

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***CYDIA POMONELLA* GRANULOZİS VİRÜS (CpGV)'ÜN *CYDIA MOLESTA*'DA  
TRANSKRİPSİYONEL ANALİZİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Dönüş TOY**

**EYLÜL 2013**

**TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***CYDIA POMONELLA* GRANULOZİS VİRÜS (CpGV)'ÜN *CYDIA MOLESTA*'DA  
TRANSKRİPSİYONEL ANALİZİ**

**Dönüş TOY**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nce  
“YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)”  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 26/08/2013  
Tezin Savunma Tarihi : 16/09/2013**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. İsmail DEMİR**

**Trabzon 2013**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Biyoloji Anabilim Dalında**

**Dönüş TOY tarafından hazırlanan**

***CYDIA POMONELLA* GRANULOZİS VİRÜS (CpGV)'ÜN *CYDIA MOLESTA*'DA  
TRANSKRİPSİYONEL ANALİZİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 27/08/2013 gün ve 1520 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ .....**

**Üye : Doç. Dr. İsmail DEMİR .....**

**Üye : Prof. Dr. Johannes A. JEHLE .....**

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

“*Cydia pomonella* Granulozis Virüs (CpGV)’ün *Cydia molesta*’da Transkripsiyonel Analizi” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez çalışmalarında, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Johannes A. JEHLE’ye ve tez danışmalığı üstlenen sayın Doç. Dr. İsmail DEMİR’e, çalışmam boyunca değerli fikirlerini ve yardımlarını benden esirgemeyen ve imkânları doğrultusunda her konuda yanımda bulunan sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, gerek laboratuvar, gerek virüs konusunda hiçbir bilgisini ve yardımını esirgemeyen sayın Diana SCHNEİDER’a teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvar arkadaşlarıma ve Darmstadt Julius Kühn Enstitüsündeki laboratuvar arkadaşlarıma, bana her zaman destek olan ve tez çalışmalarım ve tez yazımında desteğini hep yanımda bulduğum sayın Zeynep ERBAŞ’a ve Seda KOCAÇEVİK’e, bana her zaman inanan ve varlıkları ile her zaman güç veren, benden hiçbir imkanlarını esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Dönüş TOY  
Trabzon 2013

## TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Cydia pomonella* Granulozis Virüs (CpGV)’ün *Cydia molesta*’da Transkripsiyonel Analizi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. İsmail DEMİR’in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, 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. 26/08/2013

Dönüş TOY

## 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. Şeftali Bitkisi ve İnsan Hayatındaki Yeri .....	2
1.3. Şeftali Bitkisinin Dünya ve Türkiye Ekonomisindeki Yeri.....	3
1.3.1. Türkiye’de Şeftali İhracatı.....	5
1.3.2. Türkiye’de Şeftali İthalatı.....	6
1.4. Türkiye’de Şeftali Tarımının Genel Sorunları .....	7
1.4.1. Yabancı Otlar.....	8
1.4.2. Hastalıklar.....	8
1.4.3. Zararlılar .....	8
1.5. Doğu Meyve Güvesi ( <i>Cydia molesta</i> Lef., Lepidoptera: Tortricidae).....	10
1.5.1. Tanımı ve Yaşayışı .....	10
1.5.1.1. Ergin .....	10
1.5.1.2. Yumurta.....	10
1.5.1.3. Larva.....	11
1.5.1.4. Pupa .....	11
1.5.2. Zarar Şekli .....	12
1.6. Zararlılar ile Mücadele Yöntemleri .....	13
1.6.1. Kimyasal Mücadele ve Çevreye ve İnsanlara Olan Etkileri.....	13
1.6.2. Biyolojik Mücadele.....	15

1.6.3.	Mikrobiyal Mücadelede Kullanılan Etkin Gruplar.....	16
1.6.3.1.	Bakteriler .....	16
1.6.3.2.	Funguslar .....	17
1.6.3.3.	Nematodlar .....	18
1.6.3.4.	Protozoonlar .....	18
1.6.3.5.	Virüsler .....	19
1.6.4.	<i>Cydia molesta</i> ile Mücadele .....	19
1.6.4.1.	Predatörler .....	19
1.6.4.2.	Parazitler.....	20
1.6.4.3.	Patojenler.....	20
1.7.	Baculovirüsler.....	23
1.7.1.	Baculoviridae Familyasına Ait Genel Özellikler.....	24
1.7.2.	Viral Yapı ve Çoğalma .....	25
1.7.3.	Nükleer Polihedrosis Virüsler (NPVs) .....	26
1.7.3.1.	Giriş Yolları.....	28
1.7.3.2.	Etki Mekanizması.....	28
1.7.3.3.	Semptom ve Göstergeler .....	31
1.7.3.3.	Konukçuları .....	32
1.8.	Çalışmanın Amacı.....	33
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	34
2.1.	<i>Cydia molesta</i> 'nın Temini ve Yetiştirilmesi.....	34
2.2.	<i>Cydia pomonella</i> Granulozis Virüs (CpGV) Suşları .....	34
2.3.	Ivaldi-Sender (1974) Böcek Besiyeri Hazırlanışı.....	35
2.4.	Petroff-Hauser Sayma Çemberinde Virüs Partiküllerinin Sayımı.....	36
2.5.	Biotest.....	36
2.5.1.	<i>Cydia molesta</i> 'da da CpGV-V22 (Andermatt) Çoğaltılması .....	36
2.5.1.1.	Enfekte <i>Cydia molesta</i> 'dan CpGV Gömülü Yapıların İzolasyonu .....	36
2.5.1.2.	Gömülü Yapılardan Viral DNA İzolasyonu.....	37
2.5.2.	<i>Cydia molesta</i> 'nın CpGV ile Enfeksiyonu .....	38
2.6.	CpGV-M'nin <i>Cydia molesta</i> Larvalarındaki Transkriptom Analizi .....	40
2.6.1.	Larvaların Enfeksiyonu .....	40
2.6.2.	Kadavralardan RNA İzolasyonu.....	40
2.6.3.	cDNA Sentezi .....	41

2.6.4.	RT-PCR .....	41
2.6.5.	Agaroz Jel Elektroforezi .....	42
2.7.	<i>İn vivo</i> Klonlama .....	42
2.7.1.	CpGV-V22'nin Genotip İzolasyonu İçin <i>İn Vivo</i> Klonlanması .....	42
2.7.2.	Klonlanan Larvalardan Viral DNA İzolasyonu.....	44
2.7.3.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....	44
3.	BULGULAR .....	46
3.1.	Petroff-Hauser Sayma Çemberinde Virüs OB'lerinin Sayımı .....	46
3.2.	CpGV'ün <i>Cydia molesta</i> 'daki Virülansı .....	46
3.3.	CpGV-M ile Enfekte Edilen <i>Cydia molesta</i> Larvalarından Transkriptom Analizi .....	50
3.3.1.	RNA İzolasyonu .....	50
3.3.2.	RT-PCR .....	50
3.3.2.1.	<i>aktin</i> Primeri ile Yapılan RT-PCR.....	50
3.3.2.2.	<i>ie-1</i> Primeri ile Yapılan RT-PCR .....	51
3.3.2.3.	<i>lef-8</i> Primeri ile Yapılan RT-PCR .....	52
3.3.2.4.	<i>mcp</i> Primeri ile Yapılan RT-PCR.....	52
3.3.2.5.	<i>f-protein</i> Primeri ile Yapılan RT-PCR.....	53
3.3.2.6.	<i>granülin</i> Primeri ile Yapılan RT-PCR.....	54
3.4.	<i>İn vivo</i> Klonlama Sonuçları .....	54
4.	TARTIŞMA.....	57
5.	SONUÇLAR.....	60
6.	ÖNERİLER .....	61
7.	KAYNAKLAR.....	62

ÖZGEÇMİŞ



Yüksek Lisans

ÖZET

*CYDIA POMONELLA* GRANULÖZİS VİRÜS (CpGV)'ÜN *CYDIA MOLESTA*'DA  
TRANSKRİPSİYONEL ANALİZİ

Dönüş TOY

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilimdalı  
Danışman: Doç. Dr. İsmail DEMİR  
2013, 71 Sayfa

Doğu meyve güvesi *Cydia molesta* (Lepidoptera: Tortricidae), son zamanlarda, Çin, Asya, Avrupa ve Avustralya gibi ülkelerde sert çekirdekli meyvecilik alanlarında önemli bir zararlı haline gelmiştir. Zararlı larvaları, Rosaceae familyası içinde bulunan şeftali, elma, erik gibi meyvelere büyük hasarlar vermektedir. *C. molesta* aynı zamanda *C. pomonella* ile yakından ilişkili bir tür olduğundan, elma bahçelerinde de büyük zararlara neden olmaktadır. *Baculoviridae* üyesi olan *C. pomonella* granülovirüsünün (CpGV) *C. pomonella*'ya karşı yüksek bir spesifitesi olduğu bilinmektedir. CpGV, dünyada *C. pomonella*'ya karşı kullanılan en önemli biyolojik mücadele etmenidir. *C. pomonella* ile *C. molesta* yakından ilişkili türler olmasına rağmen, CpGV'nin ticari izolatu olan CpGV-M'nin *C. molesta* üzerinde enfeksiyon başarısı yüksek değildir. Yakın zamanda izole edilen ve V22 olarak adlandırılan CpGV izolatının *C. molesta* üzerinde etkinliğinin yüksek olduğu gösterilmiştir. CpGV-V22, CpGV genotiplerinin bir karışımıdır. Ticari CpGV-M'nin *C. molesta* üzerindeki enfeksiyon sürecinin daha iyi anlaşılabilmesi için, *C. molesta* ve *C. pomonella* üzerinde karşılaştırmalı transkriptom analizleri yapıldı. CpGV-M'nin seçilmiş genlerinin (*granülin*, *actin*, *ie-1*, *lef-8*, *mcp*, *f-protein*) transkripsiyonu reverse transkripsiyon PCR (RT-PCR) yöntemiyle analiz edildi. CpGV-M ile enfekte *C. molesta* ve *C. pomonella* larvalarından yapılan RT-PCR sonuçlarına göre, CpGV-M *C. pomonella*'da transkript olurken, *C. molesta*'da transkript olmadığı belirlendi. Bu nedenle, farklı bir granulozis virus izolatının (V22), *C. molesta*'daki transkripsiyon analizlerinin yapılabilmesi için bu izolat karışık genotiplerden oluşan granulozis viruslerin stoğundan (CpGV-V22) *in vivo* klonlama yöntemiyle saflaştırıldı.

**Anahtar Kelimeler:** CpGV, *Cydia pomonella*, *Cydia molesta*, Transkriptom

Master Thesis

SUMMARY

TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF *CYDIA POMONELLA* GRANULOVIRUS  
(CpGV) IN *CYDIA MOLESTA*

Dönüş TOY

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Graduate Program  
Supervisor: Doç. Dr. İsmail DEMİR  
2013, 71 Pages

Recently, the oriental fruit moth *Cydia molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) has become a major pest of stone fruit growing areas such as China, Asia, Europe, South and North America, the Middle East, New Zealand and Australia. The fruit moth larvae have caused significant damage different host plants within the family Rosaceae (peach, apple, and plum). *Cydia molesta* is also a closely related species to the codling moth *Cydia pomonella*, a major pest in apple orchards. The *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV), a member of *Baculoviridae*, is known to be highly specific towards *Cydia pomonella* and is worldwide the most important biological agent for controlling codling moth. Though *C. molesta* and *C. pomonella* are closely related, the infection success of *C. molesta* by conventional CpGV, such as CpGV-M ('Mexican isolate', Tanada, 1964), is not high. Recently a new CpGV isolate, called V22 (MadexTwin, Andermatt Biocontrol), had been selected and showed improved efficacy to *C. molesta*. CpGV-V22 is a mixture of two CpGV genotypes. For a better understanding of the infection process of conventional CpGV-M in *C. molesta*, a comparative transcription analysis of this virus in *C. molesta* and *C. pomonella* was performed. The transcription of selected genes (*granulin*, *actin*, *ie-1*, *lef-8*, *mcp*, *F-protein*) of CpGV-M was analyzed by reverse transcription PCR (RT-PCR). The results of RT-PCR from CpGV-M infected *C. pomonella* and *C. molesta* larvae showed that CpGV-M is not transcribed in *C. molesta* but in *C. pomonella*. Therefore an in vivo cloning procedure was implemented in order to isolate a pure genotype of CpGV-V22 in *C. molesta*. Further experiments transcriptonal analyses will follow for the pure isolate CpGV-V22 in order follow the infection process of CpGV-V22 isolate in *C. molesta*.

**Key Words:** CpGV, *Cydia pomonella*, *Cydia molesta*, Transcriptome

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1.	Çin'deki şeftali üretiminin Dünya'daki diğer ülkelere göre durumu .....	5
Şekil 2.	Türkiye'nin yıllara göre şeftali ihracatı .....	6
Şekil 3.	Dünya'da ve Türkiye'de şeftali üretimi.....	6
Şekil 4.	<i>C. molesta</i> 'nın biyolojisi .....	11
Şekil 5.	Doğu meyve güvesinin zararı .....	12
Şekil 6.	NPV'lerde viral yapı ve virion .....	25
Şekil 7.	Enfeksiyondan 4 gün sonrasında <i>Autographa californica</i> NPV'si ile enfekteli hücrelerde görülen polihedraların ışık mikroskobu altındaki görüntüsü.....	28
Şekil 8.	Konukçu böceğin NPV enfeksiyonunun şematik gösterimi.....	29
Şekil 9.	Bakulovirüs'lerin BV ve ODV fenotiplerinin şematik gösterimi.....	30
Şekil 10.	Bakulovirüs enfeksiyon çemberi .....	31
Şekil 11.	CpGV-V22'yi oluşturan iki virüs izolatının şematik gösterimi .....	35
Şekil 12.	<i>Cydia molesta</i> 'nın biyolojik aktivitesinin belirlenmesindeki aşamaların şeması .....	37
Şekil 13.	CpGV-V22'nin genotip izolasyonu için <i>in vivo</i> klonlanma şeması .....	43
Şekil 14.	<i>aktin</i> primeri ile yapılan RT-PCR sonucu .....	51
Şekil 15.	<i>ie-1</i> primeri ile yapılan RT-PCR sonucu .....	51
Şekil 16.	<i>lef-8</i> primeri ile yapılan RT-PCR sonucu .....	52
Şekil 17.	<i>mcp</i> primeri ile yapılan RT-PCR sonucu.....	53
Şekil 18.	<i>f-protein</i> primeri ile yapılan RT-PCR sonucu .....	53
Şekil 19.	<i>granülün</i> primeri ile yapılan RT-PCR sonucu .....	54
Şekil 20.	CpGV-V22 OB'lerinden izole edilen DNA'ların görüntülenmesi.....	55
Şekil 21.	Yeni CpGV-V22 stoğu ve CpGV-M stoğundan izole edilen DNA ile ORF35-M primerleri kullanılarak yapılan gradient PCR sonuçları .....	55
Şekil 22.	<i>İn vivo</i> klonlama ilkte edilen larvalardan izole edilen DNA'ların ORF35 primerleri ile yapılan PCR sonuçları .....	56
Şekil 23.	CpGV-M ile enfekte <i>C. pomonella</i> (Cp) ve <i>C. molesta</i> (Cm) larvalarından izole edilen RNA'lardan yapılan RT-PCR sonuçlarının karşılaştırılması.....	50

## TABLULAR DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1. Dünya’da ve Türkiye’de şeftali üretimi .....	4
Tablo 2. Tespit edilmiş şeftali zararlıları .....	9
Tablo 3. NPV’lerin doğal konukçusu durumunda olan böcek takımları ve familyaları.....	33
Tablo 4. RT-PCR’da kullanılan primerler .....	41
Tablo 5. <i>İn vivo</i> klonlamada kullanılan primerler .....	44
Tablo 6. Petroff-Hauser sayma çemberinde virüs OB’lerinin sayım sonuçları.....	46
Tablo 7. CpGV-M ile enfekte edilen <i>C. molesta</i> larvalarının 7. gündeki biyotest sonuçları .....	47
Tablo 8. CpGV-M ile enfekte edilen <i>C. molesta</i> larvalarının 14. gündeki biyotest sonuçları .....	48
Tablo 9. CpGV-V22 ile enfekte edilen <i>C. molesta</i> larvalarının 7. gündeki biyotest sonuçları .....	49
Tablo 10. CpGV-V22 ile enfekte edilen <i>C. molesta</i> larvalarının 14. gündeki biyotest sonuçları .....	49

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\mu\text{m}$	: Mikrometre
ml	: Mililitre
L1	: 1. evre larva
L2	: 2. evre larva
L3	: 3. evre larva
L4	: 4. evre larva
L5	: 5. evre larva
PCR	: Polimraz Zincir Reaksiyonu
OB	: Oklüzyon Yapı
RNA	: Ribonükleik asit
cDNA	: Komplementer DNA
dNTP	: Deoxynucleotide Triphosphate
TAE	: Tris, asetik asit, EDTA
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	: Sodyum Karbonat
HCl	: Hidroklorik asit
EtOH	: Etanol
$\text{MgCl}_2$	: Magnezyum klorür
$\text{H}_2\text{O}$	: Su

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1.Giriş

Tarımsal üretim son yıllarda dünyanın en önemli sorunlarından biri haline gelmiştir. Son dönemlerde özellikle gelişmekte olan ülkelerde yaşanan gıda kıtlığı sıkıntıları tarımsal üretime önem verilmesi gerektiğini gözler önüne sermiştir. Bu nedenle, tarımsal üretimin arttırılabilmesi için çeşitli stratejiler geliştirilmiş, fakat tarımsal zararlıların sayısının gün geçtikçe artması, bu alanda beklenen başarının elde edilmesini engellemiştir.

Tarım zararlısı böcekler, tarımsal üretimin azalmasına sebep olduğundan, tarıma yapılan yatırımlar da büyük rol oynamaktadır.

Şeftali (*Prunus persica*; Rosales; Rosaceae), değişik iklimsel koşullara uyum gösteren bir yaz meyvesidir. Şeftali bitkisinin anavatanı Çin'dir. Türkiye'de en çok Bursa ve Akdeniz bölgelerinde tarımı yapılır.

Ülkemizin değişik ekolojik özelliklere sahip olması, erken verimliliğin mümkün olması, taze tüketiminin yanı sıra meyve suyu ve konserve olarak işlenebilmesi, çeşitliliğinin fazlalığı ve son yıllarda şeftali meyvesinin iyi pazar fiyatı oluşturması şeftali tarımını önemli bir hale getirmiştir. Bu nedenle şeftali yetiştiriciliğindeki sorunların azaltılması hatta ortadan kaldırılabilmesi önemli bir husustur.

Şeftali bitkisinde üretim kalitesinin düşmesindeki en önemli nedenlerden birisi zararlı böceklerdir. Şeftali bitkisinin üretiminin yapıldığı tüm ülkelerde en önemli şeftali zararlılarından biri Doğu meyve güvesi (*Cydia molesta*; Lepidoptera; Tortricidae)'dir.

Zararlı böceklerle mücadelede çeşitli yöntemler kullanılmakla birlikte en yaygın yöntem kimyasal insektisitlerin kullanılmasıdır. Birçok kimyasal, hem insan sağlığına zarar vermesi hem de doğal yapıyı bozmasından dolayı yasaklanmıştır. Bu nedenle, çoğu zararlıyla mücadele de olduğu gibi Doğu meyve güvesi ile de mücadelede de alternatif yollar araştırılmaktadır. Biyolojik mücadele, insan sağlığına olan zararlı etkileri azaltarak ve doğanın yapısını bozmayan popüler bir yöntem haline gelmiştir.

Biyolojik mücadele, özellikle tarım zararlılarıyla mücadelede, bu zararlılar üzerinde etkili başka canlılardan yararlanılarak yapılan bir mücadele yöntemidir (URL-1, 2013). Mikroorganizmaların kullanıldığı mikrobiyal mücadelede ise; virüsler, bakteriler, funguslar, nematodlar, protozoonlar ve rekombinant tekniklerle geliştirilen etmenlerden yararlanılır (Demirbağ vd., 2008). Biyolojik mücadelede mikrobiyal etmenlerin kullanımı

1800'lü yıllarda fungusların kullanımıyla başlamıştır (Oğurlu, 2000). Bu mikrobiyal etmenler zararlı böceklerde hastalık oluşturarak zararlı sayılarının zarar eşiğinin altına inmesini sağlamaktadır.

Bu mikrobiyal etmenlerin çoğunluğu sadece konağa özgüdür. Bu sayede ortamda bulunan yararlı böcekler bunlardan etkilenmemekte, sadece mücadele edilmek istenilen organizmalar etkilenmektedir. Bu etmenler ekosistemde herhangi bir kirliliğe de yol açmamaktadır. Bu sahadaki başarı ile gelecekte kimyasal insektisitlerin yerini bu mikrobiyal mücadele yöntemlerinin alacağı düşünülmektedir.

Dünya'da Doğu meyve güvesi ile mücadelede kimyasallar, feromon tuzakları ve mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Fakat bu zararlıyla mücadelede istenilen sonuç henüz elde edilmemiştir.

Doğu meyve güvesine karşı uygulanacak biyolojik mücadele etmeninin nasıl uygulanacağını ve hangi dozda uygulanması gerektiğini belirlemek için öncelikle zararlının biyolojisini iyi bilmek ve bu zararlıya karşı hangi mikrobiyal etmenin kullanılabileceğine karar verilmelidir. Bu nedenle zararlı böcekte muhtemel hastalık oluşturabilecek patojenlerin araştırılması gerekmektedir.

## 1.2. Şeftali Bitkisi ve İnsan Hayatındaki Yeri

Şeftali (*Prunus persica*), gülgiller (Rosaceae) familyasından değişik iklim koşullarına uyum sağlayabilmektedir. Dünya'ya Çin ve Doğu Asya'dan yayılan şeftali, sert çekirdekli meyveler içerisinde dünyada en çok yetiştirilen meyve türlerindedir (Küden ve Küden, 2000).

Dünya'da çok geniş yetiştirme alanına sahip olan şeftali bitkisi, Avrupa'nın kuzey memleketleri dışında (Finlandiya, Norveç, İsveç) hemen hemen her yerinde yetiştirilmektedir. On altıncı yüz yılda Amerika kıtasına götürülen şeftali hem Kuzey Amerika hem de Güney Amerika'da yetiştirilmektedir. Amerika, Asya ve Avrupa'nın dışında Okyanusya ve Afrika'da da şeftali yetiştirilebilmektedir. Okyanusya'da en çok yetiştirilen meyve türleri arasında göstermektedir. Şeftali yetiştiriciliği Afrika'da da her geçen gün artmaktadır (Köseoğlu, 2006).

Şeftali bitkisinin çeşitli iklim koşullarına uyum sağlaması, ağacın erken çiçek açması ve tarımsal sanayide hammadde teşkil etmesi şeftali yetiştiriciliğini hızlandırmıştır. Dünya üzerinde ekvatorun kuzey ve güneyinde 25-45 enlemleri arasında yetiştirilebilmektedir.

Türkiye’de ise şeftali yetiştiriciliği için uygun bölgeler Akdeniz, Marmara ve Doğu Anadolu’nun bazı yerleridir (Köseoğlu, 2006).

Dünya üzerinde en fazla şeftali üreten ülkeler sıralaması 2009 verilerine göre Çin, İtalya, İspanya, ABD, Yunanistan, İran ve 547.215 ton ile yedinci sırada yer alan Türkiye şeklindedir (Gür, 2011).

