (Coleoptera: Scarabaeidae), Journal of Microbiology, 43, 5, 463-468.
- Sezen, K., Demir, İ. ve Demirbağ, Z., 2004. Studies of the Bacterial Flora as a Biological Control Agent of the *Agelastica alni* L. (Coleoptera: Chrysomelidae), Biologia, 59, 3, 327-331.
- Sezen, K. ve Demirbağ, Z., 1999. Isolation and Insecticidal Activity of Some Bacteria from the Hazelnut Beetle (*Balaninus nucum* L.), Appl. Entomol. Zool., 34, 85-89.
- Sifner, F., Zdarek, J., Hrdi, I. ve Kalvoda, L., 1983. Pheromone Traps for The Pest Management of Phycitid Moths. Crop Protection, 2, 4, 463-472.
- Sikorowski, P. P., Nebeker, T. E., Lawrence, A. M. ve Price, T. S., 1985. Virus and Virus-Like Particle Found in Southern Pine Beetle Adults in Mississippi and Georgia, Eastern Forests USDA Miscellaneous, 675, Entomol. Soc., 15, 235-241.
- Smith, R.A. ve Couche, G.A., 1991. The Phyllophane as a Source of *Bacillus thuringiensis* Variants, Appl. Environ. Microbiol., 57, 311-315.
- Smedley, D.P. ve Ellar, D.J., 1996. Mutagenesis of 3 Surface-Exposed Loops of a *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Toxin Reveals Residues Important for Toxicity, Recognition and Possibly Membrane Insertion, Microbiology, 142, 1617-1624.
- Sneath, A. P., 1968. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2, Sneath, A. P., Mair, N. S., Sharge, M. S. ve Holt, J. G., Williams and Wilkins, Baltimore.
- Springer, B., Stockman, L., Teschner, K., Roberts, G. D. ve Bottger, E. C., 1996. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods, J. Clin. Microbiol., 34, 296-303.
- Steinhaus, E. A. ve Marsh, G. A., 1962. Report of Diagnosis of Diseased Insects, 1951-1961, Hilgardia, 33, 349.
- Steinhaus, E. A., 1956. Microbial Control: The Emergence of an Idea, J. Agric. Sci., 26, 107-160.
- Steinhaus, E. A., 1951. Possible Use of *Bacillus thuringiensis* Berliner as an aid in the Biological Control of the Alfalfa Caterpillar, Hilgardia, 20, 359.
- Subramanyam, B.H. ve Cutkomp, L.K., 1985. Moth control in stored grain and the role of *Bacillus thuringiensis*: An overview. Residue Reviews. 94, 1-47.
- Tanada, Y. ve Kaya, H.K., 1993. Insect Pathology, Academic Pres, San Diego.
- Teyler, P.S., Taylor, R.W.D. ve Rees, D.P., 1983. Insect resistance to phosphine fumigations in food warehouses Bangladesh. Int. Pest Control, 25, 10-13.