Şeftali bitkisi, çeşitli iklimsel koşullara uyum sağlayabilmesine rağmen, verimli ürün elde edebilmek için temel bazı iklimsel koşulların uygunluğu da gerekmektedir. Verimli ürün elde etmeyi sınırlayan faktörler; düşük kış sıcaklığı, çeşitlerin kış soğuk ihtiyacı ve ilkbahar genç donlarıdır (Köseoğlu, 2006).

Şeftali bitkisinin boyu genellikle 2 ve 2.5 metre olup, gövdesi kızılımsı gri renkte olan ağaçları teşkil eder. Şeftali ağaçlarının yapraklarının uzunluğu genişliğinden fazladır ve üst yüzü parlak yeşil, alt yüzü ise grimsidir. Şeftali ağacının meyvesi sert çekirdeklidir, değişik şekil ve irilikte olabilir (URL-2, 2013).

Şeftali meyvesi taze tüketiminin yanı sıra, meyve suyu konsantresi ve pulp olarak tüketildiği gibi kurutulularak ve derin dondurma yöntemleriyle uzun süre saklanabilmekte, reçel, marmelat vb. ürün haline getirilerek bu yöndeki sanayiye ham madde sağlamakta ve yılın her mevsiminde tüketilmektedir (Eraltan, 2005; Anonim, 2009). Bu meyvenin çekirdeği de yakıt olarak kullanılabilir. Ayrıca bazı fiziksel işlemlerden sonra şeftalinin çekirdeğinin içerisindeki tanecik hayvan yemi olarakta kullanılabilir. Şeftali çekirdeğinin kabuğu yakacak olarak kül oranı az ve kükürt oranı düşük temiz bir enerji kaynağıdır. Seralarda, kalorifer sistemlerinde ve fırınlarda kullanılacak enerji kaynağıdır. Yenilenebilir enerji kaynağı olduğundan küresel ısınma, kirlilik, doğal kaynakların azalması gibi sebeplerden dolayı tavsiye edilen bir yakıttır (URL-3, 2013).

### **1.3. Şeftali Bitkisinin Dünya ve Türkiye Ekonomisindeki Yeri**

Şeftali, dünya üzerinde yetiştirilen meyveler arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Tüketiminin artmasından dolayı şeftali üretiminde de giderek artış meydana gelmektedir.

2003 Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre 43 milyon ton yaş meyve sebze üretimi ile dünyanın önemli üreticilerinden biri olan Türkiye’de, şeftali üretimi aynı yıl içerisinde yaklaşık 460.000 ton olup sert çekirdekliler grubunda yer alır. Şeftali gibi erik, iğde, kayısı, kiraz, zerdali, vişne ve zeytin gibi meyvelerde sert çekirdekliler alt grubunda sıralanmaktadır. Bu grupta üretim itibarıyla şeftali zeytinden sonra ikinci sırada



gelmektedir (TUIK, 2004) (Tablo 1).

ABD, Çin Halk Cumhuriyeti ve Akdeniz ülkeleri 2005 yılı şeftali üretiminde ön sıralarda gelmektedir. Türkiye de şeftali üretiminde ilk on ülke arasında yer almaktadır (Köseoğlu, 2006) (Tablo 1).

Dünya şeftali üretimi 2009 yılında 18.500.000 tona ulaşmış olup, Dünya üretimin yarısından fazlasını Asya kıtası sağlamaktadır. Türkiye 547.000 tonluk üretimi ile dünya ülkeleri arasında altıncı sırada yer almaktadır (FAO, 2009) (Tablo 1).

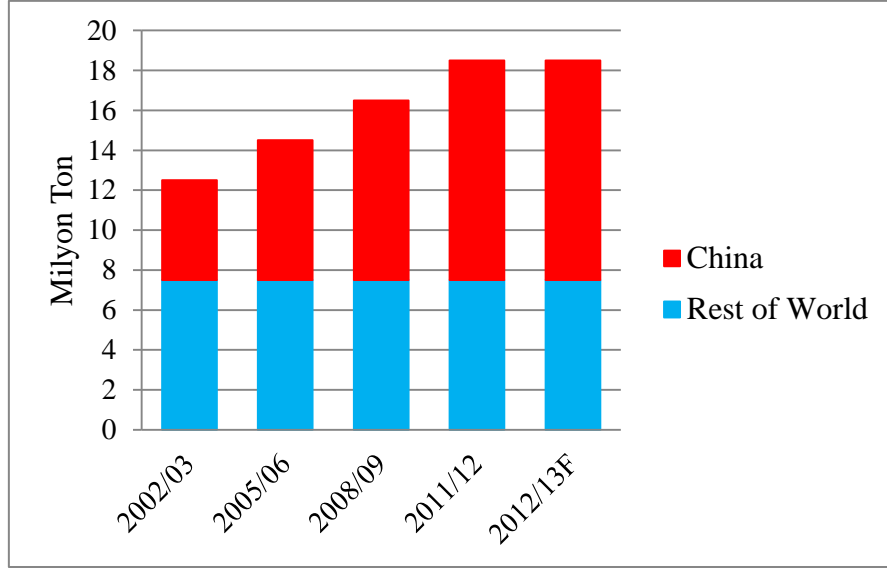
Türkiye’de Marmara, Ege, Akdeniz sahil bölgeleri ve Karadeniz bölgesinin bazı bölgeleri şeftali yetiştiriciliği için uygundur. Türkiye İstatistik Kurumu (TUIK) verilerine göre 2009 yılı Bursa, Mersin, İzmir, Çanakkale ve Aydın en fazla şeftali üreten illerdir.

Tablo 1. Dünya’da ve Türkiye’de şeftali üretimi (TUIK ve FAO, 2009) (URL-4)

Dünya’da şeftali üretimi (ton) (FAO, 2009)		Türkiye’de şeftali üretimi (ton) (TUIK, 2009)	
Dünya	18.500.000	Bursa	140.000
Asya kıtası	10.000.000	Mersin	69.000
Çin	8.000.000	İzmir	53.000
İtalya	1.726.000	Çanakkale	42.000
İspanya	1.225.000	Aydın	22.000
ABD	1.197.000		
Türkiye	547.000		

Dünya genelinde şeftali üretiminin son on yıl içinde artış gösterdiği belirlenmiştir. Geçen yıl (2012/13) önceki yıllara göre %3’lük bir artış belirlenmiş ve bu seneki şeftali miktarı 19,4 milyon (metrik) olarak kayıt altına alınmıştır. Önceki yıllarda olduğu gibi 2012/13 raporlarında da 12 milyon ton ile Çin şeftali üretiminin başında gelmektedir.

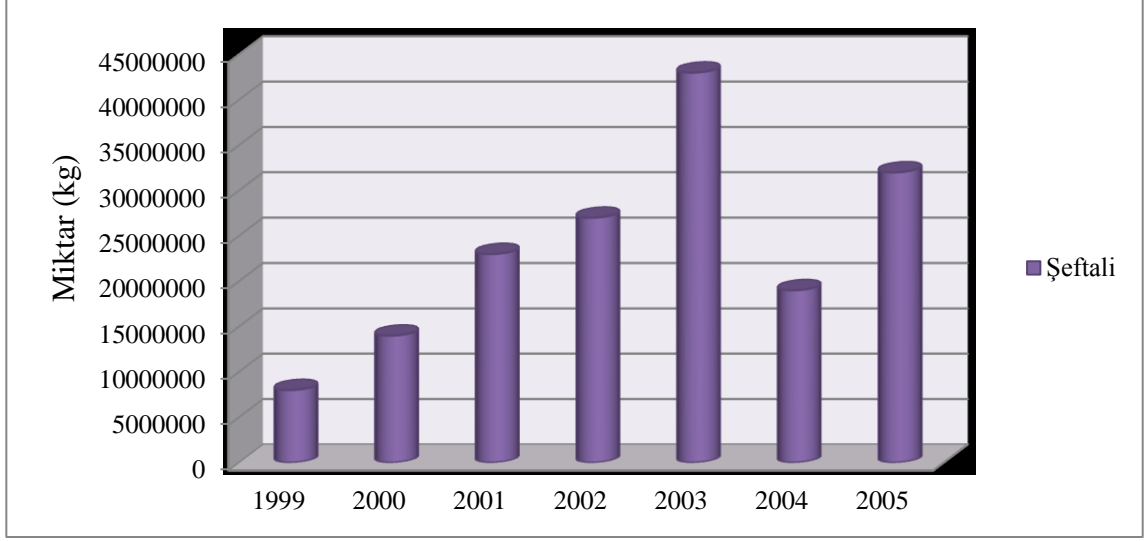
Türkiye’de 2012/13 raporlarında şeftali üretimi 550.000 tondan biraz daha yüksek olarak kaydedilmiştir. Ukrayna ve Rusya’nın artan talebi ile şeftali ihracatının %35’lik artışla 45.000 tona ulaştığı tahmin edilmektedir (USDA, 2012) (Şekil 1).



Şekil 1. Çin'deki şeftali üretiminin dünyadaki diğer ülkelere göre durumu.

### 1.3.1. Türkiye'de Şeftali İhracatı

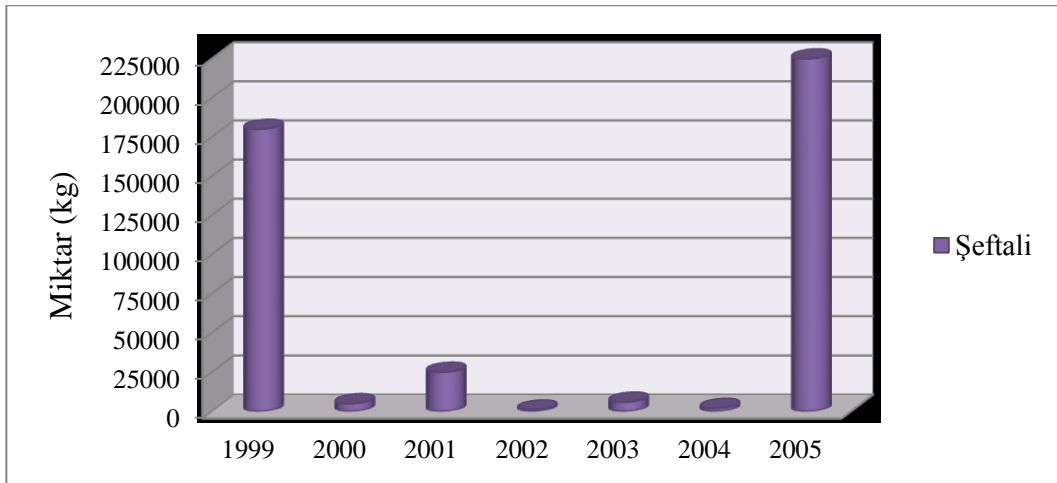
Şeftali üreten ülkeler arasında yaptığı ihracatla önemli yere sahip olan Türkiye'de şeftali ihracatı her geçen yıl artmaktadır. 1999'da 10.000 ton civarında olan şeftali ihracatımız 2005'de 40.000 ton seviyesine çıkmıştır. Avrupa Birliği (AB) ve Kuzey ülkeleri ihracatta önemli ortaklarımızdır (Köseoğlu, 2006) (Şekil 2).



Şekil 2. Türkiye'nin yıllara göre şeftali ihracatı.

### 1.3.2. Türkiye'de Şeftali İthalatı

Dünya taze şeftali ithalatının %62.10'u AB ülkeleri tarafından yapılmaktadır. Türkiye'de de toplam meyve üretiminin %11.00'ini sert çekirdekli meyveler oluşturmaktadır (Burak vd., 2002). Türkiye üretim kapasitesinin çok yüksek olmaması ve iç pazarda yeterli olmaması nedeniyle şeftalide ithalatçı bir ülke değildir. Türkiye iç pazarı yeterli olmadığından diğer ülkelerden şeftali ithalatı yapmaktadır. Bu ülkeler arasında Rusya, Mısır, Suudi Arabistan, Güney Afrika Cumhuriyeti başta gelen ülkelerdir (Köseoğlu, 2006) (Şekil 3).



Şekil 3. Dünya'da ve Türkiye'de şeftali üretimi.

#### 1.4. Türkiye’de Şeftali Tarımının Genel Sorunları

Türkiye’de topraktan faydalanma oranı daha çok iklim ve yer şekli özelliklerine bağlıdır. Şeftali yetiştiriciliği ülkemizde birkaç ilin dışında bütün illerde yapılabilmektedir. Marmara Bölgesi %42’lik oranla şeftali yetiştiriciliğinin en çok yapıldığı bölgedir. Bunu Ege (%20), Akdeniz (%19) ve Karadeniz (%11) Bölgeleri izlemektedir (DİE, 2003). Ülkemizde diğer bitkilerde olduğu gibi şeftali tarımında da bazı sorunlar meydana gelmektedir.

Şeftali ılıman bir iklim meyvesi olup kış mevsiminde dinlenmeye girer. Şiddetli kış soğukları, düşük yaz sıcaklığı ve ilkbahar donları şeftalinin ekonomik olarak yetişmesini engeller. Bu iklim sorunlarından en önemlisi ilkbaharın geç donlarıdır. Çünkü ilkbaharda çiçeklerin açılması ile hassasiyet artarak don olayı olması meyve oluşumunu engeller. Aynı zamanda çiçeklenme döneminde sıcaklığın düşüşü ve aşırı yağmurlar ile tozlayıcı böceklerin faaliyetlerini yerine getirmemesine neden olur ve çiçeklenme dönemi uzar. Bu da meyve tutunmasını zorlaştırır. Dünyada küresel ısınma nedeniyle meydana gelen iklim değişikliklerindeki olumsuzluklar yukarıda sayılan sorunlardan dolayı şeftali üretiminde ürün kaybına neden olmaktadır (Gür, 2012).

Diğer bir problem ise arazinin toprak yapısıdır. Kireçli, ağır, killi ve çok nemli topraklarda ekonomik verimliliği yüksek şeftali üretimi yapılamamaktadır. Aynı zamanda ülkemizde son yıllarda meydana gelen kuraklığın etkisiyle de su kaynaklarında azalmalar yaşanmakta, bu da toprağın verimliliğini etkilemektedir.

Yukarıda bahsedilen iklimsel ve doğal çevre koşullarında kaynaklanan sorunların yanı sıra şeftali yetiştiriciliğinde yabancı otlar, hastalıklar ve zararlılarda önemli sorunlar teşkil etmektedir.

##### 1.4.1.Yabancı Otlar

Şeftali bahçelerinde, pek çok sayıda tek ve çok yıllık, dar ve geniş yapraklı otlar sorun meydana getirmektedir. Yabancı otlar sulama ve gübreleme ile hızla çoğalarak şeftali bahçelerinde ağaçların suyuna ve besin maddelerine ortak olarak verimin düşmesine neden olurlar. Yabancı otlar hastalık ve zararlılara konukçuluk yaparak hasadı güçleştirirler. Şeftali bahçelerinde en yaygın görülen yabancı otlar; kaynaş (*Sorghum halepense* (L.) Pers. Poaceae), köpek dişi ayrığı (*Cynodon dactylon* (L.) Pers. Poaceae),

darı yapışkan ot türleri (*Setaria* spp. Poaceae), darıcan (*Echinochola* spp. Poaceae), topalak (*Cyperus rotundus* (L.) Cyperaceae), tarla sarmaşığı (*Convolvulus arvensis* (L.) Convolvulaceae)'dır (Hantaş, 2011).

#### 1.4.2. Hastalıklar

Türkiye'de çeşitli hastalıklardan dolayı şeftali üretiminde %25-30 oranında verim kaybı olmaktadır. Bu hastalıklar yapraklar üzerinde deliklere, meyve ve sürgünler üzerinde irili ufaklı leke oluşumuna, kök ve dallarda urların oluşumuna, meyve yapraklarında şekil bozukluklarına ve çiçek sürgünleri ile dallarının kurummasına neden olurlar. En önemli şeftali hastalıkları olarak yaprak delen, yaprak kıvrırcığı, mumya hastalığı ve şeftali küllenmesi, kök kanseri, kök çürüklüğü, sarılık (kloroz), şeftali kara lekesi verilebilir (URL-5, 2013).

#### 1.4.3. Zararlılar

Zararlı böcekler birçok bitki türü üzerinde, orman ve tarlalarda, insan yaşam alanlarında büyük zararlara neden olmaktadır (Lacey vd., 2001). Şeftali yetiştiriciliğinde de bazı zararlı böcekler ürün kaybına neden olmaktadır. Önceki yıllarda şeftali alanlarında bulunan zararlı türler ile doğal düşmanların belirlenmesine yönelik ülkemizde ve yurt dışında bazı çalışılmalar yürütülmüştür. Doğu meyve güvesi (*Cydia molesta* Busck) ve Şeftali güvesinin (*Anarsia lineatella* Zell) ana zararlı konumunda olduğu, Dut kabuklu biti (*Pseudaulacaspis pentagona* Targ-Tozz), Meyve ağacı dip kurtları, yaprakbitleri ve thrips türlerinin önemli ve yaygın oldukları, yine bu alanlarda Aeolothripidae, Coccinellidae, Chrysopidae, Syrphidae, Cybocephalidae, Aphelinidae gibi familyalara bağlı predatör ve parazitoid türlerin yoğun buldukları bu çalışmalarla ortaya konulmuştur (Kılıç ve Aykaç, 1989; Günaydın ve Efe, 1997; Ergüden vd., 1999; Cravedi, 2000; Canlıhoş ve Öztürk 2003; Hazır ve Ulusoy 2008). Şeftali bitkisinde verimli ürünün yetiştirilmesini engelleyen bazı zararlılar tespit edilmiştir (Tablo 2) (Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, 2011).

Tablo 2. Tespit edilmiş şeftali zararlıları

Şeftali zararlılarının,		
	Türkçe adı	Bilimsel adı
1	Doğu meyve güvesi	<i>Cydia molesta</i>
2	Şeftali güvesi	<i>Anarsia lineatella</i>
3	Dut kabuklu biti	<i>Pseudomonas pentagona</i>
4	Meyve yazıcı böceği	<i>Scolytus scolytus</i>
5	Meyve ağacı dipkurtları	<i>Capnodis spp.</i>
6	Akdeniz meyve sineği	<i>Ceratus capitata</i>
7	Şeftali virgül kabuklu biti	<i>Nilotapsis halli</i>
8	Yaprak yeşil tırtılı	<i>Hedya nubiferana</i>
9	Kırmızı tomurcuk tırtılı	<i>Spilonota ocellana</i>
10	Küçük tomurcuk güvesi	<i>Recurvaria nanella</i>
11	Yüzük kelebeği	<i>Malacosoma neustria</i>
12	Bakla zınnı	<i>Epicometris (Tropinota) hirta</i>
13	San Jose kabuklubiti	<i>Quadraspidiotus perniciosus</i>
14	Erik koşnili	<i>Sphaerolecanium prunastri</i>
15	Şeftalide çiçek tripsi	<i>Frankliniella occidentalis</i>
16	Elma göz kurdu	<i>Anthonomus pomorum L.</i>
17	Badem göz kurdu	<i>Anthonomus amygdali hust.</i>

Dünyada 50 kadar şeftali zararlısı bulunurken (Hill, 1987), Türkiye’de bu sayı 25’i geçmemektedir (Anonim, 2008). Lepidopter böcek türü olan doğu meyve güvesi (*Cydia molesta* Busck) son yıllarda şeftali yetiştiriciliğine ekonomik boyutlarda zarar vermektedir. Şeftali bahçelerinin ana zararlıları Doğu meyve güvesi (*Cydia molesta* Busck) ve şeftali güvesi (*Anarsia lineatella* Zeller), ana hastalığı ise şeftali yaprak kıvrıcıklığı (*Taphrina deformans* Berk Tull.)’dır. Doğu meyve güvesi ve şeftali güvesi hem şeftali ağacının sürgünlerine hemde meyvelerine zarar verir (Hantaş vd., 2011).

## **1.5. Doğu Meyve Güvesi (*Cydia molesta* Lef., Lepidoptera: Tortricidae)**

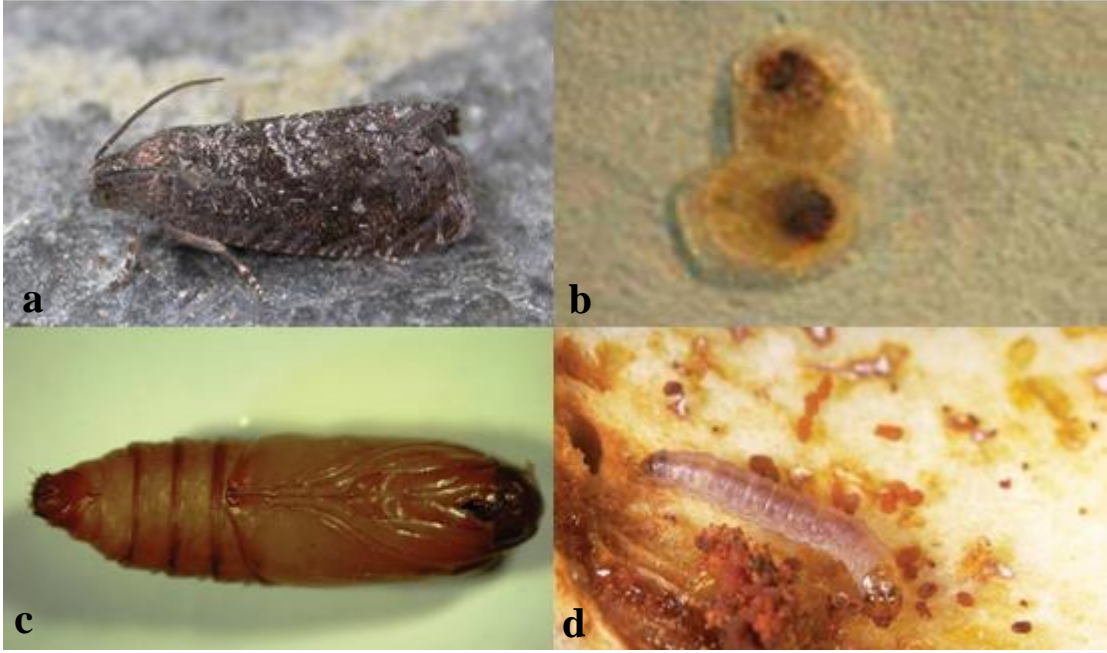
### **1.5.1. Tanımı ve Yaşayışı**

#### **1.5.1.1. Ergin**

Doğu meyve güvesinin ergini 5 mm uzunluğunda olup, ön kanatlar kahverengimsi siyah arka kanatlar gri pullarla kaplı bir görünüme sahiptir (Beers vd., 1993). Doğu meyve güvesi kelebeğinin kanat açıklığı 11-13 mm'dir. Kelebek dinlenme halinde iken, ön kanatların ortasındaki gri pullar ters V şeklinde görülür. Erginlerin yaşam süresi 12 ile 15 gün arasında değışir. Her iki cinsiyetin de ana konağı bulabilmek için konak bitkiden salınan bitki uçucu maddelerini kullanırlar (Natale vd., 2004). Eş bulma feromon aracılığıyla meydana gelir ancak bu süreç ışık ve sıcaklık tarafından düzenlenmektedir. Ortaya çıkışın ikinci gününde seksüel aktivite meydana gelir. Çiftleşme dışının başlama çağrısını vermek için ağacın üst gölgelik bölgesine hareketiyle başlar. Daha sonra dışının arka karın segmentleri arasındaki intersegmental bölgedeki glandüler dokudan serbest seks feromonu oluşur ve erkek bu feromona doğru yönlendirilir. Bu sayede birbirlerini bularak çiftleşme olayı meydana gelir (Rothschild ve Vickers, 1991) (Şekil 4a).