- Turnbull, P., Kramer, J. ve Melling, J., 1990. *Bacillus*. In: Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, Vol. 2, Systematic Bacteriology, 8th edn. Parker, M.T. Duerden, B.I., (eds.), 187-210. Edward Arnold, London.
- Tunca, H., 2005. *Cadra cautella* Walker (Lepidoptera: Pyralidae)'nın Yumurta-Larva Parazitoiti *Chelonus oculator* Panzer (Hymenoptera: Braconidae)'un Biyolojisi Ve Davranışı Üzerinde Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Tunçyürek, C. M. 1972. *Bracon hebetor* Say. (Hymenoptera : Braconidae) ile *Cadra cautella* (Walk.) ve *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera : Pyralidae)'ya karşı biyolojik savaş imkanları üzerine araştırmalar. Tarım Bakanlığı Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü araştırma eserleri serisi. Teknik bülten No.20. İzmir. p 78.
- UNEP, 1995. Montreal Protocol on substances that deplete the ozone layer. 1994 Report of the Methyl Bromide Technical Options Committee. 1995 Assessment. UNEP, Nairobi, Kenya, 304pp. ISBN 92- 807-1448-1448-1.
- URL-1,<http://www.bahcesel.net/forumsel/depolanmis-urun-zararlilari-kitabi/30499-4-depolanmi350-urun-zararlisi-boceklere-kar350i/>, 10.01.2013.
- URL-2,<http://www.bahcesel.net/forumsel/depolanmis-urun-zararlilari-kitabi/30484-lepidoptera-pyralidae-ephestia-cautella-walker-304ncir/>, 03.01.2013.
- URL-3,http://www.schaedlingskunde.de/Steckbriefehtm_SeitenTropische-Speichermotte-Ephestia-cautella.htm, 26.12.2012.
- URL-4: http://www.ziraat.ege.edu.tr/enverSunular-depo-zar2_Lepidoptera.pdf, 10.01.2013.
- URL-5:http://www.schaedlingskunde.de/Steckbriefehtm_SeitenTropische-Speichermotte-Ephestia-cautella.htm, 20.12.2012.
- Uslu, S., Ferizli A. G. ve Navarro, S., 2010. Time/Dose Mortality of Low Level Phosphine to Almond Moth Bet Dagan 50250, Israel.
- Uygun, N., Ulusoy, M.N. ve Satar, S., 2010. Biyolojik Mücadele, Türk. Biyo. Müc. Derg., 1, 1, 1-14.
- Ünal, G., 1998. Zirai Mücadele İlaçları Toksikolojisi ve Çevre, Ankara Zirai Mücadele Enstitüsü Seminer Notları, Ankara.
- Van den Bosch, R., Messenger, P.S. ve Gutierrez, A.P., 1982. An Introduction to Biological Control. Plenum Press, New York.
- Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D. ve Van Mellaert, H., 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins: Importance of Specific Receptors on the Brush Border Membrane of the Mid-Gut of Target Insects, Eur. J. Biochem., 186, 239-247.

- Visser, B., Bosch, D. ve Honée, G., 1993. Domain-Function Studies of *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins: A Genetic Approach. In: Entwistle, P.F., Cory, J.S., Bailey, M.J., Higgs, S. (eds.), *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Pesticide: Theory and Practice. Chichester, New York, Toronto, Wiley and Sons, 71-88.
- Whalon, M.E. ve Wingerd, B.A. 2003. Bt: Mode of Action and Use. Arch of Insect Biochem. and Phys. 54, 200–211.
- Weeden, C.R., Shelton, A.M. ve Hoffman, M.P., 2007. Biological Control: A Guide to Natural Enemies in North America.
- Weiser, J., 1969. An Atlas of Insect Diseases, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague.
- Woese, C. 1990. *Prokaryote Systematics: The Evolution of a Science* (second ed.), Prokaryotes., 3–18.
- Zhang, C.X., Yang, S.Y., Xu, M. X., Sun, J., Liu, H., Liu, J.R., Liu, H., Kan, F., Sun, J, Lai, R. ve Zhang, K.Y., 2009. *Serratia nematodiphila* sp. nov., associated symbiotically with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae), International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59, 1603–1608.
- Zettler, J.L., 1997. Influence of resistance on future fumigation technology. In: Donahaye, E., Navarro, S., Varnava, A. (Eds.), Proceedings of the International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products, 21-26 April. Printco Ltd., Nicosia, Cyprus, 445-454.

8. EKLER

Ek 1., Besiyeri, Ayıraç ve Boyaların Hazırlanışı

Ek 1. 1., Besiyerlerinin Hazırlanışı

MacConkey Agar (MCA): Toz halindeki hazır besiyerinden 1 L için 40g alıp, ddH₂O'da çözülür ve otoklavda steril edilir.

Nişasta Agar: 1g patates nişastası 10 ml soğuk ddH₂O'da çözülüp 100 ml nütrient agarla karıştırıldı ve otoklavlanarak steril edildi.

Nütrient Agar (NA): Ticari olarak satılan hazır nütrient agar kullanıldı. 1000 ml besiyeri için 28 g tartılıp 1000 ml ye tamamlanır ve otoklavlanarak steril edilir.

Nütrient Broth (NB): Ticari olarak satılan hazır nütrient broth kullanıldı. 1000 ml besiyeri için 13 g tartılıp 1000 ml ye tamamlanır. pH'ı 7,0'a ayarlanarak otoklavda steril edildi.

Triptofan Broth: 15 g hazır triptofan broth 1000 ml ddH₂O'da çözüldü; otoklavlanarak steril edildi.

Tryptic Soy Agar (TSA): 40 g hazır besiyer 1000 ml ddH₂O'da çözüldü; otoklavlanarak steril edildi.