#### **1.5.1.2. Yumurta**

Doğu meyve güvesinin yumurtaları (çapı 0.8mm) beyaz renkli yassı bombeli bir şekle sahiptir. Yumurtalar açılmadan önce kehribar rengine dönerler. Dişi kelekler genellikle yumurtalarını yaprak ve genç dalların düzgün yüzeylerine bırakırlar. Tek biri dişi ortalama 200 yumurta bırakabilmektedir. Yumurta inkübasyonu genellikle dört ile sekiz gün arasında değışir (Reis Fo vd., 1988; Rothschild ve Vickers, 1991; Beers vd., 1993) (Şekil 4b).



Şekil 4. *C. molesta*'nın biyolojisi a) Ergin, b) Yumurta, c) Larva, d) Pupa (Hantaş, 2011)

#### 1.5.1.3. Larva

Yeni yumurtadan çıkan larvaların çapı 0.5 mm ve uzunluğu 2 mm dir. Bu larvalar krem renkli bir gövdeye ve siyah bir başa sahiptirler. Doğu meyve güvesi larvası genellikle dört larva evresi geçirir fakat belirli koşullar altında beşinci evrede mümkündür. Olgun larvanın vücudu pembe-beyaz renge ve kafası kahverengiye döner. Yaklaşık olarak boyu 8 mm ile 13 mm arasında değişmektedir. Larva gelişimi genellikle iki ile üç hafta arasında sürer (Rothschild ve Vickers 1991; Beers vd., 1993) (Şekil 4c).

#### 1.5.1.4. Pupa

Pupa dönemi öncesinde, olgun larva konağın sürgünlerinde ya da meyvelerinde yaşar ve kendisine pupa oluşturabilecek uygun bir alan arar. Bu alan genellikle ağaç kabuğunun altında zemin döküntülerinin olduğu yerlerdir (Beers vd., 1993). Pupa dönemi yaklaşık 10 ile 16 gün arasında değişmektedir (Şekil 4d).



### 1.5.2. Zarar Şekli

Doğu meyve güvesi yıl boyunca gıda tercihini değiştiren bir zararlı türüdür. İlk nesil larvalar öncelikle konak bitkinin genç sürgün uçlarına giderler fakat aynı zamanda gelişmekte olan genç meyvelerden de beslenmektedirler (Şekil 5). İlk nesilden sonraki nesiller bitkinin çeşitli yerlerinde aynı orandadır. Doğu meyve güvesi genç meyvelere zarar verirken daha çok meyvenin yüzeyine yakın yerlere kümelenirler. Fakat meyve olgunlaştıkça larvalar meyvenin çekirdeğine yakın yerlerde kümelenirler. Meyvelerde larvanın varlığı sapa yakın olan kahverengi frassler olarak adlandırılan küçük giriş delikleriyle belirlenir (Reis Fo vd., 1988; Rothschild ve Vickers, 1991; Beers vd., 1993).



Şekil 5. Doğu meyve güvesinin zararı a) Sürgündeki zararı, b) Meyvedeki zararı, c) Sürgün ve meyvedeki *C. molesta* zararı

## 1.6. Zararlılar ile Mücadele Yöntemleri

Bitki koruma alanında kullanılan yöntemler insan ve çevre sağlığı açısından özel bir öneme sahiptir. Bitki hastalık ve zararlılarıyla zamanında ve doğru mücadele yapılmadığında, ürün kaybının %30-35 civarında olduğu kabul edilmektedir. Bu kaybı önlemek için günümüzde çeşitli mücadele yöntemleri ve preparatları kullanılmasına rağmen daha etkili, çevreye zararı olmayan veya daha az zararlı olan ve daha ekonomik mücadele yöntemleri araştırılmaya devam etmektedir. Çoğu zaman bir ekosistemdeki zararlıları tamamen yok etmek yerine ekonomik zarar eşiğinin altında tutma prensibine dayanan ve birden fazla mücadele yönteminin bir arada kullanıldığı entegre mücadele zararlılara karşı başarıyla kullanılabilir şekilde geliştirilmiştir.

Zararlı böceklerle mücadele, kitle üremesi yapan veya yapma yeteneğinde olan böcek popülasyonlarının sayısının artmasını engellemek için gerçekleştirilen mücadele olarak bilinir. Tarım ve ormancılıkta zararlı böceklerle mücadelede uygulanan 7 yöntem vardır. Bunlar insanın herhangi bir yardımı olmadan doğal kuvvetlerle böcek popülasyonlarının kontrol altında tutulması şeklinde olan doğal mücadele, karantina, ambargo, muayene ve sertifika uygulamak şeklinde olan yasal mücadele, böcekleri feromonlar, odun tuzakları, yem tuzakları ve ışık tuzakları gibi yöntemlerle toplamak şeklinde olan mekanik mücadele, sıcak ve nemden yararlanarak böceklerin öldürülmesi, elektrik ve radyoaktivite kullanarak böceklerin kısırlaştırılması şeklinde olan fiziksel mücadele, toprağın bakımı, işlenmesi ve gübrelenmesi, yabancı ot ve atıkların temizlenmesi ve bitki nöbetleşmesi şeklinde gerçekleştirilen kültürel mücadele, kimyasal pestisitler kullanılarak gerçekleştirilen kimyasal mücadele ve böceklerin neden olduğu zararları en aza indirmek amacıyla bu böceklerin parazit, predatör ve patojen mikroorganizmalarını onlara karşı kullanmak şeklinde gerçekleştirilen biyolojik mücadeledir.

### 1.6.1. Kimyasal Mücadele ve Çevreye ve İnsanlara Olan Etkileri

Tarım ürünlerinin yetiştirilmesinde ve depolanmasında böceklerin neden olduğu zararlar üreticiler ve ülke ekonomisi için önemli kayıplara neden olmaktadır. Bu sorunu çözmeye kullanılan kimyasal insektisitler zararlı popülasyonlarının %95'ini yok edebilmektedir (Vural, 1996).

Özellikle 1945 yılında DDT'nin bulunmasıyla sentetik kimyasal insektisitlere ilgi artmıştır. Fakat, kimyasal insektisitlerin kullanımı beraberinde birçok problemi de getirmiştir. İsektisitlerin bilinçsiz ve aşırı kullanımı yeraltı sularının kirlenmesine, flora ve faunada hedef dışı organizmaların yok olmasına ve besin zincirinin olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır. Bu sebeplerden dolayı, daha önce problem olmayan bazı zararlılar ortaya çıkmakta, bu durumda sekonder zararlılara karşı ilaçlama yapma zorunluluğu meydana gelmektedir. Örneğin, Çukurova'da beyazsineğin, doğal düşmanlarının insektisitlerden zarar görmesi nedeniyle sorun haline geldiği bilinmektedir (Ünal, 1998). Ayrıca, herhangi bir yolla sulara karışan kimyasal maddeler balıklar tarafından alındığında, balıkların büyüme, üreme, kaçma ve saklanma gibi bazı yetenekleri, insektisitlerin bünyelerinde birikimlerine göre azalmakta veya tamamen yok olmaktadır. Rakipler karşısında daha kolay avlanmaları sonucu bazı türlerin bütünüyle ortadan kalkması söz konusu olabilmektedir (Ünal, 1998).

İsektisitlerin 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 oluşturmaktadırlar. Örneğin, ABD'nin Kaliforniya eyaletinde yoğun insektisit kullanımı sonucunda mevcut arı popülasyonları azalmış ve bunun etkisi olarak tarımsal ürünlerde yeterli tozlaşma olmamıştır. Benzer durumlar Isparta'nın Kovada Vadisi'ndeki meyve bahçelerinde ve 1988 yılında Trakya'da yürütülen süne mücadelesi sırasında da tespit edilmiştir (Ünal, 1998).

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).

Kimyasalların yoğun bir şekilde kullanılması zaman içinde zararlı böceklerde insektisitlere karşı dayanıklılık mekanizmasının gelişmesine neden olmaktadır. İsektisitlere dayanıklılık sonucu, doz artımına gidilmekte ve uygulamalar arasındaki süre kısaltılmaktadır. Bu çabalar da sonuçsuz kaldığında daha etkili ve zehirli bir insektisit

kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun maddi bedeli ölçülemeyecek kadar çok olmaktadır. Böcek direnci ilk olarak 1946'da karasineklerde (*Musca domestica*), DDT direnci ile gündeme gelmiştir ve o zamandan beri zararlı böceklerin kontrolünde büyük sorunlar görülmektedir.

Böceklerle karşı kullanılan insektisitlerin hemen hemen hepsi nörotoksiktir. Yani vücuda bir şekilde girdiklerinde mutlaka sinir sistemi üzerine etki ederek canlının ölmesine neden olmaktadır (Öztürk, 2001). Örneğin, Güneydoğu Anadolu bölgesinde heksaklorobenzenli (HCB) insektisitle ilaçlanmış tohumluk buğdayı yiyen 3000 kişide Porfiriya (Karayara) hastalığının görülmesi ve %11 oranında ölüm meydana gelmesi, dünya çapında ilgi uyandıran bir zehirlenme olayıdır (Ünal, 1998).

Zararlı böceklerle mücadelede kullanılan insektisitlerin bilinen yan etkilerinden dolayı, kimyasal mücadelenin günümüzde mümkün olduğunca kısıtlanması ve bunun yerini daha güvenli olan biyolojik mücadelenin alması gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca, Tarım Bakanlığı'nın 2006 yılında tarımsal ürünlerde uçakla ilaçlamayı yasaklanması nedeniyle kimyasal mücadeleye alternatif yöntemlerin kullanılması zorunlu hale gelmiştir. Bunların başında da biyolojik mücadele gelmektedir (Öztemiz vd., 2008).

### **1.6.2. Biyolojik Mücadele**

“Biyolojik mücadele” sözcüğü ilk defa 1919 yılında Kalifornia Üniversitesi'nden Harry Smith tarafından böcek popülasyonlarının doğal yollarla veya çeşitli uygulamalarla kontrol altına alınması için kullanılmıştır.

Biyolojik mücadele çalışmaları temelde üç ana başlıkta toplanmaktadır bunlar;

1. Klasik biyolojik mücadele: Ortama, zararlı böceklerin doğal düşmanları uygulanarak, böceklerin zarar oluşturma potansiyelleri ortadan kaldırılır.
2. Çoğaltma (Augmentasyon): Ortama var olan zararlı böceklerin doğal düşman popülasyonlarının artırılmasıyla zararlılarla mücadele edilir.
3. Koruma (Konzervasyon): Doğada mevcut faydalı organizmanın zarar görmeyecek şekilde korunması ile doğal düşmanların etkili bir şekilde uzun süreli ortamda kalmaları ve zararlı böcek sayılarını zarar eşliğinin altında tutmaları sağlanır (Demirbağ vd., 2008).

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 mücadelenin ilk uygulama dönemleri çok eski tarihlere dayanmaktadır. Asya'da avcı karıncalardan bu hususta yararlandığı ve bu karıncaların M.S. 900-1200 yılları arasında narenciye zararlılarına karşı kullanıldığı bilinmektedir. Daha sonra 1200'lü yıllarda Yemen'de palmiye 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).

Biyolojik mücadele uygulamalarında zararlı böceklerle karşı parazitoid, predatör ve patojenlerden yararlanılmaktadır. Biyolojik mücadele kapsamında kullanılan patojen mikroorganizmalar ise bakteriler, funguslar, virüsler, protozoonlar ve nematodlardır. Bu mikroorganizmalar kullanılarak yapılan mücadeleye ise 'Mikrobiyal Mücadele' denilmektedir.

Mikrobiyal mücadelede kullanılan entomopatojenlerin büyük bir çoğunluğu konağa spesifik olduğu için sadece mücadelesi yapılmak istenilen organizma üzerinde etkili olur. Bu özelliği ile 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.

### **1.6.3. Mikrobiyal Mücadelede Kullanılan Etkin Gruplar**

#### **1.6.3.1. Bakteriler**

Özellikle son 50 yılda yapılan çalışmalarda, birçok entomopatojenik bakteri böceklerden izole edilmiş ve bazılarının izole edildikleri böcekler üzerinde hastalık etmeni olduğu belirlenmiştir. Böceklerde patojen olan bu bakterileri spor oluşturanlar ve spor oluşturmayanlar olmak üzere iki kısma ayırmak mümkündür. Spor oluşturmayan böcek patojeni bakteriler, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonaceae* ve *Micrococcaceae* familyalarına dahildir. Böceklerde önemli zararlar oluşturan bakteriler daha çok spor oluşturan bakterilerdir. Bunlar arasında toprak grubu bakterilerden olan *Bacillus* türleri öne çıkmaktadır. Bu bakterilerden en önemlisi ise *Bacillus thuringiensis* (Bt)'tir.

*B. thuringiensis* ilk kez Japon bakteriyolog S. Ishiwata (1901) tarafından hastalıklı ipek böceği larvalarından izole edilmiştir. E. Berliner (1911) tarafından tanımlaması

yapılmıştır. Aoki ve Chigasaki (1916) tarafından spor kültürlerindeki proteinin toksik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Beegle ve Yamamoto, 1992). Hannay (1953) *B. thuringiensis*'in spor morfolojisini ve parasporal yapı olarak adlandırılan inklüzyon yapılarını açıklamıştır. Ayrıca parasporal yapının böcek toksitesi ile ilgili olduğunu göstermiştir.

*B. thuringiensis*'te bulunan kristal (*cry*) genleri insektisidal kristal proteinleri (ICP) kodlar. Bu kristal (*cry*) genleri Lepidoptera (*cry1*), Diptera ve Lepidoptera (*cry2*), Coleoptera (*cry3*), Diptera (*cry4*) ve Coleoptera ve Lepidoptera (*cry5*) grubundaki böceklere karşı etkilidir (Demirbağ vd., 2008).

### 1.6.3.2. Funguslar

Fungusların biyolojik mücadelede kullanılmaları 1726 yılında Fransa'da Noctuidae larvalarından *Cordyceps* cinsi fungusların izole edilmesiyle başlamıştır (Oğurlu, 2000). Daha sonra 1879 yılında Rusya'da yeşil buğday böceği, *Anisoplia austriaca* Herbst. (Coleoptera: Scarabaeidae)'ya karşı *Metarhizium anisopliae* Metch fungusunun denemeleri yapılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Steinhaus, 1949). Şimdiye kadar tanımlanan 700'ün üzerinde entomopatojenik fungus bilinmekte ve bunlardan bazıları biyolojik mücadele etmeni olarak üretilmekte ve kullanılmaktadır (Strasser vd., 2000). Entomopatojenik fungus orjinli yaklaşık 150 ticari preparat 2007 yılından itibaren üretilmekte ve zararlılar ile mücadelede kullanılmaktadır (Faria ve Wraight, 2007).

Böcek patojeni olan funguslar genellikle Deuteromycota ve Entomophthorales gruplarına dahildir (Hajek, 1997). Entomopatojenik funguslar çok geniş bir konak spektrumuna sahiptirler. Birçok böcek ordosuna ait türleri enfekte edebilirler. Bir entomopatojenik fungus birden fazla böcek türünü enfekte edebilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, entomopatojenik fungusların insektisidal aktivitelerinin artırılması için diğer biyolojik mücadele etmenleri ve çevresel uygulamalarla kombine edilerek kullanılması gerektiği gösterilmiştir (Kocaçevik, 2012).

### 1.6.3.3. Nematodlar

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 (Glazer ve Lewis, 2000). Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyaları günümüzde, özellikle toprak böceklerinin mikrobiyal mücadelesinde en sık kullanılan gruplardır (Liu vd., 2000; Lacey vd., 2001; Erbaş, 2012).

### 1.6.3.4. Protozoonlar

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 eşliğinin altında tutulması bakımından önemlidir (Maddox, 1987; Brooks, 1988).

Entomopatojenik protozoonlar genellikle konağa spesifiktir. Böceklerde oluşturdukları hastalıklar yavaş ilerler. Virulansları düşüktür ve böceklerde kronik enfeksiyonlar oluştururlar. Virulanslarının düşük olması nedeniyle protozoonların enfekte ettiği böceklerin ölümü bazen haftalar sürebilir (Hoffman ve Frodsham, 1993).

Protozoonlar çoğu böceklere ağız ve sindirim sistemiyle girer. Sporozonlar ve özellikle mikroporlar tarafından oluşturulan enfeksiyonun en muhtemel oluşma durumu böcek yiyeceklerinin sporla kirlenmiş olmasıdır (Demirbağ vd., 2008). Protozoonlar tarafından enfekte edilen böceklerin hareketleri yavaşlar ve tembelleşir. Beslenme ve üreme faaliyetlerinde azalma görülür. Ölümün gerçekleşebilmesi için enfeksiyon seviyesinin çok yüksek olması gerekir. Şimdiye kadar belirlenen birçok protozoa türünün, arthropodlarla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Protozoa sınıfı içerisinde yer alan Ciliphora, Sarcocystophora, Apicomplexa ve Microspora gruplarına ait türler böcekleri enfekte edebilirler (Maddox, 1987).

### 1.6.3.5. Virüsler

Birçok virüsün böceklerin hastalanmasına neden olarak böcek salgınlarını meydana getirdiği 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 öldürür ve böylece afetlerini ortadan kaldırır (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 artropodlar için spesifiktir (Demirbağ ve Beldüz, 1997).

Çoğu bakülovirüsler 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 asılı olarak ölür. Dokuları koyulaşır, ayrışır ve vücutları sıvı hale geçer (Lipa, 1975; Demir, 2004).

### 1.6.4. *Cydia molesta* ile Mücadele

#### 1.6.4.1. Predatörler

Böcek predatörleri, besin kaynağı olarak böcekleri yakalayan ve yiyen hayvanlardır. Bu predatörleri balıklar, amfibiler, sürüngenler, kuşlar, böceklerle beslenen çeşitli omurgasız hayvan grupları ve karnivor böcekler oluşturur. Ormanlarda zarar yapan böcekler düşünüldüğünde bu gruplardan kuşlar ve karnivor böceklerin biyolojik mücadelede kullanılma potansiyeli olduğu söylenebilir. Kuşlar için mutlak yararlı veya mutlak zararlı denilememekle 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 oynamaktadırlar (Oğurlu, 2000).



Doğu meyve güvesinin predatörleri arasında taçinid sinekler, braconid yaban arıları, kalsid yaban arıları, karabid arılar, kulağakaçanlar ve karıncalar bulunmaktadır. Örümcekler yumurtaları, güveleri ve larvaları yerler. Gece uçan kuşlar, ağaç kurbağaları ve bazı insektivor yarasalar da güvelerin sayısını azaltmaktadır.

#### **1.6.4.2. Parazitler**

Böcek parazitleri, hayatını tek bir konukçu ferdi üzerinde tamamlayan ve konukçusunu zayıflatan, geriletan, gelişmesine mani olan veya öldüren mikroorganizmalara denir. Konukçu ise paraziti taşıyan canlıya verilen isimdir. Buna göre parazitin ya belirli bir süre ya da tüm hayat döngüsü boyunca, kendinden daha güçlü 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 bağılandıkları konağın hayat döngüsü içindeki belli bir safhaya özelleşmiş durumdadır. Bu yüzden bazıları pupa ve yumurta safhası ile sınırlanmışken, bazıları da larval parazitlerdir. Olgun parazit böceklere ise nadiren rastlanılmaktadır.

*Cydia molesta* parazitoitleri arasında en önemlilerinden biri *Glavidorsum stokesii*'dir. Trichogramma mikro yaban arısı da güve yumurtalarının önemli parazitlerdendir. Güve yumurtaları içerisine bir yumurta bırakmaktadırlar. Yaban arısı larvası daha sonra güve yumurta içeriği ile beslenmektedir. Bir dişi yaban arısı 50'nin üzerinde güve yumurtasını parazitleyebilmektedir. Trichogramma mikro yaban arısı ticari olarak üretilmektedir. Mikro yaban arısı erginleri böcek yumurtaları, nektar ve polenlerle beslenerek uzun süre kalıcı olabilmektedirler.

#### **1.6.4.3. Patojenler**

Doğada böceklerin hastalanmasına neden olan ve sonra onları öldüren orjini bakteri, virüs, mantar, nematod veya protozoa olan 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 kontrolünde kullanılır (Burges, 1981; Tanada ve Kaya, 1993; 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 ek olarak, bu entomopatojenlerin mikrobiyal kontrol ajanı olarak kullanımı, 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).

Mikroorganizmaların zararlı böceklerle mücadele amacıyla kullanılması oldukça eski tarihlere dayanır. İlk çalışmalar 1726 yılında Fransa'da Noctuidae larvalarından *Cordyceps* cinsi fungusların izole edilmesiyle başlamıştır (Oğurlu, 2000). 1879 yılında Rusya'da yeşil buğday böceği, *Anisoplia austriaca* Herbst. (Coleoptera: Scarabaeidae)'ya karşı *Metarhizium anisopliae* (Metch.) fungusunun denemeleri yapılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Steinhaus, 1949).

Ancak bu tarihten sonra 20. yüzyılın başlarına kadar mikroorganizmaların zararlı böceklerle mücadelede kullanılması üzerine çok az çalışma yapılmıştır. Bu konudaki çalışmalar 1920 yılından itibaren artmaya başlamış, 1950'den sonra da yoğunlaşmıştır (Oğurlu, 2000).

Zararlı böceklerin diğer doğal düşmanları gibi entomopatojenler de tek bir tür veya gruba spesifiktir ve bazıları zararlı böceklerin uzun zaman periyotları boyunca kontrolünü sağlayabilir (Lacey vd., 2001). Entomopatojenlerin zararlı böceklerin mücadelesinde kullanım stratejileri temelde diğer biyolojik mücadele etmenlerinin kullanımlarıyla aynıdır (Hamm, 1984; Harper, 1987). *In vitro* şartlarda üretilip uygulanabildiği gibi, uygun şartlarda saklanıp doğal ortamda tekrar aktif hale geçebilirler.

Entomopatojen nematodların (EPN) simbiyotik bakterileri ile (*Photorhabdus* sp. ve *Xenorhabdus* sp.) *C. molesta* üzerinde yapılan çalışmalar bu bakterilerin bu zararlı üzerinde etkili olduklarını göstermiştir (Ragni ve Fridlender, 1999). EPN türlerinin

(*Steinernema* sp. ve *Heterorhabditis* sp.) *C. molesta* üzerinde etkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Riga vd., 2006). *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. riobrave* ve *H. marelatus* türleri ile yapılan biyotest çalışmaları sonucunda *S. feltiae*'nin en yüksek etkiyi gösterdiği tespit edilmiş (Riga vd., 2006).

Fungal patojenlerin neden olduğu doğal epidemiler, zararlı böcek populasyonlarında büyük bir azalmaya yol açarlar (Evans, 1986; McCoy vd., 1988). *Cydia* türleri üzerinde yapılan fungus çalışmada, *Lecanicillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* ve *Paecilomyces fumosoroseus* türleri kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda en yüksek etkiyi *M. anisopliae* ve *P. fumosoroseus* göstermiştir (Herker vd., 2010). Bu türlerin *C. molesta* üzerindeki etkilerini de belirlemek amacıyla çalışmalar yapılacağı belirtilmiştir.