Üre Hidroliz: 0,1 g yeast extract, 9,1 g potasyum fosfat monobazik, 9,5 g potasyum fosfat dibazik, 0,2 g üre ve 0,001 g fenol kırmızısı karışımına 117 ml ddH₂O ilave edildi; pH'ı 6,8'e ayarlandıktan sonra 0,45 µm gözenek büyüklüğüne sahip steril filtrelerden geçirilmek suretiyle steril edildi.

Ek 1.2., Ayıraçlar ve Boyaların Hazırlanışı

Aseton Alkol: 250 ml % 95'lik etanol ve 250 ml saf aseton karıştırılarak hazırlandı.

Bakır Sülfat (CuSO₄) Solüsyonu: 20 g bakır sülfat (CuSO₄.5H₂O) 80 ml suda çözülerek hazırlandı.

Dimetil-α-Naftilamin: 5 g α-naftilamin 1000 ml ve 5 N'lik asetik asitte çözülerek hazırlandı.

Gram İyodu: 1 g iyot ve 2 g potasyum iyodür (KI) 5 ml ddH₂O'da çözüldü; üzerine 250 ml ddH₂O ve 60 ml % 5'lik sodyum bikarbonat (NaHCO₃) ilave edildi.

Katalaz Ayıraç: Ayıraç olarak % 10'luk hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisi kullanıldı.

Kovak Kimyasalı: 5 g p-dimetilaminobenzaldehid 75 ml amilalkolde çözüldü ve 25 ml HCl ilave edildi.

Kristal Viyole Boyası: Bu boya iki ayrı solüsyon olarak hazırlanıp ardından ikisi birbirine karıştırıldı: 1) 1 g kristal viyole, 10 ml etanol, 90 ml distile su ile karıştırıldı. 2) 4 g amonyum oksalat ve 400 ml ddH₂O karıştırıldı. Bu iki solüsyon daha sonra birbirine karıştırılarak kullanıldı.

Malaşit Yeşili: 5 g malaşit yeşili 100 ml ddH₂O'da çözüldü; süzgeç kağıdı yardımıyla süzülerek kullanıldı.

Oksidaz Ayıraç: 6% tetrametilfenilendiamin hidroklorit, dimetil sulfoksit çözeltisinde hazırlanır.

Safranin: 2,5 g safranin O, 100 ml %95'lik etanol ve 500 ml ddH₂O karıştırılarak hazırlandı.

Ek 2., Elde Edilen İzolatların 16S rRNA Gen Sıraları

Eca1

ATGGTACACNCTCTGCAAGTCGAAGCGGTAGCACAGGGGAAGCTTGCTCCCCG
 GGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGG
 GGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAA
 GAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTA
 GTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGA
 TGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
 AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTG
 TGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGA
 GCTTAATACGCTCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTC
 CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTG
 GCGGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCT
 CAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGT
 AGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTG
 GCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCANGTGCGAAAGCGTGGGG
 AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTG
 GAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGC
 CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGC
 ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTA
 CTCTTGACATCCAGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTG
 AGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAG
 TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTTCGGCCGGGAAC
 TCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGT
 CATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAAA
 GAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTCGTAGTCCG
 GATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTGTAATCGTAGAT
 CAGAAT

Eca2

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGC
 AGCCTACAATCCGAACTGAGAACGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGT
 CTTGCAGCTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTTCAGAGGATGT
 CAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCG
 CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCC
 CAGGCGGAGTGCTTAATGCGTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTA

ACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTT
 GCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTACAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCG
 CCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCA
 CTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAG
 CCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTTACGCCCA
 ATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTA
 GTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAG
 CACTTGTCTTCCCTAACAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCA
 CGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGC
 CTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTC
 AGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAAT
 GCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTC AATTCGAAC
 CATGCAGTTCAA AATGTTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCA
 GTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACTTCATA
 AGAGCAAGCTCTTAATCCATTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCA
 GCGTTCATCCTGAGCCATGATCAA ACTCTAGAAT

Eca3

ATGGTAGTCGAAGCGGTAGCACAGGGGAAGCTTGCTCCCTGGGTGACGAGCG
 GCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACT
 GGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTT
 CGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTA
 ATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACA
 CTGGA ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
 GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTT
 CGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAGCTTAATACGTTCA
 TCAATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
 CGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAC
 GCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTG
 CATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTTCCAGGTG
 TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCC
 CCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
 AGATAACCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTT
 GAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGC
 CGCAAGGTTAAA ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC
 ATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGA
 GAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCA
 TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
 CAACCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGC
 CAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTAC
 GAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAGCGACCTCG
 CGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAA
 CTCGACTCCCATGAAGTTCGGAAATCGCTAGTNATCGTAGATCAGAAT