Protozoonların zararlı böcek populasyonlarında meydana getirdikleri epidemiler, az rastlanılan bir durum olmasına karşın, neden oldukları ferdi ve küçük gruplar halindeki ölümler, zararlı böcek populasyonlarının kontrol altında tutulması bakımından önemlidir (Maddox, 1987; Brooks, 1988). *Cydia pomonella* üzerinde en etkili protozoa olarak *Nosema carpocapsae* belirlenmiştir (Siegel vd., 2001).

En yaygın şekilde kullanılan mikrobiyal mücadele etmeni *Bacillus thuringiensis* Berliner bakterisidir. Birçok böcek takımına ait türlere karşı aktif olan yeni suşların izole edilmesi ve yapılan genetik düzenlemeler, bu bakterinin kullanım alanlarını genişletmiştir (Lacey vd., 2001). Doğu meyve güvesi üzerinde yapılan çalışmalarda *Bacillus thuringiensis* bakterisinin etkili bir şekilde kullanıldığı bilinmektedir (Grassi ve Deseo, 1984). *B. thuringiensis*'in larvalara karşı enfektif olduğu belirlenmiştir (Rothschild ve Vickers, 1991).

Böcek virüslerinden, Baculoviridae familyası sadece artropodlar için spesifiktir (Demirbağ ve Beldüz, 1997). Çoğu bakülovirüsler sadece bir veya yakından ilişkili birkaç böcek türünü enfekte edebilir (Arif ve Kurstak, 1991). İnsanlar ve diğer hedeflenmemiş organizmalar için güvenli bir mikrobiyal ajan olması, bu virüslerin biyolojik mücadelede kullanılma potansiyelini arttırmaktadır (Granados ve Federici, 1986; Gröner, 1986).

Bakülovirüsler, 25×250 nm büyüklükte olup, 90-200 kilo baz çifti (kbp), yuvarlak-kapalı, çift zincir, süper sarmal DNA ihtiva ederler (Arif, 1986). Virionları polihedra olarak adlandırılan bir protein matrix içerisinde gömülüdürler. Baculoviridae familyası A, B ve C olmak üzere üç alt gruptan oluşur (Blissard ve Rohrmann, 1990; Bilimoria, 1991). A alt grubunu oluşturan Nukleopolihedrovirüsler (NPV) en iyi bilinen böcek virüsleri olup

artropod virüslerinin %41'ini teşkil etmektedir. NPV orjinine bakmaksızın bütün böcek hücrelerini enfekte eder ve ölümüne neden olur. Hastalanan larva önce uyuşuk bir hal alır ve sonra beslenmeyi bırakır. Ölmeden önce ağacın tepesine tırmanır ve arka bacaklarına asılı olarak ölür. Dokuları koyulaşır, ayrışır ve vücutları sıvı hale geçer (Lipa, 1975).

B alt grubunu oluşturan Granülozis virüsler (GV), zararlı böceklerin kontrolünde büyük öneme sahiptir. Konak böceğin yağ dokusu, trakeal veya epidermal hücrelerinin sitoplazmasında ya da çekirdeğinde çoğalabilirler. Sadece Lepidoptera larvalarında enfeksiyon oluşturdukları rapor edilmiştir (Blissard ve Rohrmann, 1990). C alt grubu ise Bakülovirüslerin zarf içermeyen grubudur.

Bakülovirüsler başta Lepidoptera ve Hymenoptera olmak üzere, Coleoptera, Diptera, Neuroptera, Siphonoptera, Thysanura ve Trichoptera ordolarından çoğunlukla larva, bazen pupa veya ergin böcekleri enfekte ederler (Possee, 1993; Tanada ve Kaya, 1993; Murphy vd., 1995). Çeşitli kaynaklarda farklılık göstermesine karşın 400'ün üzerinde böcek türünü enfekte ederler (Granados ve Federici, 1986; Adams ve McClintock, 1991; Tanada ve Hess, 1991; Tanada ve Kaya, 1993; Cunningham, 1995; Vail vd., 1999).

Bakülovirüslerden hazırlanan biyolojik insektisitler birçok ülkede yoğun olarak kullanılmaktadır. Örneğin Brezilya'da tarım arazilerinde zarar yapan *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)'e karşı 1 milyon ha.'lık alanda NPV'ler kullanılmaktadır (Sosa-Gomez ve Moscardi, 2001). Konak spektrumlarının dar olması ve in vivo üretimlerinin oldukça masraflı olması, geniş alanda kullanımları için dezavantaj oluşturmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda konak spektrumu geniş olan formlarda izole edilmiştir. Örneğin *Autographa californica* Nukleopolihedrovirüs (AcNPV)'ün, Lepidoptera takımının 11 farklı familyası içerisinde yer alan 43 değişik türde aktif olduğu belirlenmiştir (Cunningham, 1995; Vail vd., 1999).

Yapılan bakülovirüs çalışmalarında *C. molesta* üzerinde *Anagrapha falcifera* (Kirby) (AfMNPV)'nin oldukça başarılı olduğu tespit edilmiştir (Lacey vd., 2002).

## 1.7. Bakülovirüsler

Böceklerde hastalık meydana getiren 12 virüs familyası arasında Baculoviridae üyelerinin Arthropodlara özelleşmeleri ve oldukça virulent olmaları nedeniyle biyolojik mücadelede kullanılabilirliği söylenebilir. Bakülovirüsler böceklere özelleşmiş ve sadece böcekleri hastalandıran faydalı viral patojenlerdir (Miller, 1997). Virüs familyaları

arasında Baculoviridae familyasında yer alan Nuclear Polyhedrosis virüsler (NPV) ile Granulosis virüsler (GV) başlıca biyolojik mücadele etmenlerini oluşturmaktadır. Granulosis virüsler NPV'lere göre konukçuya daha çok özelleşmişlerdir. Çoğu Lepidoptera ve Hymenoptera takımında bulunan 400'den fazla böcek türünün bakülovirüslerin konukçusu olduğu rapor edilmiştir (Lacey vd., 2001).

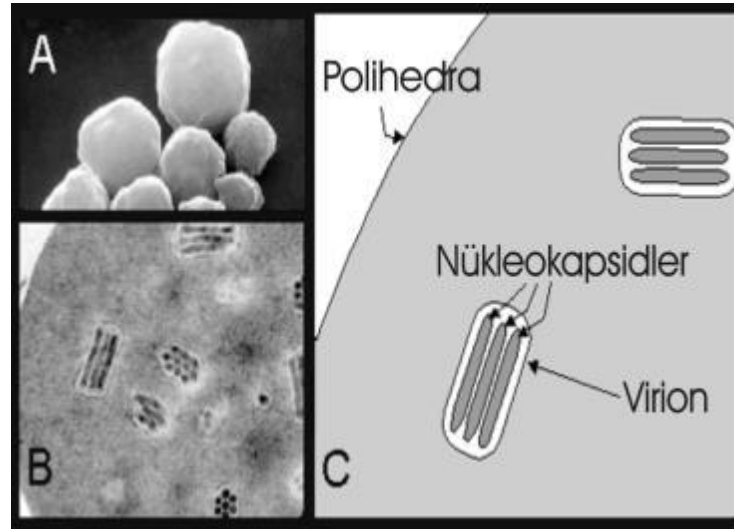
NPV'lerin zararlıların kontrolünde kimyasallara göre çeşitli avantajlara sahip olması bu ajanların birer mikrobiyal insektisit olarak geliştirilmesinde önemli bir adımı oluşturmuştur (Kunimi vd., 1996). Bu avantajlardan belki de en önemlisinin bakülovirüslerin konukçu spesifikliklerinden kaynaklanan hedef alınmayan organizmalar üzerindeki güvenilirliği olduğu söylenebilir (Laird vd., 1990; Fuxa, 1991). Bu ajanların bazıları çeşitli ülkelerde formüle edilerek Mamestrin (MbNPV), Gusano (AcMNPV), Cyd-X (CpGV), Madex (CpGV), Granupom (CpGV), Gemstar (HzSNPV), Spod-X (SeMNPV), Spodopterin (SpliMNPV) adları altında piyasaya sürülmüştür. Özellikle *Heliothis* spp. ve *Anticarsia gemmatalis*'in NPV'leri tüm dünyada geniş alanlarda kullanılabilir. Örneğin *A. gemmatalis* NPV'sinin Brezilya'da soya fasülyesi tarım alanlarında yaklaşık 1.7 milyon ha'lık bir alanda bu zararlıya karşı başarıyla kullanıldığı rapor edilmiştir (Moscardi ve Sosa-Gomez, 2000). Üretim ise ülkedeki küçük yerel firmalar ve kooperatifler tarafından tarlalarda yapılmakta, basit bir şekilde formüle edildikten sonra konvansiyonel yöntemlerle zararlıların bulunduğu tarlalara tekrar uygulanmaktadır. Böylece her yıl tonlarca tarım ilacının doğaya atılması da engellenmektedir.

### 1.7.1. Baculoviridae Familyasına Ait Genel Özellikler

Bakülovirüsler böcek patojeni virüsler arasında en yaygın olan ve üzerinde en çok çalışılan virüs familyasını oluşturmaktadır (Tanada ve Kaya, 1993). Bütün bakülovirüsler aynı temel yapıya sahip olup zarflı, çubuk şekilli nükleokapsidlerin bulunduğu ve virionları içeren gömülü yapılardan (OB) meydana gelmiştir (Granados ve Federici, 1986). Çubuk şekilli bu nükleokapsidlerin boyutları 40-60 × 200-400 nanometre arasında değişmektedir (Matthews, 1982). Bakülovirüsler dar bir konukçu dizisine sahip olup oldukça patojenik özellik gösterirler ve sahip oldukları Occlusion Body'leri sayesinde diğer entomopatojen virüs familyalarına göre çevrede daha kalıcı olabilmektedirler (Entwistle ve Evans, 1985). Bu virüslerin dairesel, çift sarmallı (80-220 kilobaz çifti) DNA'ya sahip olduğu rapor edilmiştir (Blissard ve Rohrman, 1990).

### 1.7.2. Viral Yapı ve Çoğalma

Bakülovirüslerde virüs partikülü yani virion bir nükleik asit ve nükleik asidin çevresini kuşatan bir protein tabakasından (Kapsid) meydana gelir. Kapsid virüsün morfolojik ve fonksiyonel özelliklerini korumasını sağlar. Her bir virüs DNA'dan oluşan nükleik aside sahiptir. Nükleik asit ise çift sarmalıdır. Nükleik asidin kapsidle birlikte oluşturduğu yapıya ise "Nükleokapsid" adı verilmektedir (Şekil 6). Bakülovirüsler nükleokapsid lipoprotein yapısında olan bir zarf ile kaplıdır. Bu zarf viral çoğalma esnasında veya virüs hücreyi terk ederken ya da hücreye giriş yaparken kazanılır. Zarf virüsün hücreyi penetrasyonunda önemli rol oynar. Virionlar ise "viral occlusion" ya da "Occlusion Body" olarak adlandırılan protein yapılarının içinde bulunmaktadır.



Şekil 6. NPV'lerde viral yapı ve virion A) Bakülovirüs partikülleri veya polihedra B) Polihedranın kesiti C) Polihedra kesitinin diyagramı (V. D'Amico)

Omurgalı virolojisinde olduğu gibi böcek virolojisindeki ilerlemeler de böcek doku kültürü tekniklerinin gelişimiyle paralel olmuştur. Bu konuda ilk olarak Trager 1935'te ipek böceği yumurtalıklarından elde ettiği hücre kültürlerini NPV ile enfekte etmiştir. Ancak doku kültür hücrelerindeki en yüksek enfeksiyonu sağlayan etkin sistem 1973'te Goodwin'in yaptığı çalışmalar ile sağlanmıştır. Günümüzde bakülovirüslerin üretiminde en yaygın kullanılan doku kültürü ise *Spodoptera frugiperda*'dan elde edilmiştir. 1983'ten günümüze kadar pek çok böcek patojeni virüs GV'ler dışında böcek doku kültürlerinde

üretilmiştir. Ancak 1984'te Naser vd. tarafından *Cydia pomonella* GV'si de doku kültürlerinde çoğaltılabilmektedir.

Bakülovirüs enfeksiyonlarında virüsün 2 fenotipi enfeksiyonu oluşturmaktadır (Hu vd., 1999): 1-) Plasma enveloped virion-Non occluded v.-Extracellular v. (Budded Virus): Bu fenotip hemosol ve hücre doku kültürlerinde enfeksiyona neden olan ana tipi oluşturmaktadır. 2-) Occluded nuclear enveloped virion.-Polyhedra derived v. (Occluded Virus): Bunların çoğu occlusion body'ler içerisinde bulunmakta olup hemosolde enfeksiyon yapmamaktadır. Ancak OV'ler hassas konukçulara virüsün taşınmasında ana enfeksiyon elementini oluşturmaktadır. Baculoviridae familyasında yapılan ilk sınıflandırmada 3 alt gruba belirlenmiştir: a-) Altgrup A: Nuclear polyhedrosis virüsler (NPV) b-) Altgrup B: Granulosis virüsler (GV) c-)Non-Occluded virüsler (NOV-Konukçu içerisinde hiçbir oluşum meydana getirmeyen virüsler)

Francki 1991'de NPV ve GV'leri Eubaculovirinae altfamilyası altına alırken, NOV'ları ise Nudibaculovirinae alt familyası altında toplamıştır. Volkman vd. (1995), ise Baculoviridae familyası içerisindeki Nükleopolihedrosisvirüs'ler (NPV) ve Granulosisvirüs'leri (GV) 2 cins olarak tanımlamış ve NOV'ları Baculoviridae familyasının dışında tutmuştur. Mevcut bakülovirüs sınıflandırmasında günümüzde Volkman'ın yaptığı bu sınıflandırma esas alınmakta dolayısıyla da NOV'lar artık Baculoviridae familyasında değerlendirilmemektedir. Baculoviridae familyasında yer alan virüslerin DNA'larının sekans analizlerindeki benzerlikler bu virüslerin genetik olarak birbiriyle yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (Smith ve Summers, 1982).

### 1.7.3. Nüklear Polihedrosis Virüsler (NPVs)

NPV'ler viral partikülleri içeren polyhedral yapıların varlığıyla karakterize edilirken bu çok yüzeyle polihedral oluşumları konukçu hücrenin çekirdeğinde çoğalarak meydana getirmektedirler. Polihedra'nın biyokimyasal kompozisyon ve yapısı toprakta doğal parçalanmadan virüsü koruyacak şekilde olup, bu koruma bazen onlarca yılı alabilen uzun süreleri bile kapsayabilmektedir. NPV'lerin enfeksiyon yeteneğini doğada yeni enfeksiyonlara kadar stabil bir şekilde koruması hayat döngüsünde oldukça önemlidir. Bu durum konukçu türlerinin belki univoltin olması, diyapoza girebilmesi, göç etmesi veya uzun süreli olarak belli bir populasyon oluşturamaması ya da virüse hassas dönemde olmaması durumunda virüsün hayat döngüsünü devam ettirebilmesi açısından

bakülovirüslere büyük bir avantaj sağlamaktadır.

NPV'ler Baculoviridae familyasındaki en önemli grubu oluşturmaktadırlar. NPV enfeksiyonu böceklerde belirlenen ilk virüs hastalığıdır. Bu cins iki altcins ayrılmaktadır (Hu vd., 1999):

a-) Single Nucleocapsid Polyhedrosis Virüsler (SNPV): Bu altcinste 1 zarfta 1 nükleokapsid bulunur. Örnek; *Bombyx mori* SNPV'si

b-) Multiple Nucleocapsid Polyhedrosis Virüsler (MNPV): Bu altcinste ise pek çok nükleokapsid (en çok 39) tek bir zarf içerisinde bulunur. Örnek; *A. californica* MNPV'si

Bunlarda, daha önce de belirtildiği üzere bakülovirüs partikülü polihedra adı verilen protein kılıf içerisinde bulunur (Şekil 7). Bir polihedra da virüse bağlı olarak 200 kadar virion bulunabilmektedir (Ackerman ve Smirnoff, 1983). Polihedranın boyutları 0.5-15 µm arasında değişmektedir (Tanada ve Kaya, 1993). Polihedra sudan daha ağır olup akışkan solüsyonlarda dip tarafa çökmektedir.

NPV'ler böcekte epidermisi, yağ dokusunu, kan hücrelerini, trake sistemini, malpigi borularını, üreme organlarını, tükrük bezlerini, kas ve sinir dokularını ve nadiren de ipek bezlerini enfekte ederler. SNPV ve MNPV genotiplerinin patojenisitelerindeki farklılık, bunların sahip oldukları nükleokapsid sayısındaki farklılığa dayandırılmaktadır (Van Beek vd., 1988). Dolayısıyla da MNPV'lerin sahip oldukları tek zarftaki daha çok nükleokapsitten dolayı SNPV'lere göre daha patojen oldukları düşünülmektedir.





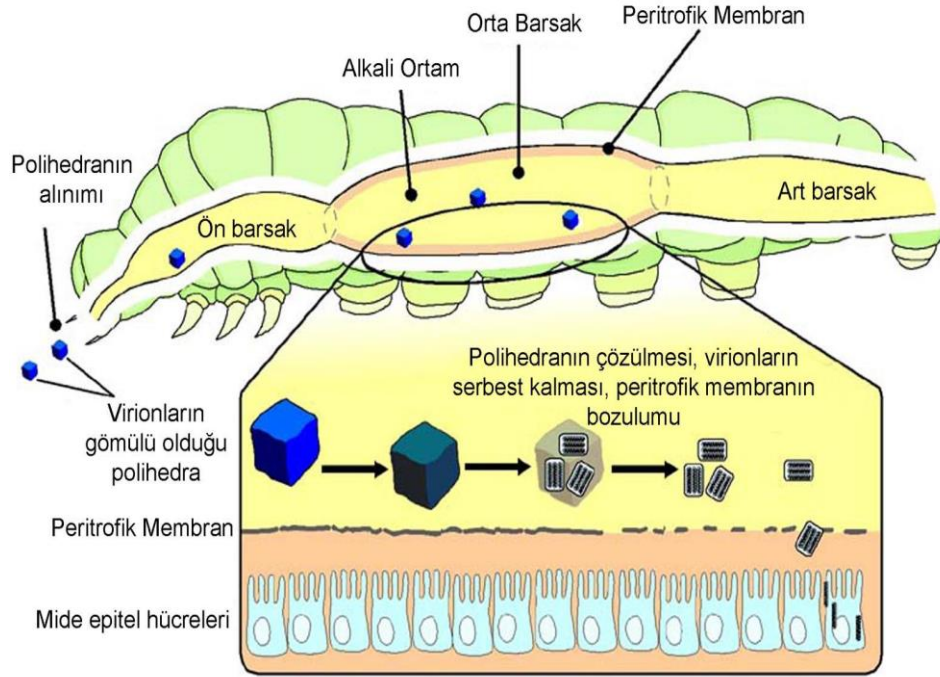
Şekil 7. Enfeksiyondan 4 gün sonrasında *Autographa californica* NPV'si ile enfekteli hücrelerde görülen polihedraların ışık mikroskobu altındaki görüntüsü (Jim Litts).

### 1.7.3.1. Giriş Yolları

Bakülovirüs enfeksiyonları genel olarak beslenme yoluyla oluşsa da dölden döle iletim, stigmalarından geçiş, kanibalizm ve parazitoid ovipozitörleriyle de iletim saptanmıştır (Moscardi, 1999).

### 1.7.3.2. Etki Mekanizması

Lepidopterlerde hassas dönem larva dönemi olup NPV enfeksiyonu genelde bulaşık yaprakların yenilmesiyle başlar. Bu enfeksiyon hastalığın sistemik olarak yayılmasına ve larvanın ölümüne kadar giden bir sürece de olanak sağlamaktadır (Şekil 8).



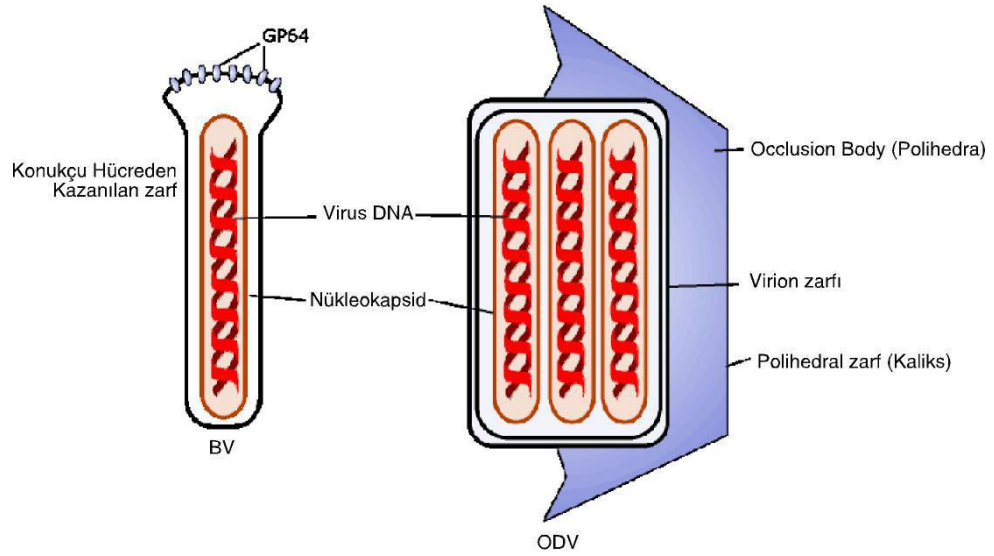
Şekil 8. Konukçu böceğin NPV enfeksiyonunun şematik gösterimi (Kalmakoff ve Ward, 2003).

Polihedranın hassas bir böcek tarafından yenilmesiyle viral protein matriks böcek orta bağırsağındaki yüksek pH (8,5-11) koşullarında çözünür. Polyhedra içindeki ODV'ler böylece serbest kalır ve bu zarflı nükleokapsidler (virionlar) epitel hücrelerinde hücre membranına tutunur. Yeme sonrasındaki 15 dakika ile 2 saat arasında hücre membranı ile birleşmeyi takiben zarf açılır ve nükleokapsidler stoplazma içerisine girer. Yani nükleokapsidler böcek mide epitel hücrelerine girerek öncelikle bu hücreleri enfekte ederler. Daha sonra nükleokapsidler viral DNA'nın çıplak kaldığı yere yani çekirdeğe taşınırlar ve bunu viral DNA replikasyonu izler. Bu sırada çekirdek büyümeye başlar. Hücre çekirdeğindeki hipertrofi NPV enfeksiyonlarının ilk göstergesidir. Yeni oluşan bazı nükleokapsidler de çekirdek membranına doğru tomurcuklanır ve buradan plazma membranına taşınır. Böylece enfekte edilen hücrelerde virüsün çoğalması sonucu bakülovirüsün ikinci fenotipi olan "Tomurcuk Virüs-Budded Virus-BV" üretilmeye başlar ve virüs hücre zarından dışarıya doğru tomurcuklanır.

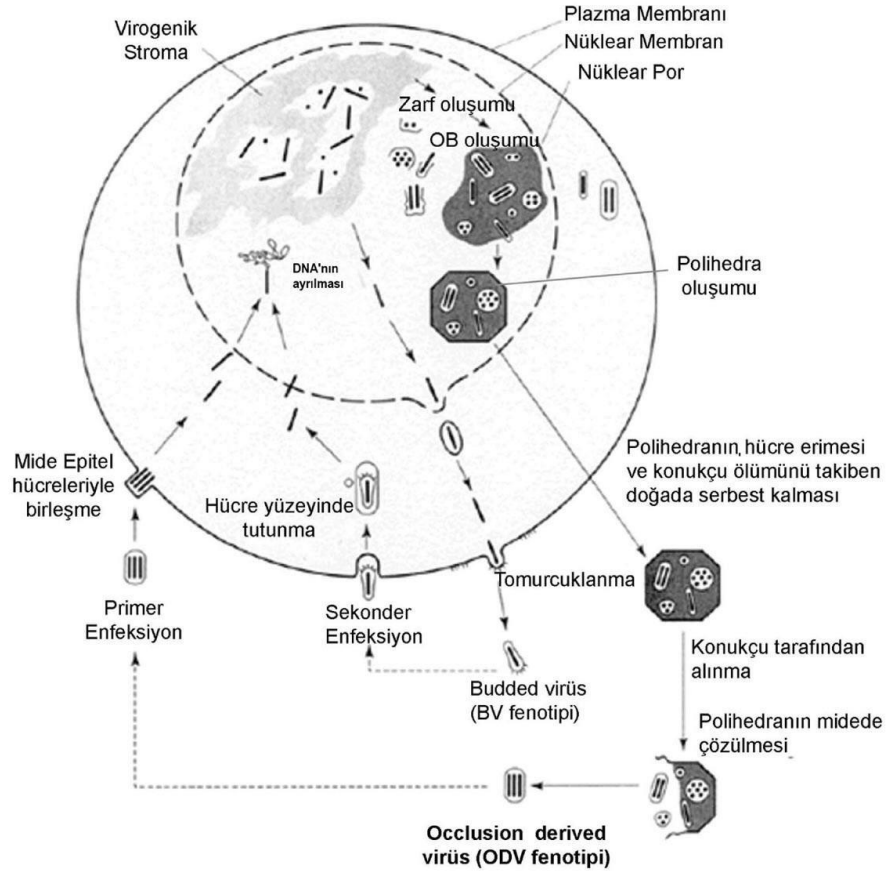
BV'ler tek bir nükleokapsidi kapsar ve hücre zarından nükleokapsidlerin tomurcuklanması esnasında kazandıkları bir zarf ile çevrilidir (Şekil 9) (Kalmakoff ve

Ward, 2003). Virüsün tomurcuklanmasından önce hücre duvarı viral bir protein olan GP64 ile de çevrilir. Yani nükleokapsidler virüs tarafından kodlanan glikoproteini (gp64) içeren özel zarfla birlikte stoplazmik membrandan geçerek hemosol içinde tomurcuklanır. Virüs bu morfortipi sayesinde böcek midesini çevreleyen koruyucu ve destek dokuları geçerek enfeksiyonu yatay olarak tüm böcek hücrelerine yayar. Daha sonraki aşamalarda tomurcuk virüs üreten hücrelerin çekirdeklerinde bakülovirüs nükleokapsidleri birikmeye başlayacaktır. Şekil 10'da ise bakülovirüslerin enfeksiyon çemberi gösterilmektedir.

BV'ler bir anlamda konukçu böceğin diğer hücrelerinde sekonder enfeksiyonlar için özelleşmektedir. Ölümü takiben larval kütikül parçalanır ve çok sayıda virüs polihedrası çevreye yayılır.



Şekil 9. Bakülovirüs'lerin BV ve ODV fenotiplerinin şematik gösterimi (Kalmakoff ve Ward, 2003).



Şekil 10. Bakülovirüs enfeksiyon çemberi (Lua ve Reid, 2003).

Konukçu bitkilerin çeşitli kısımlarında bulunabilen virüs polihedrası solar radyasyondan dolayı hızlı bir şekilde inaktive olabilmektedir. Rüzgar ve yağmur polihedra'nın bitkilerin korunaklı yerlerine, gölgeli kısımlara ve toprağa taşınmasında etkili faktörlerdir. Bu faktörler virüsü aynı zamanda tekrar konukçu bitki üzerine bulaştırabilir. Bu durum bazı böceklerin ve arthropodların aktiviteleri ile de gerçekleşebilmektedir. Bundan dolayı toprak NPV'lerin periyodik olarak diğer ortamlara bulaşmasında etkili olan doğal bir rezervuar durumundadır. NPV enfeksiyonlarının sonunda kadvraların içi daha sıvı bir hale gelmekte ve böylece milyonlarca polyhedra parçalanarak kütikuladan bu şekilde dışarı bırakılmaktadır.

### 1.7.3.3. Semptom ve Göstergeler

Virüsün alınımını takip eden 2-5 günlük süreçte çoğu lepidopter larvasında her hangi bir dış gösterge ya da semptom görülmemektedir. İlk semptomlar ise renkte

değişiklik, integümentin incilmesi ve matlaşmasıdır. Larvalar başlangıçta beyaz sonradan ise koyu bir renge bürünmektedirler. Larvaların, ölüm yaklaştıkça hareketliliğini kaybettiği dikkati çekmektedir. NPV enfeksiyonlarında larvalar genel olarak 5-12 günde ölmekle birlikte yüksek virülansa sahip ırklarda bu süre 2-4 güne kadar düşebilmektedir. Bazı baküloviral enfeksiyonlarda ise larva süresinin normal larva süresine göre uzadığı görülür. Bu durum virüsün sahip olduğu EGT geninden kaynaklanmaktadır (O' Reilly ve Miller, 1989). Bu gen larvada Ekdison hormonunun bloke olmasına neden olmakta ve larva süresini uzatmaktadır.

Bazı böcek türleri NPV enfeksiyonlarında bitkilerin en üst kısmına tırmanarak kendilerini baş aşağı sarkıtarak bakülovirüslara has bir ölüm tipi göstermektedir. Böyle hasta tırtılların sıvılaşmış vücutları, asılı oldukları durumda rüzgar ve yağmur gibi etkenlerin yardımıyla bitkilerin ve toprağın üstüne saçılarak bulaşır. Böylece bakülovirüsler tekrar doğaya yayılarak başka tırtılları hastalandırmak üzere yapraklardaki ve topraktaki yerini almaktadır. Genel olarak enfeksiyonlar ölümle sonuçlansa da bazı zamanlarda larvaların, pupa dönemine hatta ergin döneme dahi girdiği de saptanmıştır. Ancak böyle bireylerde ergin dönemde bırakılan yumurta sayısında ve ergin ömür uzunluğunda ciddi miktarda bir azalma görülebilmektedir.

NPV'lerin Lepidoptera dışındaki önemli bir konukçusu da Hymenoptera takımından testereli arılardır. Bu takımdan *Diprion* ve *Neodiprion* gibi türlerdeki en önemli enfeksiyon simptomsu ise 3-5. abdomen segmentleri arasındaki soluk sarılıktır. Bu durum mide epitel hücrelerinin enfeksiyonundan sonra oluştuğu rapor edilmiştir (Tanada ve Kaya, 1993). Böyle larvalar gittikçe hareketsizleşmekte, anüsten koyu kahverenginde bir sıvı salgılayıp lepidopter larvalarında olduğu gibi tamamen sıvı yumuşak bir görünüm kazanmaktadır.

#### **1.7.3.4. Konukçuları**

NPV'lerin yaklaşık 400 kadar böcek türünü enfekte ettiği rapor edilmiştir. Birçok NPV konukçusuna son derece spesifiktir (Tanada ve Kaya 1993). Model tür olarak kabul edilen *A. californica* multinucleopolyhedrosis virüsü (AcMNPV) ise birden fazla böcek türünü hastalandırabilmektedir. Hassas konukçular esas olarak Lepidoptera takımında (34 familya) bulunmakla birlikte diğer bazı takımlarda da NPV'ler enfeksiyon yapabilmektedir. Bu takım ve familyalar ise Tablo 3'de gösterilmektedir.

Baculoviridae familyasında yer alan NPV ve GV'lerin konukçuları olan böceklerle olan ilişkilerinin 40 milyon yıldan 60 milyon yıl öncesine kadar dayandığı sanılmaktadır (Rohrmann vd., 1981). SNPV'ler pek çok böcek takımında enfeksiyon yaparken MNPV'lerin sadece Lepidoptera takımında enfeksiyon yaptıkları saptanmıştır. Ancak MNPV'ler sadece Lepidoptera takımında enfeksiyon yapsa da oldukça geniş bir konukçu dizisine sahiptir.

Tablo 3. NPV'lerin doğal konukçusu durumunda olan böcek takımları ve familyaları (Lepidoptera takımı hariç) (Beard vd., 1989)

<u>Takım</u>	<u>Familya</u>
Hymenoptera	Argidae, Diprionidae, Pamphiliidae, Tenthredinidae
Diptera	Calliphoridae, Chironomidae, Culicidae, Sciaridae, Tachnidae, Tipulidae
Coleoptera	Cerambycidae, Curculionidae, Dermestidae
Neuroptera	Hemerobiidae, Chrysopidae
Trichoptera	Limnephilidae

### 1.8. Çalışmanın Amacı

Bu bilgiler doğrultusunda, şeftali bitkisine zarar veren Doğu meyve güvesine (*Cydia molesta*) karşı uygulanan mücadele yöntemlerine alternatif oluşturabilecek bir mikrobiyal mücadele etmeninin tespiti çok büyük önem taşımaktadır. Bu süreçte, bu çalışmada *Cydia molesta*'ya karşı mikrobiyal mücadelede kullanılabilmesi amacıyla zararlı üzerinde etkili Elma iç kurdu (*Cydia pomonella*)'dan izole edilmiş *Cydia pomonella* granulozis virüs (CpGV)'ün ülkemiz ve dünya şeftali üretimi için oldukça önemli zararlılardan biri olan *Cydia molesta*'daki transkripsiyonal özelliklerinin belirlenmesidir.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

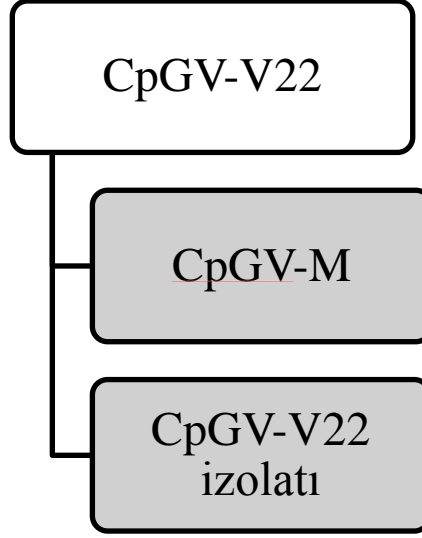
### 2.1. *Cydia molesta*'nın Temini ve Yetiştirilmesi

Çalışma için gerekli olan *Cydia molesta* (doğu meyve güvesi) yumurtaları Andermatt Biocontrol AG İsviçre'den temin edildi. Böcekler, *in vivo* klonlama ve transkriptom analizleri için Julius-Kühn Enstitüsünde (JKI-Darmstadt, Almanya) hazır bulunduruldu.

*Cydia molesta*'nın tüm gelişim aşamalarında %70'lik bağıl nemde 26 °C/18 °C sıcaklık aralığında 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyodu olan inkübatörler kullanıldı. Bu koşullar altında yumurtalar 3-4 gün içerisinde açılmaya başladı. Yumurtaların açılmasından bir gün önce yumurtalar siyah kafalar halinde görüldü. Çıkan larvalar (L1-L5) yarı sentetik ortamlarda pupaya dönene kadar (yaklaşık 17 gün) yetiştirildi. Doğu meyve güvelerinin bu aşamada daha hızlı gelişimi için 26 °C'de 24 saat ışıklı periyoda sahip inkübatörler kullanıldı. Bu nedenle larvalar 13 ya da 14 gün sonra L5 aşamasına gelmektedir. L4 aşamasında larvalar pupa oluşturabilmesi için uygun plastik şeffaf kapaklı kaplara alındı. Pupalar 10-11 gün içerisinde kelebeğe dönüştü. Kelebeklerin çiftleşme ve yumurtlaması için uygun silindirik kaplar ve plastikler kullanıldı. Erginlerden 20-30 kelebek bir silindirik kaba yerleştirildi. Kelebekler yumurtalarını düz bir yüzeye koymayı tercih ederler bu yüzden silindirin alt ve üst yüzeyi uygun şeffaf kağıt ile kapatıldı. Kelebeklerin beslenmesi için ortama su ile nemlendirilmiş pamuk konuldu. Yumurta bırakılan şeffaf kağıtlar iki günde bir değiştirildi.

### 2.2. *Cydia pomonella* Granulozis Virüs (CpGV) Suşları

CpGV-M izolatı Avrupa ticaretinde kullanılan mexican izolatıdır (Huber, 1998). Bu çalışmada, Julius-Kühn Enstitüsü tarafından sağlanan CpGV-M izolatı kullanıldı (Şekil 11). CpGV-V22 izolatı Andermatt Biocontrol AG şirketi tarafından sağlandı. CpGV-V22 genomu sekanslanmıştır (Eberle, 2010).



Şekil 11. CpGV-V22'yi oluşturan iki virüs izolatının şematik gösterimi.

### 2.3. Ivaldi-Sender (1974) Böcek Besiyeri Hazırlanışı

Beş yüz ml yarı sentetik böcek besiyeri hazırlamak için (Ivaldi - Sender, 1974), 32 g mısır unu, 5 g agar-agar, 33 g buğday tohumu, 15 g bira mayası, 2,85 g askorbit asit ve 1,15 g nipagin kullanıldı. Agar-agar ve mısır unu 500 ml saf suda çözülerek otoklavlanarak steril hale getirildi. Askorbik Asit 25-30 ml saf suda çözülür ve nipagin %96'lık etanolde çözüldü. Mısır unu, agar-agar, buğday tohumu bira mayası ve nipagin otoklavdan sonra karıştırıldı. Askorbik Asit aktivitesini kaybetmemesi için sıcaklık 60 °C'ye düştükten sonra eklendi. *Cydia molesta* ile ilgili bütün çalışmalarda bu besiyeri kullanıldı.



## 2.4. Petroff-Hauser Sayma Çemberinde Virüs Partiküllerinin Sayımı

Saflaştırılmış gömülü yapıların (OB) Lecia karanlık alan mikroskopunda 400X büyütme ile Petroff-Hauser çemberine konularak sayıldı. Sayım kabı 0.04 mm<sup>2</sup> büyüklüğünde olan 25 büyük kare ve her büyük kare 16 küçük kareden oluşur. Sayım için 10 µl virüs süspansiyonu kullanıldı. Bir kareye 100-200 virüs gelecek şekilde süspansiyon seyreltildi. OB'lerin sayımı çapraz beş büyük kare üzerinden yapıldı. Aynı seyreltik, tekrar sayıldı. Daha sonra aynı stoktan tekrar seyreltik hazırlanarak işlem ikinci kez tekrarlandı. Virüs konsantrasyonu aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı;

$$5 \text{ karedeki OB'lerin sayısı} \times 1250 \times \text{virüs seyreltiği} = \text{OB'ler/ml}$$

## 2.5. Biotest

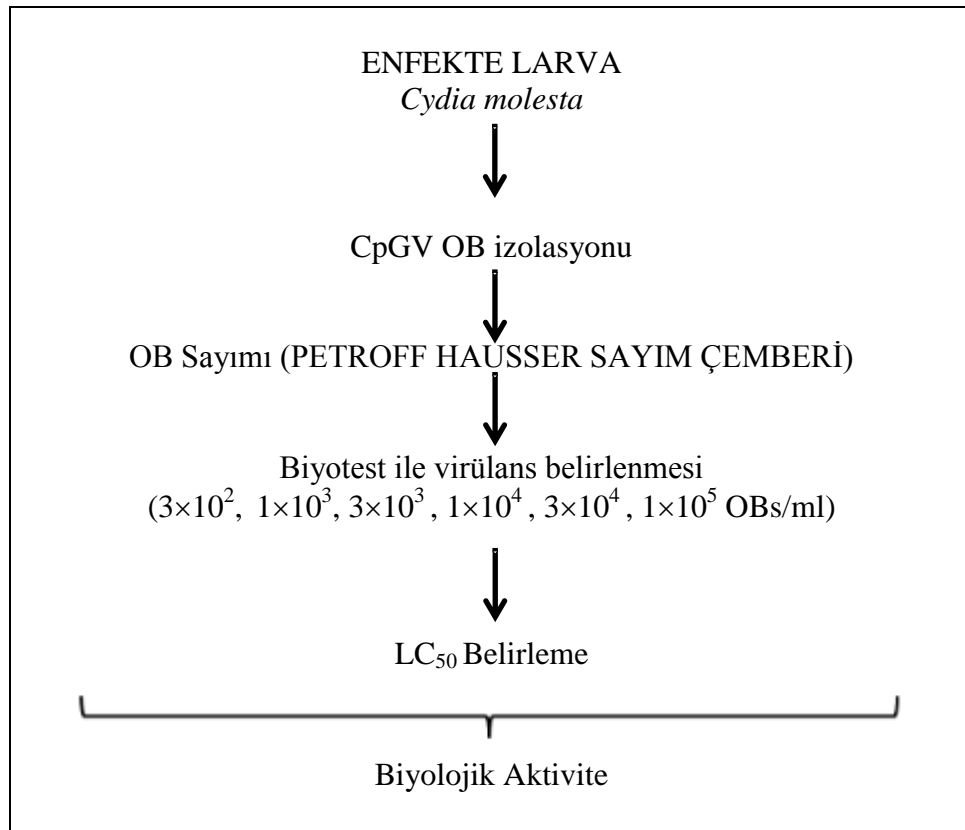
### 2.5.1. *Cydia molesta*'da CpGV-V22 (Andermatt) Çoğaltılması

Ivaldi-Sender (1974) besin ortamı CpGV-V22 virüs süspansiyonunun (OB) enfeksiyon özelliğini kaybetmemesi için virüs 40°C sıcaklığında besiyeri ile karıştırılmıştır. Bu karışım L3 larvalara yedirilmiştir. Çoğaltma için kullanılan virüs konsantrasyonu 10<sup>6</sup> OB/ml dir. Virüs süspansiyonunu çoğaltmak için 1000 tane böcek enfekte edildi. Enfeksiyon gözlenen larvalar bir tüpe toplanarak OB'lerin saflaştırılması için -20°C de muhafaza edildi.

#### 2.5.1.1. Enfekte *Cydia molesta*'dan CpGV Gömülü Yapıların İzolasyonu

Dondurulmuş enfekte larvalardan OB'ler birkaç temizleme işlemiyle izole edildi. İlk olarak enfekte larvaların üzerine bir miktar saf su eklenerek ultrasantrifüjle parçalandı. Üzerine SDS çözeltisi (%0,5 w/v) eklendi ve sonra 30 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakıldı. Ultrasonik su banyosundan sonra (3 dakika) homojenat gazlı pamuk kullanılarak 'sandviç' şeklinde hazırlanan düzencele filtre edildi ve %5'lik SDS çözeltisi ile durulandı. Süzülen madde, 12000 rpm, 12 °C'de 15 dakika santrifüj edildi. Daha sonra pellet alınarak 5 ml saf su içerisinde çözüldü. Hazırlanan Gliserol gradiyenti (% 60 - 70 - 80 v/v) üzerine

çözünen süspansiyon eklendi ve 4000 rpm, 12 °C’de, 45 dakika santrifüj yapıldı. OB’lerin bulunduğu bant yaklaşık %55-60’lık gliserol tabakasında görüldü ve oradan alınarak iki kez çift distile su ile 12000 rpm, 12 °C’de 15 dakika santrifüjle temizlendi. Yüksek oranda saflaştırılmış OB’lerin elde edilmesi için gliserol gradiyenti iki kez tekrarlandı. Süpernatant atıldı. Pellet iki kere damıtılmış 2 ml su içerisine alındı ve 20800 g’de 15 dakika santrifüj edildi. Bu şekilde saflaştırılan OB’lere çift distile (500 µl - 1 ml) su ilave edildi (Şekil 12).



Şekil 12. *Cydia molesta*'nın biyolojik aktivitesinin belirlenmesindeki aşamaların şeması.

### 2.5.1.2. Gömülü Yapılardan Viral DNA İzolasyonu

Virüs gömülü yapıları (OB) 4 °C’de 14000 rpm’de santrifüj yapıldı. Pellete 300 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (nihai konsantrasyon 100 mM) süspansiyon oluşturuldu. OB’ler 37 °C’de 30 dakika bekletilerek virionlar serbest bırakıldı. Süspansiyonun pH’sı 1M HCL ile 8.0’e ayarlandı. DNA ekstraksiyonundan önce RNase A (45 µg/ml) eklenerek 10 dakika 37

°C’de inkübasyona bırakıldı. Süspansiyona %1’lik SDS ve Proteinaz K (250 µg/ml) eklenerek virion partiküllerinin parçalanması için 1 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Çözelti daha sonra Fenol-Kloroform-İzoamilalkol (25:24:1) ile iki kez ekstre edildi. 14000 rpm’de 2 dakika santrifüj işleminden sonra kloroform-izoamilalkol (24:1) ile bir ekstraksiyon yapıldı. Bu işlem üç kez tekrarlanarak üst faz atıldı. Üzerine 0,1 hacminde sodyum asetat (3 M, pH = 5,2) ve 2,5 hacimde %96’lık EtOH eklendi. Yavaşça tüpler alt-üst edildi ve 30 dakika – 80 °C’ye konuldu.

Bekletilen DNA 14000 rpm’de 15 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet %70 soğutulmuş EtOH içerisinde çözülerek 14000 rpm’de 15 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. EtOH dökülerek pellet havada kurutuldu. Kurutulan DNA ya 80-100 µl su ilave edildi. Arıtılan bu DNA kullanım zamanına kadar –20 °C’de depolandı.

DNA konsantrasyonunun belirlenmesi Eppendorf BioPhotometer üzerinde 260 nm’de absorpsiyon ölçümü ile belirlendi. OD 260nm/OD 280nm oranı yaklaşık 1,8 olduğunda DNA saflaştırılmış anlamındadır. Küçük miktarlardaki DNA konsantrasyonunun belirlenmesin agaroz jel elektroforezinde bant yoğunluğunun markır ile karşılaştırılmasıyla belirlendi.

### **2.5.2. *Cydia molesta*’nın CpGV ile Enfeksiyonu**

*Cydia molesta*’ya karşı CpGV izolatlarının konsantrasyonlarına göre etkinliği belirlendi. CpGV izolatlarının (çoğaltılan CpGV-V22 ve CpGV-M) larvalar üzerindeki virülansları belirlendi. Bu çalışmalarda standart biyoanalizler için yapay besin ortamları oluşturuldu. Biyotestlerin ölüm derecelendirmesi, kullanılan konsantrasyona bağlı olarak belirlendi. Buna bağlı olarak %50 oranında larvaların öldüğü letal konsantrasyon (LD50) tespit edildi. Standart koşullarda *Cydia molesta* L1 larvaları virüslü besin ortamında enfekte edildi. Testlerde kullanılan larvalar Andermatt Biocontrol AG (İsviçre) şirketinden temin edildi. Yumurtaların + 4 °C’de depolanma zamanına bağlı olarak L1 larvalarının çıkışı gecikmeli olabilir. Ivaldi-Sender (1974) besin ortamı, virüslerin inaktivasyon özelliğini kaybetmemesi için 40 °C’deki virüs ile karıştırıldı.