Eca4

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGC
 AGCCTACAATCCGAACCTGAGAACGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGT
 CTTGCAGCTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTTCAGAGGATGT
 CAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCG
 CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTION
 CAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTA
 ACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTT
 GCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTGAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCG
 CCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTACCCGCTACACATGGAATTCCA
 CTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAG
 CCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTACGCCCA
 ATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTA
 GTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAG
 CACTTGTCTTCCCTAACAAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCA
 CGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGC
 CTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTC
 AGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAAT
 GCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTC AATTTGGAAC
 CATGAAGTTCAAATGTTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCA
 GTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCGCTAACTTCATA
 AGAGCAAGCTCTTAATTCATTCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAG
 CGTTCATCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

Eca5

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGC
 AACTGCGATCCGAACCTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGT
 TTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACATCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGT
 CAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCG
 CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCACCGTACTCCC
 CAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTA
 ACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTT
 GCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTGCAGACCAGAGAGTCGCCTTCG
 CCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGAATTCCA
 CTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAG

CCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGGAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCA
 ATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTA
 GTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTCGAACGG
 TACTTGTCTTCCCTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCA
 CGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGC
 CTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTC
 AGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAAT
 GCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAACC
 ATGCGGTTCAAACAAGCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCA
 GTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCGCTAACATCAG
 GGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAG
 CGTTCGTCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

Eca6

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGC
 AGCCTACAATCCGAACCTGAGAACGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGT
 CTTGCAGCTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTTCAGAGGATGT
 CAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTTCGAATTAACCACATGCTCCACCG
 CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTION
 CAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTA
 AACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTT
 GCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTGAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCC
 CCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTACCCGCTACACATGGAATTCCA
 CTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAG
 CCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTTACGCCCA
 ATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTA
 GTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAG
 CACTTGTCTTCCCTAACAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCA
 CGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGC
 CTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTC
 AGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAAT
 GCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTCAATTTTGAAC
 CATGCAGTTCAAAATGTTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCA
 GTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCGCTAACTTCATA
 AGAGCAAGCTCTTAATTCATTCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAG
 CGTTCATCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

Eca7

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGC
 AGCCTACAATCCGAACCTGAGAACGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGT
 CTTGCAGCTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAGG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTTCAGAGGATGT
 CAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCG
 CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTIONCC
 CAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACCTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTA
 AACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTT
 GCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTGAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCG
 CCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTACCCGCTACACATGGAATTCCA
 CTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAG
 CCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTACGCCCA
 ATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCCACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTA
 GTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAG
 CACTTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCA
 CGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGC
 CTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTC
 AGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAAT
 GCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTC AATTTGGAAC
 CATGCAGTTCAAAATGTTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCA
 GTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCGCTAACTTCATA
 AGAGCAAGCTCTTAATCCATTGCTCGACTTGCAATGATTAGGCACGCCGCCA
 GCGTTCATCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

Eca8

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGC
 AGCCTACAATCCGAACCTGAGAACGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGT
 CTTGCAGCTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAGG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTTCAGAGGATGT
 CAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACCATGCTCCACC
 GCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTIONCC
 CCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCT
 AACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT
 TGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTGAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTC
 GCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTACCCGCTACACATGGAATTCC
 ACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGA

GCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTACGCC
 AATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGT
 AGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTA
 GCACTTGTTCTTCCCTAACAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTC
 ACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTG
 CCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCT
 CAGGTCCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAA
 TGCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTC AATTTGAA
 CCATGCAGTTC AAAATGTTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCC
 AGTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCCGCCGCTAACTTCAT
 AAGAGCAAGCTCTTAATCCATTCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCC
 AGCGTTCATCCTGAGCCATGATCAA ACTCTAGAAT

Eca9

ATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCACTAGTGATTGGTACCGTGTGTGA
 CGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGC
 GATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAC
 TGAGAACGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTTGCAGCTCTTTGTAC
 CGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGAC
 GTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAAC
 TTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAA
 CATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCTCCC
 GAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGG
 TTCTCGCGTTGCTTCGAATTTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC
 GTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGC GGCCGTA CTCCCCAGGCGGAGTGCTTA
 ATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCAT
 CGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTC
 GCGCCTCAGTGTGAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTC
 CATATCTCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCTCTTCTGCAC
 TCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACAT
 CAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTACGCCAATAATTCCGGATAACG
 CTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCT
 GGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTCTTCCCTAA
 CAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGT
 CAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTG
 GGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGGCTACGCATC
 GTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGATGCGGGTCCATC
 CATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTAATTTGAAACCATGCAGTTC AAAATG
 TTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTATGGGCAGGTT
 ACCCACGTGTTACTACCCGTCCGCCGCTAACTTCATAAGAGCAAGCTCTTAAT
 CCATTCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCA
 TGATCAA ACTCTAGAAT

Eca10

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGC
 AGCCTACAATCCGAACCTGAGAACGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGT
 CTTGCAGCTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAGG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTTGTACCCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTTCAGAGGATGT
 CAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCG
 CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTCAGCCTTGCGGGCCGTA CTCCCC
 AGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAA
 CACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTG
 CTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTGAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGC
 CACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTACCCGCTACACATGGAATTCAC
 TTTCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGC
 CGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTTACGCCCAA
 TAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGT
 TAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCA
 CTTGTTCTTCCCTAACAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCAGC
 CGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCT
 CCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCA
 GGTGCGGTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATG
 CGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTCAATTTGGAACC
 ATGCAGTTCAAAATGTTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAG
 TCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCCGCGCTAACTTCATAA
 GAGCAAGCTCTTAATCCATTCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGC
 GTTCATCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

Eca11

ATGGCGGCCGCGGGAATTCGATGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGT
 GCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATC
 CCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAG
 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGAT
 GCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGC
 GAGGAGGAAGGTGGTGAGCTTAATACGCTCATCAATTGACGTTACTCGCAGAA
 GAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGTGCAAG
 CGTTAATCGGAATTA CTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAG
 ATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAG
 AGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
 CTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCA
 GGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCT
 GTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTA
 ACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATG
 AATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAAC

GCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTG
 GTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTG
 TGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCTTTGTTGCCAG
 CGGTTTCGGCCGGGACTCAAAGAGACCTGCCAGTGATAAACTTGGAGGGAGGT
 GGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTA
 CAATGGCGTATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAA
 AGTACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAT
 CGCTAGTAATCGTAGATCAGAAT

Eca12

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGC
 AGCCTACAATCCGAACTGAGAACGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGT
 CTTGCAGCTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAG
 GGCATGATGATTTGACGTACATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTTCAGAGGATGT
 CAAGACCTGGTAAGGTTCTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGC
 TTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGGCCGTACTCCCC
 AGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAA
 CACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTG
 CTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTGAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGC
 CACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTACCCGCTACACATGGAATTCCAC
 TTTCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGC
 CGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTTACGCCCAA
 TAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGT
 TAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCA
 CTTGTTCTTCCCTAACAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCAG
 CGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCT
 CCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCA
 GGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATG
 CGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTCAATTTGGAACC
 ATGCAGTTCAAATGTTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAG
 TCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCCGCGCTAACTTCATAA
 GAGCAAGCTCTTAATCCATTCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGC
 GTTCATCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

Eca13

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGC
 AGCCTACAATCCGAACTGAGAACGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGT
 CTTGCAGCTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAG
 GGCATGATGATTTGACGTACATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA

CCTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
CTGTCACTCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTTCAGAGGATGT
CAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCG
CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATCCCTTGAGTTCAGCCTTGCGGGCCGTACTCCCC
AGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAA
CACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTG
CTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTGAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGC
CACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTACCCGCTACACATGGAATTCCAC
TTTCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGC
CGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTACGCCCAA
TAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGT
TAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCA
CTTGTTCTTCCCTAACAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCACG
CGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCT
CCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCA
GGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATG
CGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTCATTTTCGAACC
ATGCAGTTCAAATGTTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAG
TCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACTTCTTGA
GAGCAAGCTCTCAATCCATTCGCTCGACTTGTCATGTATTAGGCACGCCGCCAG
CGTTCATCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Trabzon'un Yomra ilçesinde doğdu. İlkokulu ve ortaokulu Trabzon'un Arsin ilçesinde ve liseyi Trabzon Affan Kitapçioğlu Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi'nde tamamladı. 2003 yılında başladığı Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümündeki lisans öğretimini 2008 yılında tamamladı ve Biyolog ünvanıyla mezun oldu. Mezun olduktan sonra Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.