Kontrol için iki adet 50 gözlü kaba virüs bulunmayan besin ortamı hazırlandı. Hazırlanan kontrol ortamlarına yeni çıkmış L1 larvalarından ortalama 35 adet konuldu. Daha sonra Petroff-Hauser sayma çemberinde CpGV gömülü yapıları sayılarak 5ml su

içerisine alındı. Taze hazırlanan ve sıcaklığı 40-45 °C'ye düşürülen besiyerine 6 farklı konsantrasyona göre hazırlanan virüsler eklendi. Yarı-sentetik besin ortamı için bu konsantrasyonlar,  $3 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  OBs/ml olarak hazırlandı. Virüs süspansiyonu besin ortamına katıldıktan sonra homojen dağılım için iyice karıştırıldı. Bu karışımlar plastik 50 gözlü plaka üzerine konularak gözlere ayrıldı. Kaplara dökülen besin ile virüs süspansiyonu karışımlarında nemin buharlaşması için kaplar bir gece boyunca açık bırakıldı. Bir fırça ile her göze yeni çıkmış bir L1 larvası konuldu. 35 adet larva ile kaplar dolduruldu. Bu kaplar plastik kapaklar ile kapatılarak 26 °C'de inkübe edildi.

Larvaların ölümlerinin belirlenmesi 1, 7 ve 14. günlerde yapıldı. Biyotest kurulduktan bir gün sonra her kutu kontrol edildi ve ölü olan larva sayıları tarihleri ile kaydedildi. Birinci günde ölümleri belirlemek için steril bir iğne ile larvaların başlarına dokunularak hareket tepkilerine bakıldıktan sonra ölü olup olmadığına karar verildi. Deneyin başlangıcında yapılan bu sayım ( $t=0$ ) deneyin sonunda virüsten ölen larvaların ölüm oranlarına etki etmemesi için yapılacak hesaplamalarda önemlidir.

Sonuçlar lineer olasılık modeli olan Probit analizine (Finney, 1971) göre hesaplandı. Orta öldürücü konsantrasyonun belirlenmesinde ( $LC_{50}$ ) ToxRat programı kullanıldı, eğimler ve varyans değişimleri güvenilirlik limiti %95 olan bu program ile belirlendi. Hesaplanan ölüm oranı ile doz logaritması arasında doğrusal bir ilişki elde edildi. Regresyon çizgisinin (doğrunun eğimi ile y ekseninin kesiştiği çizgi) parametreleri maximum benzerlik yöntemi kullanılarak belirlendi. Üç tekrarlı yapılan çalışmada P değeri belirtilen anlamlılık sayısında (0.05) daha küçük ise anlamlı bir fark vardır (Bender ve Lange, 2007).

$LC_{50}$  değeri virüsün biyolojik aktivitesini belirleme için kullanılan bir değerdir. İlgili konsantrasyon ölüm ilişkisinin eğimi biyotest sisteminin homojenliğinin kanıtıdır. Bunun anlamı, besiyeri içerisinde viral parçacıkların dağılımının homojen olduğudur. Değerlendirme Toxrat solüsyonları standart yazılımı (2.10.05 Version) ile gerçekleştirildi.

Patojenlerin neden olduğu ölüm oranına ek olarak kendiliğinden başlayan doğal olan ölümler de meydana gelebilir. Bu nedenle, kontrol grubundaki ölümler ile deney sonuçlarındaki ölüm oranlarının düzeltilmesine ihtiyaç duyulur. Bunu yapmak için Abbott (1925) düzeltme metodu kullanıldı.

$$\text{Deneydeki \% ölüm oranının düzeltilmesi} = (1 - \% \text{ yaşayan} / \% \text{ kontrol}) * 100 (\%)$$

Probit analizi sigmoidal aktarılan doz-yanıt eğrisini (burada: larva ölüm yüzdesi ile virüs konsantrasyonudur) sunmaktadır. Doğrusal bir regresyona (en uygunu tekrarlanan yaklaşım ile belirlenir) yönelik esas alınan probit çalışması günlük doz uygulaması ile mümkündür. Bu daha sonra LC<sub>50</sub> ve regresyon eğiminde güven sınırlarını ve yanıtta heterojenliği belirlemek için kullanılabilir (Hunter-Fujita vd., 1998).

## **2.6. CpGV-M'nin *Cydia molesta* Larvalarındaki Transkriptom Analizi**

### **2.6.1. Larvaların Enfeksiyonu**

CpGV-M (Tanada,1964) ve *Cydia molesta* (Andermatt Biocontrol AG, İsviçre) L3 larvaları enfeksiyon için kullanıldı. Yeni doğan larvalar, virüssüz besiyerinde (Ivaldi-Sender,1974) L3 olana kadar yetiştirildi. Daha sonra larvalar 8-10 saat aç bırakıldı. 1 µl CpGV süspansiyonuna konsantrasyonu 10<sup>6</sup> OB/ml olacak şekilde hazırlanan virüs süspansiyonu küçük dilimlenmiş besinler üzerine damlatıldı. Aç bırakılan larvalar hazırlanan bu besinlerle beslenmek üzere kutulara yerleştirildi. Kontrol için küçük besin parçalarının üzerine sadece 1 µl saf su eklendi. Normalde larvalar yaklaşık bir saat sonra besinleri yemeğe başladı. Bu nedenle larvalar ile besinler bir araya konduktan bir saat sonrası 0. saat olarak kabul edildi. On beşer larva 24, 48, 72, 96, 144'üncü saatlerde inkübatörden alınarak – 80 °C'de donduruldu.

### **2.6.2. Kadavralardan RNA İzolasyonu**

Kontrol, 24, 48, 72, 96 ve 144. saatlerde dondurulan larvalar alınarak RNA izolasyonu yapıldı. Toplam RNA izolasyonu Fermentas GeneJet RNA saflaştırma kiti ile üreticinin talimatlarına uygun şekilde yapıldı. Farklı zamanlardaki RNA izolasyonları için *Cydia molesta* larvalarının küçük olmasından dolayı her RNA izolasyonunda 4-5 larva kullanıldı. RNA izolasyonundan sonra RNA'lara karışan DNA olup olmadığını anlamak için *granülin* primeriyle PCR yapıldı. DNA görünen örnekler DNase I (1 U/1 µl Fermentas) enzimiyle temizlendi.

### 2.6.3. cDNA Sentezi

RNA izolasyonundan sonra temizlenen RNA'lardan BioRad iScript cDNA sentez kitindeki (BioRad iScript cDNA synthesis kit) iScript reaksiyon mix ve iScript reverse transcriptaz enzimi kullanılarak 40 dakikalık cDNA sentez protokolüne uygun şekilde RNA'lardan cDNA'lar sentezlendi.

### 2.6.4. RT-PCR

Reverse transcription PCR yaparken kullanılan primerler CpGV-M'in sekans analizine göre hazırlandı (Eberle, 2010) (Tablo 4). Aktin geni *Cydia pomonella*'nın internal kontrolü için kullanılmaktadır (Arends ve Jehle, 2006). Bu çalışmada da *Cydia molesta*'nın internal kontrolü için kullanıldı.

Tablo 4. RT-PCR'da kullanılan primerler.

Hedef gen	Sekans	Beklenen Ekspresyon zamanı
<i>aktin</i>	Fwd 5'-AATGGCTCCGGTATGTGC-3' Rev 5'-TTGCTCTGTGCCTCGTCT-3'	Host housekeeping
<i>ie-1</i>	Fwd 5'-CCCCAATCCTATGAGAAGCA-3' Rev 5'-ACGCTTTCGAAATGACCATC-3'	Çok erken
<i>lef-8</i>	Fwd 5'-CTTCCGTCTTCAACCTACTGT-3' Rev 5'-CGCGCCCGTGGTGATAAAAC-3'	Erken
<i>major capsid protein (mcp)</i>	Fwd 5'-TCCGGCAAGGACAATCGCTC-3' Rev 5'-TGGCAGGTCAAACCCTCTG-3'	Geç
<i>f protein</i>	Fwd 5'-GACAGGGACGCAGCACTACT-3' Rev 5'-TCCGCCACACTGTCCTTGAT-3'	Geç
<i>granülin</i>	Fwd 5'-TCAGCTCAACGCTCAACTC-3' Rev 5'-GACAAATTGTCAGTTCAGTAGT-3'	Çok geç

RT-PCR yapılırken kullanılan maddelerin reaksiyondaki karışım miktarları; 1 µl (10 pmol) her bir Primer, 1 µl 10 mM dNTPs, 5 µl 10 × PCR Tamponu, 4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2

$\mu$ l DNA, 0,5  $\mu$ l Taq-DNA-Polimeraz, karışım dd H<sub>2</sub>O ile 50  $\mu$ l'ye tamamlanacak şekilde hazırlandı. PCR reaksiyonu; 95 °C'de 2 dakika denatürasyon, 94 °C'de 1 dakika denatürasyon, primerler özgü annealing sıcaklığı 60 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 30 saniye uzama (extension), 35 tekrar sayısı, 72 °C'de 7 dakika uzama (extension) şeklinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon ürünleri agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.

### 2.6.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi 0,1-30 kb uzunluğundaki DNA fragmentini ayırmaya yarayan bir yöntemdir. Bu durumda DNA fragmentleri uzunluğuna göre jelde meydana gelen elektrik alanı nedeniyle göç hızına göre ayrılır. Gidilen mesafe uzunluk ile ters orantılıdır, örneğin, küçük olan DNA parçaları büyük olandan daha hızlı hareket eder. Agaroz konsantrasyonunun yüksekliği, jelde küçük fragmentlerin daha iyi ayrılmasını sağlar. 50 ml TAE tamponu 0,4 g agaroz ile karıştırılarak mikrodalga fırında çözüldü. Yaklaşık 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra jel olarak hazırlanmak üzere jel tablasına dökülerek tarak yardımı ile ceplere ayrıldı. Katılaşmış olan jel TAE tamponu bulunan tank içine yerleştirildi. Daha sonra akım verilerek (25 ile 100 mV arasında) elektroforez uygulandı. Büyüklüğün belirlenmesi için 1 kb ve 100 bp'lik  $\lambda$ /HindIII-DNA markır olarak kullanıldı. Yürütülen jel, elektroforetik alandan alındıktan sonra, jel 15-30 dakika arasında etidiyum bromür (0,1  $\mu$ g/ml) çözeltisinde bekletildi ve daha sonra UV-transiluminatörde fotoğraflandı (SynGene INGENIUS).

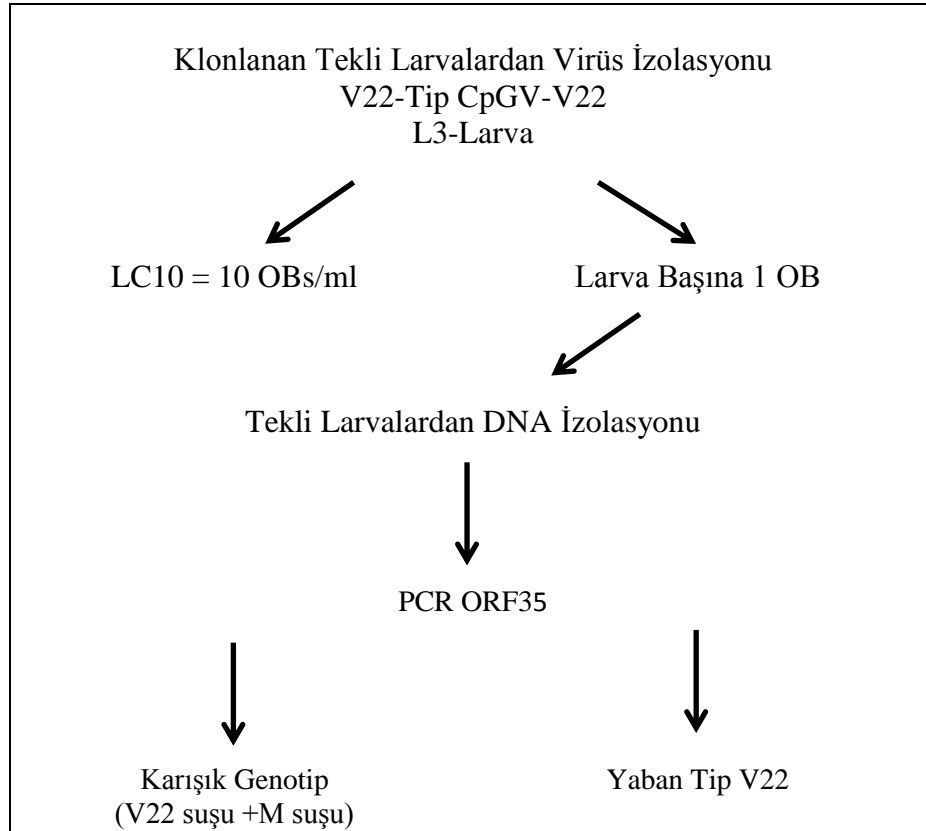
## 2.7. *In vivo* Klonlama

### 2.7.1. CpGV-V22'nin Genotip İzolasyonu İçin *In Vivo* Klonlanması

*In vivo* klonlama Smith ve Crook (1988) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde larva düşük dozda virüs partikülü, genelde bir virüs partikülü ile enfekte edilir (Huber ve Huges, 1984). Bu larvada enfektif virüs partikülleri çoğalır (Şekil 13).

Genotipleri izole etmek için *Cydia molesta* L3 larvalar CpGV-V22 (OB) içeren yarı sentetik besiyeri ile enfekte edildi. Pişen besin 10 OBs/ml içermektedir. Konsantrasyon *Cydia pomonella* için CpGV-M mortalite LC10 (Sheppard ve Stairs, 1977) esas alınarak

belirlendi ve CpGV-V22'nin *Cydia molesta* için mortalite benzer şekilde kabul edildi. Virüs içeren besin ortamının hazırlanması biyotestlerde hazırlanan besin ortamı ile aynı şekilde hazırlandı. Larvalar 26 °C'de 24 saat ışık ortamında inkübe edildi. Larva ölüm oranı her gün izlendi. Enfeksiyon başladıktan 2-3 gün sonra ölen larvalar pens ile besiyeri üzerinden toplandı. Deneyin sonuna kadar ölen larvalar tek tek toplanarak ayrı ependorflara konuldu ve – 20 °C'de muhafaza edildi. Bu tekli larvalardan homojenat viral DNA izole edildi ve PCR ile karakterize edildi. *In vivo* klonlamada 1 OB'nin mediuma karıştığından emin olabilmek için farklı bir yöntem denendi. Bu yöntemde, besiyeri çok küçük parçalara ayrıldı ve bu parçaların üzerine 1 OB/µl virüs solüsyonu damlatıldı. *Cydia molesta* L3 larvaları bu küçük besiyeriyile enfekte edildi. 24 saat içinde küçük parçaları yiyen larvalar virüssüz besiyerine alınıp 26 °C'de 24 saat ışık ortamında inkübe edildi. Bu larvalardan virüs DNA'sı izole edilip saflaştırılana kadar işlem tekrarlandı.



Şekil 13. CpGV-V22'nin genotip izolasyonu için *in vivo* klonlanma şeması.



### 2.7.2. Klonlanan Larvalardan Viral DNA İzolasyonu

Bioron firmasının Ron's Tissue DNA kiti üreticinin talimatlarına göre kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

### 2.7.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu ya da PCR selektif olarak çift sarmallı DNA sekanslarını kopyalama yöntemidir. Bu yöntemde DNA içerisinde yer alan dizisi bilinen iki segment arasındaki bir bölgeyi ısı-duyarlı organizmadan elde edilen DNA polimeraz enziminin yardımıyla oligonükleotitler kullanılarak (primer) DNA'nın çoğaltılması sağlanır (Mullis vd., 1992). Toplam PCR reaksiyonu tekrar tekrar yapılan (25-30 kez) üç aşamalı bir süreçtir. İlk aşamada 94 °C-98 °C aralığında DNA zincirlerinin ikiye ayrılması (denatürasyon) gerçekleşir. İkinci aşamada 50 °C-60 °C arasında oligonükleotitlerin toplanmasına yardımcı olan tavlama (annealing) aşamasıdır. Üçüncü aşamada ise DNA polimeraz enzimi toplanan oligonükleotitleri kullanarak DNA ipliğini uzatır (uzama).

*In vivo* klonlama ile enfekte edilen larvalardan izole edilen DNA iki spesifik primer çifti ile PCR yapıldı (Tablo 5). Bu özel primer çiftleri sadece bir genotip DNA'ya bağlanma özelliğine sahiptir.

ORF35 primerleri hazırlanırken ORF35 fragmenti PCR ile çoğaltıldı. *In vivo* klonlama ile yayınlanmayan V22 izolatının sekans analizini yapan Eberle (2010) (JKI, Darmstadt)'nin sekans analizini kullanan Barkova (2011) PrimerSelect, DNASTar Lasergene, Version 8.1.5 kullanarak ORF35 primerlerini dizayn etti. Bu çalışmada aşağıda sekans dizisi verilen bu primerler karışık V22 genotipini ayırmak için kullanıldı.

Tablo 5. *In vivo* klonlamada kullanılan primerler.

Primer	Sekans 5'-3'	Hedef-gen
V22_ORF35_upper	TGGTGGAAGTATGTGGCTGA	ORF35
M_ORF35_upper	TGGTGGAAGTATGTGGCTGG	ORF35
V22_ORF35_lower	GACAGAGAAACATCCACCCC	ORF35

CpGV-V22 ile *in vivo* klonlamadan elde edilen larvalardan izole edilen DNA'nın PCR'la çoğaltılmasında, 1 µl (10 pmol) her bir Primer, 1 µl 10 mM dNTPs, 4 µl 10X PCR Tamponu, 4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl DNA, 0,5 µl (5U) Taq-DNA-Polimeraz ve karışım dd H<sub>2</sub>O ile 50 µl'ye tamamlandığı karışım kullanıldı. PCR reaksiyonu; 95 °C'de 1 dakika denatürasyon, 95 °C'de 1 dakika denatürasyon, primerlere özgü annealing sıcaklığında (62,3 °C - 65,5 °C) 1 dakika, 72 °C'de 1 dakika uzama (extension), 30 tekrar sayısı, 72 °C'de 7 dakika uzama (extension) şeklinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon ürünleri agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Petroff-Hauser Sayma Çemberinde Virüs OB'lerinin Sayımı

Saflaştırılmış OB'lerin Lecia karanlık alan mikroskopunda 400X büyütme ile Petroff-Hauser çemberine konularak sayıldı. Üç tekrarlı olarak yapılan sayım sonuçları Tablo 6'da verildi.

Tablo 6. Petroff-Hauser sayma çemberinde virüs OB'lerinin sayım sonuçları.

	Materyal	Biotestte Kullanılan Virüs Süspansiyonlarının Konsantrasyonu (OB/ml)
Süspansiyonun ilk sayımı	CpGV V22 (yeni üretilen)	$5,1 \times 10^{10}$
İkinci sayım	CpGV V22 (yeni üretilen)	$5,4 \times 10^{10}$
Üçüncü sayım	CpGV V22 (yeni üretilen)	$5,5 \times 10^{10}$
Referans süspansiyonun ilk sayımı	CpGV-M (JKI)	$3,7 \times 10^{11}$
İkinci sayımı	CpGV-M (JKI)	$3,6 \times 10^{11}$
Üçüncü sayımı	CpGV-M (JKI)	$4 \times 10^{11}$

#### 3.2. CpGV'ün *Cydia molesta*'daki Virülansı

CpGV izolatlarının (M ve V22) farklı konsantrasyonlarının *C. molesta* üzerindeki etkileri araştırıldı. Böylece, CpGV-V22 (Andermatt) izolatı *C. molesta* larvalarında çoğaltılıp yeni elde edilen stoğun virülansı belirlendi. Bu bilgiler bize biyolojik aktiviteyi belirlemede ve hangi CpGV izolatının daha etkili olduğunu anlamada bilgi sağladı. Bu çalışmalar için yapay besin ortamlarıyla standart biyoanalizler kuruldu. Biotestlerde kriter olarak kullanılan virüs konsantrasyonuna karşı larvalardaki ölüm etkisi tarif edildi.

LC<sub>50</sub> değeri %50 öldürücü konsantrasyonun kısaltmasıdır ve test edilen organizmanın yarısını öldürmek için gereken dozdur. Test Trevan (1927)'a göre yapıldı. Her iki izolat için de 7 ve 14. günlerde belirlenen LC<sub>50</sub> değerleri Tablo 7, 8, 9 ve 10'da verildi. Kontrol ölümü %6,5 ve Abbott's formülüne göre düzenlendi.

Konsantrasyonu 100000 OB/ml olan CpGV-M ile enfekte edilen *C. molesta* larvalarının 7. gündeki ölüm oranı %35.4 bulundu. Bu konsantrasyona göre ölüm oranının düşük olduğu belirlendi (Tablo 7).

Konsantrasyonu 100000 OB/ml olan CpGV-M ile enfekte edilen *C. molesta* larvalarının 14. gündeki ölüm oranı %62.5 bulundu. Bu konsantrasyonda virüsün *C. molesta* üzerinde etkinliğinin düşük olduğu belirlendi (Tablo 8).

Tablo 7. CpGV-M ile enfekte edilen *C. molesta* larvalarının 7. gündeki biyotest sonuçları

Konsantrasyon [OB/ml]	Toplam Böcek Sayısı	Canlı	Ölü	Ölüm Oranı (%)
Kontrol	185	173	12	6,5
100	91	86	5	5,5
300	93	87	6	6,5
1000	77	72	5	6,5
3000	89	79	10	11,2
10000	79	74	5	6,3
30000	85	73	12	14,1
100000	96	62	34	35,4

Tablo 8. CpGV-M ile enfekte edilen *C. molesta* larvalarının 14. Gündeki biyotest sonuçları

Konsantrasyon [OB/mL]	Toplam			Ölüm Oranı (%)
	Böcek Sayısı	Canlı	Ölü	
Kontrol	185	155	30	16,2
100	91	78	13	14,3
300	93	72	21	22,6
1000	77	54	23	29,9
3000	89	60	29	32,6
10000	79	44	35	44,3
30000	85	39	46	54,1
100000	96	36	60	62,5

Konsantrasyonu 30000 OB/ml olan CpGV-V22 ile enfekte edilen *C. molesta* larvalarının 7. gündeki ölüm oranı %11.8 bulundu. Bu konsantrasyona göre ölüm oranının düşük olduğu belirlendi (Tablo 9).

Konsantrasyonu 30000 OB/ml olan CpGV-V22 ile enfekte edilen *C. molesta* larvalarının 14. gündeki ölüm oranı %72 bulundu. Bu konsantrasyonda bu stoğun *C. molesta* üzerindeki enfektivite oranının yüksek olduğu belirlendi (Tablo 10).

Tablo 9. CpGV-V22 ile enfekte edilen *C. molesta* larvalarının 7. gündeki biyotest sonuçları

Konsantrasyon [OB/mL]	Toplam Böcek Sayısı	Canlı	Ölü	Ölüm Oranı (%)
Kontrol	174	163	11	6,3
100	85	78	7	8,2
300	92	83	9	9,8
1000	90	85	5	5,6
3000	96	86	10	10,4
10000	97	87	10	10,3
30000	93	82	11	11,8

Tablo 10. CpGV-V22 ile enfekte edilen *C. molesta* larvalarının 14. gündeki biyotest sonuçları

Konsantrasyon [OB/mL]	Toplam Böcek Sayısı	Canlı	Ölü	Ölüm Oranı (%)
Control	174	150	24	13,8
100	85	70	15	17,6
300	92	71	21	22,8
1000	90	63	27	30,0
3000	96	58	38	39,6
10000	97	49	48	49,5
30000	93	26	67	72,0

### 3.3. CpGV-M ile Enfekte Edilen *Cydia molesta* Larvalarından Transkriptom Analizi

#### 3.3.1. RNA İzolasyonu

CpGV-M ile enfekte edilen *C. molesta* larvalarından edilen larvalardan RNA izolasyonu yapıldı. Bu RNA'lardan *aktin* primeri kullanılarak PCR yapıldı.

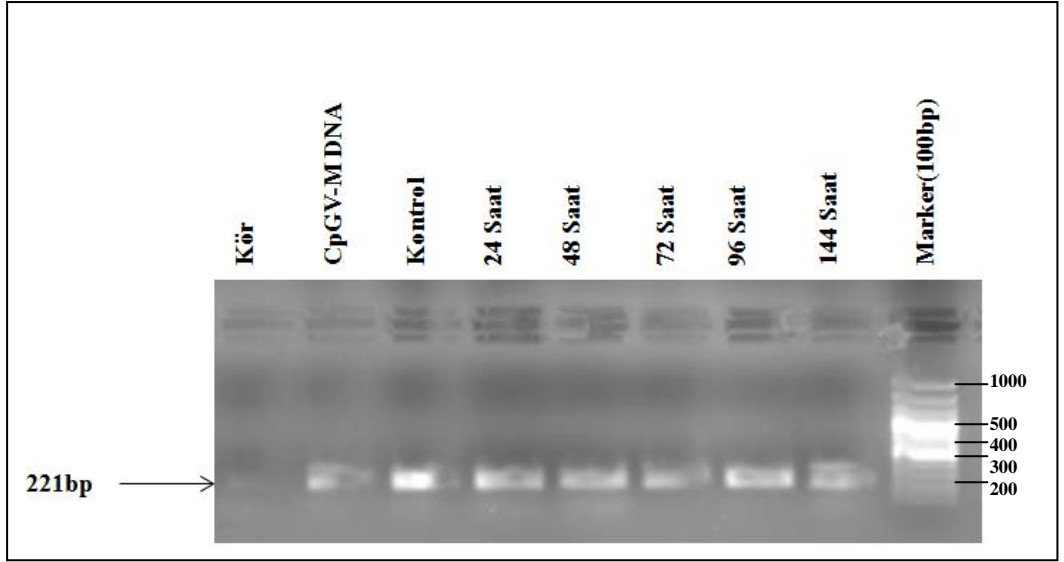
Bu RNA'lardan *aktin* primeriyle yapılan PCR sonucunda pozitif görülen stoklar DNaz enzimi kullanılarak temizlendi. Bu enzimden sonra tekrardan *aktin* primeri kullanılarak aynı RNA'lardan PCR yapıldı. Bu stoklarda bulunan DNA'ların temizlendiği tespit edildi.

#### 3.3.2. RT-PCR

Temizlenen RNA'lardan cDNA sentezi yapılarak bu cDNA'lardan RT-PCR yapıldı.

##### 3.3.2.1. *aktin* Primeri ile Yapılan RT-PCR

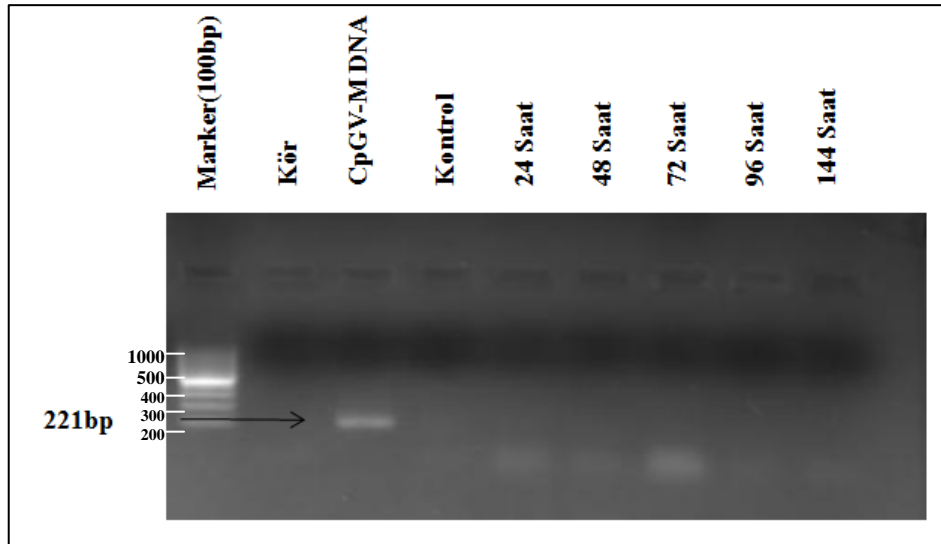
Houskeeping gen olan *aktin* primerleri kullanılarak (Fwd 5'-AATGGCTCCGGTATGTGC-3' / Rev 5'-TTGCTCTGTGCCTCGTCT-3') RT-PCR üretimi sonucunda bütün zamanlarda 221 bp uzunluğunda bantlar görüldü (Şekil 14). Bu bantlar cDNA sentezinin başarılı olduğunu göstermektedir.



Şekil 14. *aktin* primeri ile yapılan RT-PCR sonucu.

### 3.3.2.2. *ie-1* Primeri ile Yapılan RT-PCR

*ie-1* (en erken ekspres olan gen) primeri (Fwd 5'-CCCCAATCCTATGAGAAGCA-3'/ Rev 5'-ACGCTTTCGAAATGACCATC-3') kullanılarak yapılan RT-PCR sonucunda en 221 bp uzunluğunda bantlar görülmedi (Şekil 15). *ie-1* geninin transkript olmadığı belirlendi.

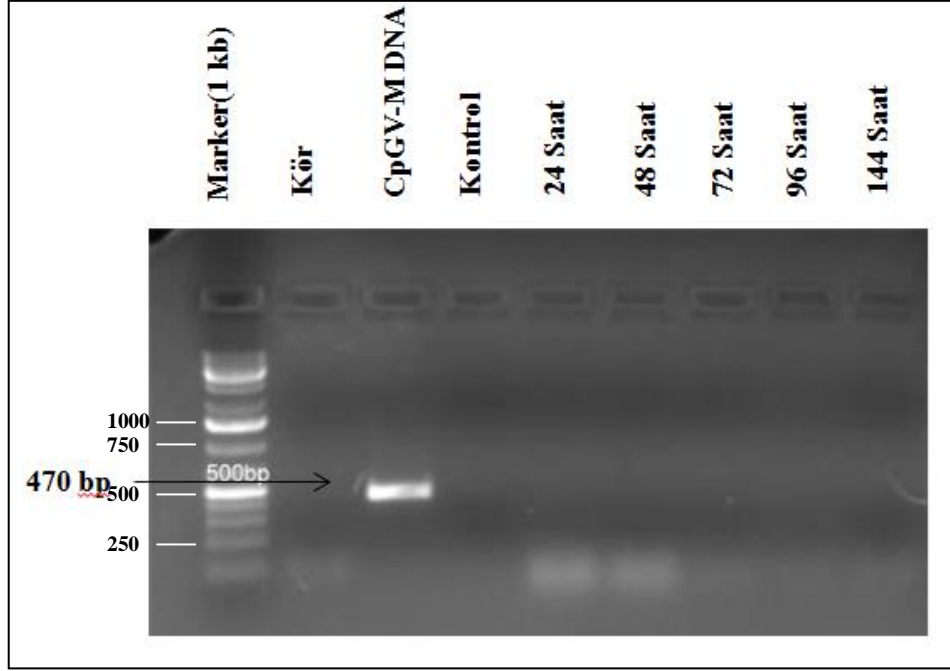


Şekil 15. *ie-1* primeri ile yapılan RT-PCR sonucu.



### 3.3.2.3. *lef-8* Primeri ile Yapılan RT-PCR

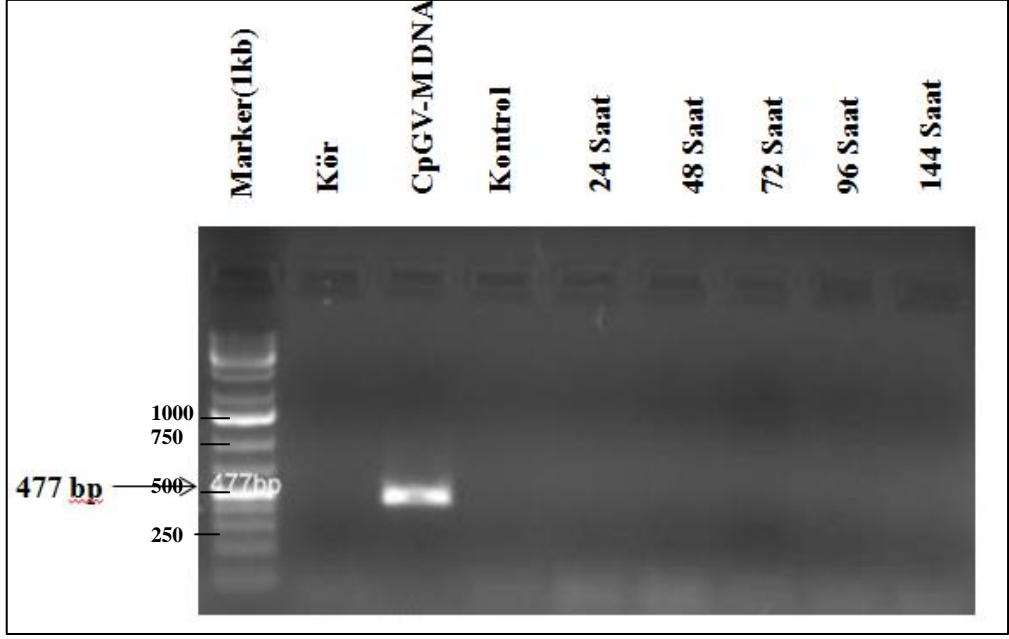
*lef-8* (geç ekspresyon faktör) primeri (Fwd 5'-CTTCCGTCTTCAACCTACTGT-3' / Rev 5'-CGCGCCCGTGGTGATAAAAC-3') kullanılarak yapılan RT-PCR sonucunda 470 bp uzunluğunda bantlar görülmedi (Şekil 16). *lef-8* geninin de transkripte olmadığı görüldü.



Şekil 16. *lef-8* primeri ile yapılan RT-PCR sonucu.

### 3.3.2.4. *mcp* Primeri ile Yapılan RT-PCR

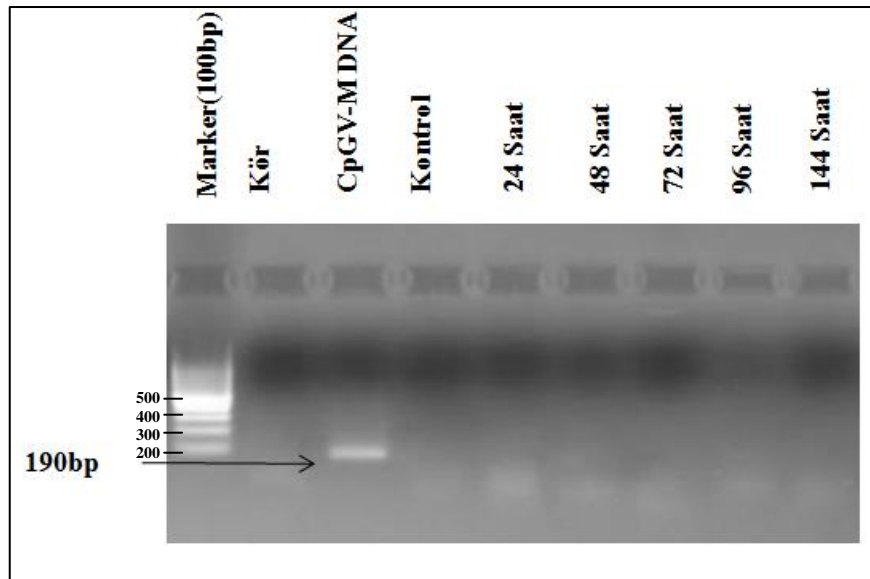
*mcp* primeri (Fwd 5'-TCCGGCAAGGACAATCGCTC-3' / Rev 5'-TGCGAGGTCAAACCCTCTG-3') ile yapılan RT-PCR sonucu 477 bp uzunluğunda bantlar görülmedi (Şekil 17). Bu genin de transkripte olmadığı bulundu.



Şekil 17. *mcp* primeri ile yapılan RT-PCR sonucu.

### 3.3.2.5. *f-protein* Primeri ile Yapılan RT-PCR

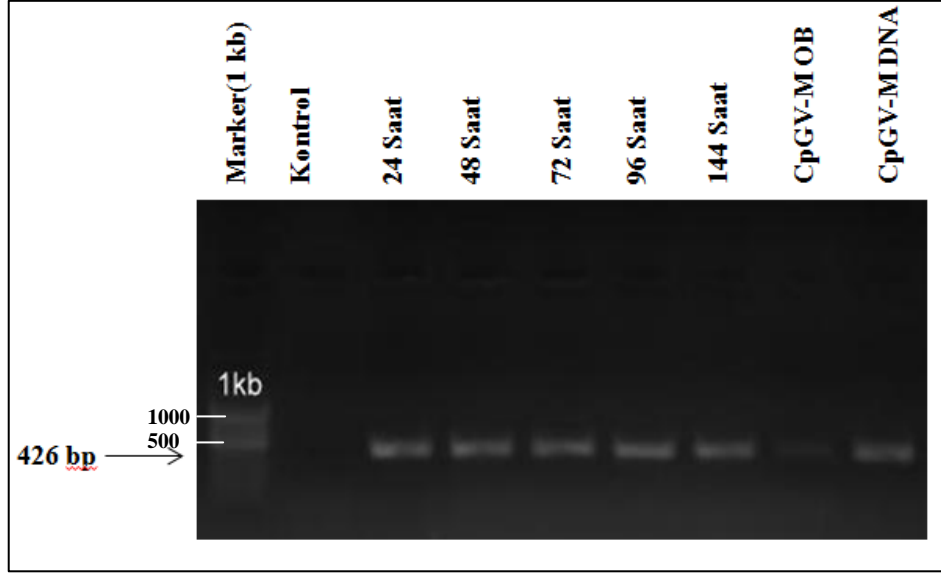
*f-protein* primeri (Fwd 5'-GACAGGGACGCAGCACTACT-3' / Rev 5'-TCCGCCCACTGTCCTTGAT-3') ile yapılan RT-PCR sonucunda 190 bp uzunluğunda bantlar görülmedi (Şekil 18). Bu genin transkripte olmadığı belirlendi.



Şekil 18. *f-protein* primeri ile yapılan RT-PCR sonucu.

### 3.3.2.6. *granülin* Primeri ile Yapılan RT-PCR

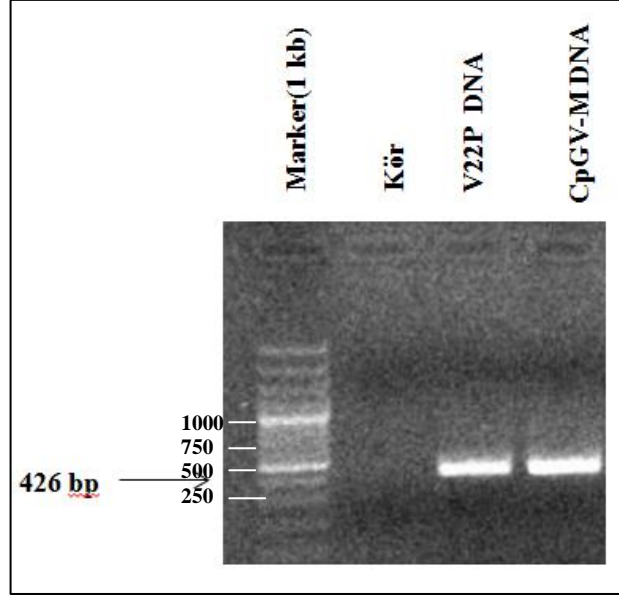
*granülin* primeri ile (Fwd 5'-TCAGCTCAACGCTCAACTC-3' /Rev 5'-GACAAATTGTCAGTTCAGTACTAGT-3') yapılan RT-PCR sonucunda 426 bp uzunluğunda bantlar görüntülenmedi (Şekil 19). Geç gen olan *granülin* geninin 24. saatten itibaren transkript olduğu tespit edildi.



Şekil 19. *granülin* primeri ile yapılan RT-PCR sonucu.

### 3.4. *In vivo* Klonlama Sonuçları

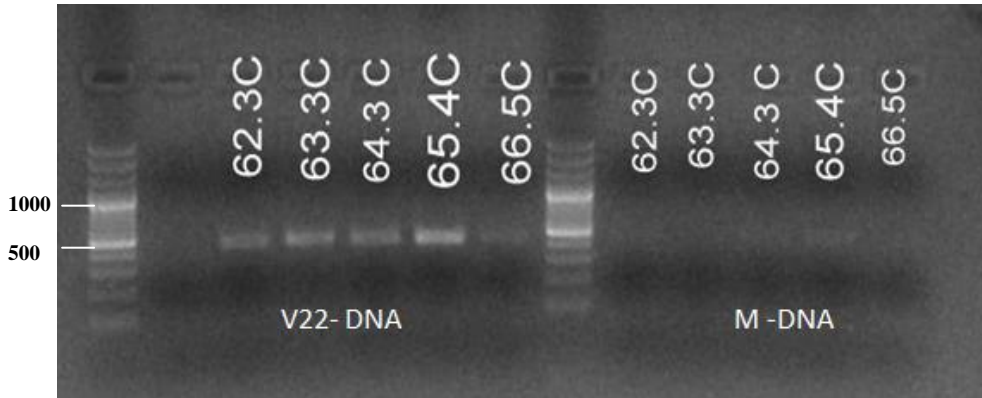
CpGV-V22 (Andermatt) örneği ilk önce L3 larvalar enfekte edilerek çoğaltıldı ve enfeksiyonun başarılı olup olmadığını belirlemek için temizlenen OB'lerden DNA izolasyonu (3 tekrarlı) yapıldı. DNA izolasyonundan sonra bu DNA'ların *granülin* primerleriyle (426 bp uzunluğunda) çoğaltılmış hali agaroz jel elektroforezinde görüntüldü (Şekil 20). CpGV-M DNA'ları pozitif kontrol olarak kullanıldı. Jelde 426 bp uzunluğunda DNA bantlarının görülmesiyle DNA izolasyonunun başarılı olduğu anlaşıldı.



Şekil 20. CpGV-V22 OB'lerinden izole edilen DNA'ların görüntülenmesi.

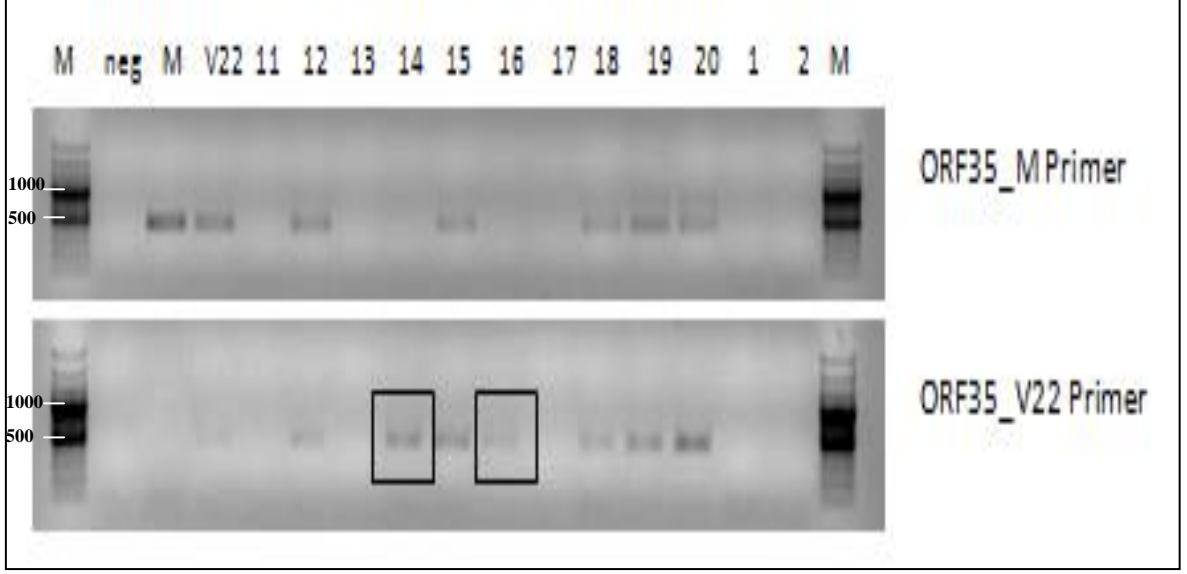
Andermatt Biocontrol firmasından gelen CpGV-V22'nin çoğaltılıp enfeksiyonunun başarılı olduğu kontrol edildikten sonra yeni üretilen stok aktivite testine tabi tutuldu.

Elde edilen yeni CpGV-V22 stoğu (CpGV-M ve CpGV-V22 izolatu karışımıdır) aynı zamanda *in vivo* klonlama yöntemiyle virüs izolatlarına ayrılmaya çalışıldı. *In vivo* klonlama yöntemiyle enfekte edilen larvalardan DNA izolasyonu yapıldıktan sonra bu izolatlar spesifik ORF35 primerleri kullanılarak PCR yapıldı. Bu primerlere uygun DNA erime sıcaklığının belirlenmesi için gradiyent PCR yapıldı. Bu PCR sonucunda CpGV-V22 ve CpGV-M DNA'sı için uygun erime sıcaklığı 65.4 °C olarak belirlendi (Şekil 21).



Şekil 21. Yeni CpGV-V22 stoğu ve CpGV-M stoğundan izole edilen DNA ile ORF35-M primerleri kullanılarak yapılan gradient PCR sonuçları.

Uygun primer bağlanma sıcaklıkları belirlendikten sonra izole edilen DNA'lardan spesifik primer olan ORF35 kullanılarak uygun koşullarda PCR yapıldı. 14 ve 16 olarak numaralandırılan stokların DNA'sının ORF35 primerleriyle yapılan PCR sonucunda ORF35-V22 primerine spesifik bantlar görüldü fakat ORF35-M primerine spesifik bantlar görülmedi. Bu sayede stoklarda saf CpGV-V22 suşunun bulunduğu belirlendi. (Şekil 22).



Şekil 22. *In vivo* klonlama ile enfekte edilen larvalardan izole edilen DNA'ların ORF35 primerleri ile yapılan PCR sonuçları.

#### 4. TARTIŞMA

Dünya nüfusu ekonomik gelişmeye bağlı olarak gün geçtikçe artmaktadır. Hızla artan dünya nüfusu 1900 yılında 1,5 milyarken 2000 yılında dört katlık bir artış göstererek 6 milyar olmuştur. Son yıllarda da ise hızla artan dünya nüfusu 7 milyarı geçmiştir. Bu hızlı nüfus artışına paralel olarak gıda arzının da artması gerekmektedir. Bu nedenle tarımda ekonomik kayba yol açan zararlılarla kısa sürede etkili biçimde mücadele edilmesi gereği ortadadır.

Gıda arzının artışı ve sürdürülebilirliği, bitkisel üretimin artması ve sürdürülebilir kılınması ile mümkündür. Bu durumda bitkisel üretimde hastalık ve zararlılardan kaynaklanan %30-35 oranındaki kaybın azaltılması için yapılan çalışmalar büyük önem arz etmektedir.

Günümüzde tarım ve ormancılıkta büyük zararlara sebep olan böceklerle mücadelede, çevre ve insanlar üzerinde kimyasal sentetiklerin olumsuz etkilerinden dolayı sentetik kimyasallar yerine biyolojik mücadele etmenlerinin kullanımı artmaktadır. Bu etmenler arasında en yaygın olanları entomopatojen organizmalardır. Bunlar; virüsler, bakteriler, protozoonlar, funguslar ve nematodlardır. Bu patojenlerin biyolojik mücadelede zararlı böcekler üzerinde kullanımına bakıldığında dünyada çok araştırmalara konu olmasına rağmen, ülkemizde bununla ilgili çalışmalar çok sınırlıdır. Bunlar arasında böcek patojeni olarak etkinliğinin yüksek olduğu bilinen bakülovirüslerin kullanımını araştıran çalışmalar biyolojik mücadele alanındaki eksikliklerin giderilmesi için önem oluşturmaktadır.

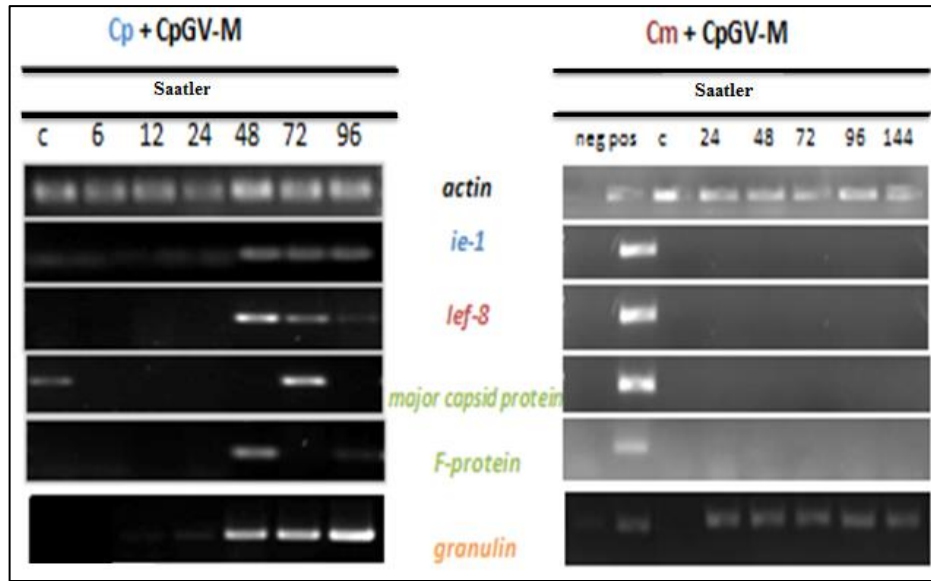
Transkriptom analizi, herhangi bir organizmada kodlayıcı ya da kodlayıcı olmayan tüm transkripsiyonal aktivitelerin karakterizasyonunu içerir. Yeni nesil RNA sekanslama metodları transkriptomun keşfiyle devrim yaratmıştır.

Bu çalışmada şeftali bitkisinin önemli zararlılarından biri olan, Doğu meyve güvesine (*Cydia molesta*) karşı kullanılacak insektisidal aktivitesi yüksek, güvenilir mücadele etmenlerinin geliştirilmesi yolunda yeni adımlar atıldı.

Jehle ve Eberle (2010) tarafından yapılan CpGV-V22'nin (Andermatt) enfektivitesini belirlemek için *Cydia molesta* ile kurulan biyotest çalışmalarında virülans etkisi yüksek gözlemlendi. Bu çalışmada CpGV-V22 (Andermatt) stoğunun biyotestler için yeterli olmamasından dolayı önce CpGV-V22 izolatu (Andermatt) C.

*molesta* larvalarında tekrar çoğaltıldı ve çoğaltılan yeni stoğun insektisidal aktivitesi tespit edildi. Yeni üretilen CpGV-V22 stoğu ile Andermatt'a ait olan stoğun insektisidal aktivitesi yakın bulundu. Jehle ve Eberle (2010) tarafından benzer bir çalışma farklı bir tür olan *C. pomonella* üzerinde aynı virüsle (CpGV-V22) yapıldı. Araştırmacıların çalışmasında virüsün aktivitesi yüksek bulundu.

Yine benzer bir çalışma Lacey vd. (2005) tarafından ticari CpGV izolatı *Grapholita molesta* ve *C. pomonella* üzerinde test edildi. *G. molesta*'nın CpGV'ye duyarlı olduğu, fakat bu virüs izolatının etkinliğinin *C. pomonella*'da *G. molesta*'ya göre daha yüksek olduğu bulundu. Bizim çalışmamızda da CpGV-M izolatının *C. molesta* üzerindeki etkinliği CpGV-V22 izolatına göre daha düşük bulundu. Benzer şekilde Jehle ve Eberle (2010)'nin çalışmasına göre, CpGV-M izolatının *C. pomonella* üzerindeki etkinliği CpGV-V22 izolatından biraz daha yüksek bulundu.



Şekil 20. CpGV-M ile enfekte *C. pomonella* (Cp) ve *C. molesta* (Cm) larvalarından izole edilen RNA'lardan yapılan RT-PCR sonuçlarının karşılaştırılması.

Schneider vd. (2011) tarafından yapılan çalışmaya göre, RT-PCR sonuçlarında, en erken gen olan *ie-1*'in 12. ve *lef-8*'in 48. saatlerde transkript başlangıcı gözlemlendi. *f-protein* geni ve *granülün* geninin de beklenildiği gibi 48. saatten sonra transkripsiyona başladığı belirlendi. Bu çalışmada CpGV-M için erken ve geç genlerinin (*aktin*, *ie-1*, *lef-8*, *mcp*, *f-*

*protein*) transkriptte olmadığı görüldü. Fakat, sürpriz bir şekilde geç gen olan *granülinin* 24. saatte transkript olduğu tespit edildi (Şekil 20).

Smith ve Crook (1988)'un yaptığı çalışmada *in vivo* klonlama yöntemi ile bakülovirüs genotipi belirlendi. Bu yöntem karışık yaban tip bakülovirüs süspansiyonlarından bireysel genotiplerin izolasyonu için geliştirildi.

Smith ve Crook (1993)'un çalışmasına göre, *Pieris brassicae*'ya *in vivo* klonlama yöntemiyle inoküle edilen granülovirüslerin genotipleri belirlendi.

Crook vd.(1985)'nin çalışmasında bir CpGV stoğunda genetik heterojenite gösterdi. Bu stoktaki heterojeniteyi gidermek için *in vivo* klonlama yöntemini kullanarak stoğu üç farklı izolata ayırdı. Yeni belirlenen izolatların çoğaltılması için tekrardan *in vivo* klonlama yöntemine başvurdu.

Bakülovirüs izolatlarının genotipik varyasyonlarının belirlenmesinde *in vivo* klonlama yönteminin kullanıldığı diğer çalışmalar, *Autographa californica* NPV (AcNPV) (Smith ve Summers, 1979), *Heliothis zea* tek kapsid NPV (HzSNPV) (Gettig ve McCarthy, 1982), *Heliothis zea* çoklu kapsid NPV (HzMNPV) (Williams ve Payne, 1984), *Spodoptera frugiperda* çoklu NPV (SfMNPV) (Muruniak vd., 1984), *Pieris rapae* GV (PrGV) (Crook, 1981 a, b)'dir.

Biz de bu çalışmada, Eberle ve Jehle (yayınlanmamış)'nin yaptığı araştırmalarda farklı genotiplerin karışımı şeklinde belirlediği CpGV-V22 (Andermatt) stoğunun, *in vivo* klonlama yöntemiyle farklı genotiplerine ayrılmasını gerçekleştirdik. Böylece bu stoktan elde edilen CpGV-V22 izolatının gelecek çalışmalarda saf olarak çoğaltılmasına imkan sağlandı.



## 5. SONUÇLAR

Bu çalışma sonucunda *Cydia pomonella* granulozis virüsünün (CpGV-M) *Cydia molesta* üzerindeki enfektivitesinin düşük olduğu belirlenmiştir. Diğer bir virüs karışımı olan CpGV-V22 stoğunun *C. molesta* üzerindeki enfektivitesi CpGV-M'den yüksek olduğu yapılan biyotest çalışmaları sonucunda tespit edilmiştir.

CpGV-M izolatına spesifik primerler (*aktin*, *ie-1*, *lef-8*, *mcp*, *f-protein*, *granülin*) kullanılarak bu genlerin CpGV-M ile enfekte edilen *C. molesta*'da transkript olup olmadığı belirlendi.

Bu genlerden houskeeping gen olan *aktinin* tüm zaman dilimlerinde transkript olduğu belirlendi. Bu cDNA sentezinin başarılı olduğunu göstermektedir.

*ie-1*, *lef-8*, *mcp* ve *f-protein* genlerinin hiçbir zaman diliminde transkript olmadığı gözlemlendi.

Geç gen olan *granülinin* ise 24. saatten itibaren transkript olduğu tespit edildi.

*İn vivo* klonlama yöntemiyle enfekte edilen larvalardan DNA izolasyonu yapıldıktan sonra bu izolatlara spesifik ORF35 primerleri kullanılarak PCR yapıldı. Bu primerlere uygun DNA erime sıcaklığının belirlenmesi için gradiyent PCR yapıldı. Bu PCR sonucunda CpGV-V22 ve CpGV-M DNA'sı için uygun erime sıcaklığı 65.4 °C olarak belirlendi.

Yapılan *in vivo* klonlama çalışmaları sonucunda elde edilen yeni CpGV-V22 stoğu (CpGV-M ve CpGV-V22 izolatı karışımıdır) virüs izolatlarına ayrıldı.

## 5. ÖNERİLER

Bu çalışmada, *Cydia pomonella* granülovirüsünün farklı izolatlarının şeftali bitkisine zarar veren Doğu meyve güvesine (*Cydia molesta*) karşı etkinliğini araştırmak amacıyla biyotestler ve transkriptom analizler yapıldı. Çalışma sonuçlarından hareketle, gelecek çalışmalara yönelik olarak aşağıdaki hususlar belirlenmiştir.

1. Bu çalışmada kültür ortamlarında yetiştirilen *C. molesta*'lar kullanıldı. Buna ek olarak farklı coğrafik alanlardan toplanan larvalar üzerinde bu izolatların biyotestleri yapılabilir.
2. Farklı coğrafik alanlardan toplanan *C. molesta*'larda yeni viürs taraması yapılabilir.
3. Tespit edilen yeni izolatların transkriptom analizleri gerçekleştirilebilir.
4. Bu çalışmada CpGV-V22 karışık virüs stoğundan *in vivo* klonlama ile başarıyla ayrılan CpGV-V22 izolatu çoğaltılarak *C. molesta* üzerinde transkriptomal analizleri ve biyotestleri yapılabilir.
5. Bu ayrılan CpGV-V22 izolatının *Cydia* cinsine ait diğer türler üzerinde de insektsidal aktivitesi yapılabilir.
6. *In vivo* klonlama için kullanılan ORF35 primerleri yerine bu iki izolata spesifikliği daha yüksek olan yeni primerler dizayn edilebilir.

## KAYNAKLAR

- Abbott, W.S., 1925. A method of computing of effectiveness of on insecticide, Journal of Economic Entomology, 18, 265–267.
- Ackermann, H.W. ve Smirnoff, W.A. 1983. A morphological investigation of 23 baculoviruses. J. Invertebr. Pathol. 41:269-280.
- Adams, J.R. ve McClintock, J.T., 1991. Baculoviridae, Nuclear Polyhedrosis Viruses, Part 1 Nuclear Polyhedrosis Viruses of Insects, 87-204 pp., Adams J.R. and Bonami, J.R. (Eds.), In “Atlas of Invertebrate Viruses” CRC Press, Boca Raton, FL.
- Anonim, 2008. Şeftali Hastalık ve Zararlıları ile Mücadele, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Bitki Koruma Hizmetleri Dairesi Başkanlığı, Ankara, 60 s.
- Anonim, 2009. Orta Öğretim Projesi Tarım Teknolojileri Sert Çekirdekli Meyve Yetiştiriciliği, Millî Eğitim Bakanlığı, Ankara, 74s.
- Arends, H.M. ve Jehle, J.A., 2006. Sequence analysis and quantification of transposase cDNAs of transposon TCp3.2 in *Cydia pomonella* larvae, Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 63,135-145.
- Arif, B. ve Kurstak, E., 1991. Viruses of Invertebrates, Kurstak, E. (Ed.), Marcel Dekker.
- Arif, B., 1986. The Structure of Viral Genome, 21, Doerfler, W. And Bohm, P., The Biology of Baculoviruses, Berlin.
- Barkova, K., 2011. Molekulare Charakterisierung verschiedener Isolate des *Cydia pomonella* Granulovirus (CpGV) und deren Wirkung gegen *Cydia molesta*, Yüksek Lisans Tezi, Julius Kühn-Institut, Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Darmstadt.
- Beard, C., Amand S.T. ve Astell, C.R. 1989. Transient expression of B19 parvovirus gene products in COS-7 transfected with B19-SV40 hybrid vectors. Virology 172, 659-664.
- Beegle, C.C. ve Yamamoto, T., 1992. Invitation Paper (C.P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner Research and Development, Canadian Entomologist, 124, 587- 616.
- Beers, E.H., Brunner, J.F., Willet, M.J. ve Warner, G.M., 1993. Orchard pest management: A resource book for the Pacific Northwest, The Good Fruit Grower, Yakima, Washington.
- Bender, R. ve Lange, S., 2007. Was ist der p-wert? Dtsch Med Wochenschr, 132, 15-16.

- Bilimoria, S.L., 1991. The biology of nuclear polyhedrosis viruses, 1-72 p., Edouard, K. (ed.), Viruses of Invertebrates, New York, Marcel Dekker, Inc.
- Blissard, G.W. ve Rohrman, G.F. 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. Ann. Rev. Entomol. 35, 127-155.
- 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.), 1-149, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Burak, M., Ergun, M.E. ve Pezikoglu, F., 2002. Avrupa Birliği Ülkelerinde Sert Çekirdekli Meyve Türleri Tarımı ve Yakın Gelecekte Beklenen Gelişmeler, Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü, Yalova.
- Burgess, H.D., 1981. Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980, Academic Press, New York, 949 pp.
- Canıhoş, E. ve Öztürk, N., 2003. Mersin ili şeftali bahçelerinde entegre mücadele uygulamaları ve eğitim çalışmaları, Türkiye IV. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi Bildirileri, Eylül, Antalya, Bildiriler Kitabı: 539-541.
- Cravedi, P., 2000. Integrated peach production in Italy: Objectives and criteria. Pflanzenschutz Nachrichten Bayer, 53, 2-3, 177-197.
- Crook, N.E., 1981a. A comparison of the granulosis viruses from *Pieris brassicae* and *Pieris rapae*, Virology, 115, 173-81.
- Crook, N.E., 1981b. Genetic variability and virulence characteristics of granulosis viruses isolated from *Pieris spp.* Abstracts, 5th International congress of Virology, August Strasbourg, France, Bildiriler Kitabı: 291.
- Crook, N.E., Spencer, R.A., Payne, C.C. ve Leisy, D.J. 1985. Variation in *Cydia pomonella* granulosis virus isolates and physical maps of the DNA from three variants, Journal of General Virology, 66, 2423-2430.
- Cunningham, J.C., 1995. Baculoviruses as microbial insecticides, In 261–292 pp., Reuveni, R (Ed.), In: "Novel Approaches to Integrated Pest Management" Lewis, Boca Raton, FL.
- Demir, İ., 2004. *Hyphantria cunea* nükleopolihedrovirüs'ünün *Spodoptera frugiperda* ve *Lymantria dispar* Hücre Kùltürlerinde Replikasyonunun Karşılaştırılması, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Demirbağ, Z. ve Beldüz, A.O., 1997. Baculovirüs'ün Biyolojik Mücadeledeki Önemi, Kükem Dergisi, 20, 1, 49-58.
- Demirbağ, Z., Nalçacıoğlu, R., Katı, H., Demir, İ., Sezen, K. ve Ertürk, Ö., 2008. Entomopatojenler ve Biyolojik Mücadele, Esen Ofset Matbaacılık, Trabzon.
- DİE, 2003. T.C. Devlet İstatistik Enstitüsü, Tarımsal Yapı ve Üretim 2000, Ankara.

- Eberle, K., 2010. Novel isolates of *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV): deciphering the molecular mechanism for overcoming CpGV resistance in codling moth (*Cydia pomonella*), Dissertation, JGU-Mainz.
- Ecevit, O., 1988. Zirai Mücadele İlaçları ve Çevreye Olan Etkileri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları, 27, Samsun.
- Entwistle, P.F. ve Evans, H.F. 1985. Viral Control. In "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology" (L. I. Gilbert and G. A. Kerkut, Eds.), pp. 347–412. Pergamon Press, Oxford.
- Eraltan, F.M., 2005. Şeftalinin Mekanik Özellikleri Üzerine Çeşit ve Depolama Süresi Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 39s.
- Erbaş, Z., 2012. Trabzon Yöresinden Entomopatojen Nematodların İzolasyonu, Karakterizasyonu ve *Melolontha melolontha* Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Ergüden T.M., Demir, T. ve Zümreoğlu, A., 1999. Ege Bölgesi'nde şeftali bahçelerinde entegre mücadele araştırma, uygulama ve eğitim projesi (Sonuç raporu), T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Bornova Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü, İzmir.
- FAO, 2009. Fao database internet sitesi, [www.fao.org](http://www.fao.org).
- Faria, M.R.D. ve Wraight, S.P., 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types, Biological Control, 43, 237-256.
- Finney, D.J., 1971. Probit Analysis, Cambridge University Press, Cambridge 3rd edition.
- Fuxa, J. R. 1991. Insect control with baculoviruses. Biotech. Adv. 9: 425-442.
- Gettig, R.R. ve McCarthy, W.J., 1982. Genotypic variation among wild isolates of *Heliothis spp.* nuclear polyhedrosis viruses from different geographical regions, Virology, 117, 245-252.
- 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.), 229-247, CAB International Publishing.
- Goodwin, R.H., Vaughn J.L. ve Louloudes S.J. 1973. Baculovirus infections in noctuid cell lines. Int. Colloq. Insect Pathol. Microb. Contrib., 5, 22.

- Granados, R.R. ve Williams K.A. 1986. *In vivo* infection and replication of baculoviruses, pp. 89-108. In R. R. Granados and B. A. Federici [eds.], *Biology of baculoviruses*, vol. 1. CRC, Boca Raton, FL.
- Grassi, S. ve Deseö, K.V., 1984. Distribution of *Bacillus thuringiensis* Berl. and prospects of using it in plant protection, *Atti Giornate Fitopatologiche* 2, 425-433 (in Italian), *Review of Applied Entomology* 73, 361.
- Gröner, A. 1986. Specificity and safety of baculoviruses, Vol. II, 177-202 pp., Granados, R.R. and Federici B.A. (Eds.), In: *The Biology of Baculoviruses, Practical Application for Insect Control*, CRC Press, ISBN 0849359864, Boca Raton, FL, USA.
- Günaydın, T. ve Efe, E., 1997. Marmara Bölgesi şeftali bahçelerinde zararlı ve yararlı türlerin tespit edilmesi, Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü, Bilimsel Araştırma ve İncelemeler, Yayın No: 106s.
- Gür, İ., 2011. Şeftali yetiştiriciliği, Meyvecilik Araştırma İstasyonu Müdürlüğü, Yayın No: 8.
- 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.
- Hamm, T.E., 1984. Ninety day inhalation toxicity study of nitrobenzene in F-344 rats, and CD rats and B6C3F1 mice, Chemical Industry Institute of Technology, Research Triangle Park, NC.
- Hannay, C. L., 1953. Crystalline Inclusions in Aerobic Spore-forming Bacteria, *Nature*, 172, 4387, 1004.
- Hantaş, C., Kaplan, C., Öztürk, N., Güven, B., Kodan, M., Turanlı, T., Veliöğlu, A.S., Erdoğan, C., Caner, Ö.K., Karataş, A. vd., 2011. Şeftali Entegre Mücadele Teknik Talimatı, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Bitki Sağlığı Araştırmaları Daire Başkanlığı, Ankara.
- Harper, J.D., 1987. Applied epizootiology: microbial control of insect, 473 pp, Fuxa, J.R. ve Tanada, Y. (Eds), *Epizootiology of Insect Diseases*, Wiley & Sons, New York.
- Hazır, A. ve Ulusoy, M.R., 2008. Doğu Akdeniz Bölgesi Şeftali ve Nektarinlerde Zararlı Türler ile Parazitoit ve Predatörlerin Saptanması, Önemli Zararlıların Popülasyon Gelişmesi ve Mücadelede Kullanılan Bazı Pestisitlerin *Chilocorus bipustulatus* L. (Coleoptera: Coccinellidae)'a Etkisi, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 145s.
- Herker, M., Kleefeldt, U. ve Stephan, D., 2010. Comparison of formulations of entomopathogenic fungi for treatment of artificial hideouts for biocontrol of *Cydia pomonella* and *Cydia funebrana*, 14th International Conference on Organic Fruit-Growing, Proceedings to the Conference from February, 22 to February, 24 at Hohenheim/Germany, 149-155.

- Hill, D.S., 1987. *Agricultural Insect Pests of Temperate Regions and Their Control*, Cambridge University Press, Cambridge, 659 pp.
- Hoffman, M.P. ve Frodsham, A.C., 1993. *Natural Enemies of Vegetable Insect Pests*, Cooperative Extension, 63, Cornell University, Ithaca.
- Hu, Z., Luijckx, T., Van Dinten, L.C., Van Oers, M.M., Hajos, P.J., Bianchi, F.J.J.A., Van Lent, J.W., Zuidema, M.D. ve Vlak, J.M. 1999. Specificity of polyhedrin in the generation of baculovirus occlusion bodies. J. Gen. Virol. 80, 1045-1053.
- Huber, J. ve Hugues, P.R., 1984. Quantitative bioassay in insect pathology, Bull Entomol. Soc. Am., 30, 31-34.
- Huber, J., 1998. Western Europe, 201-215 pp., In: Hunter-Fujita, F.R., Entwistle, P.F., Evans, H.F., and Crook, N.E. (Eds), *Insect viruses and pest management*, Wiley & Sons.
- Hunter-Fujita, F.R., Entwistle, P.F., Evans, H.F. ve Crook, N.E., 1998. *Insect Viruses and Pest Management*, John Wiley & Sons, New York.
- Ivaldi-Sender, C., 1974. Technique simples pour elevage permanent de la tordeuse orientale, *Grapholita molesta* (Lep. Tortricidae), sur milieu artificiel. Ann. Zool. Ecol. Anim, 6, 337-343.
- Jehle, J.A. ve Eberle, K.E. 2010. Viren als nützliche Helfer im Pflanzenschutz, Forschungs/Report, 2, 14-17.
- Kalmakoff, J. ve Ward, V. 2003. *Baculoviruses*. University of Otago, Department of Microbiology.
- 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.
- Kılıç, M. ve Aykaç, M.K., 1989. Karadeniz Bölgesi Şeftali Bahçelerindeki Zararlılarla Mücadelenin Yönetimi Üzerinde Araştırmalar, Bitki Koruma Bülteni, 29, 3-4, 211-241.
- Kocaçevik, S., 2012. *Dendroctonus micans* (Kugelann)'tan İzole Edilen *Beauveria bassiana* (Balsamo)'nın Bazı Kabuk Böceklerinin Biyolojik Mücadelesinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Köseoğlu, E., 2006. Şeftali Sektör Araştırması, İstanbul Ticaret Odası, Avrupa Birliği ve Uluslararası İşbirliği Şubesi.
- Kunimi, Y., Fuxa J.R. ve Hammock B.D. 1996. Comparison of wild type and genetically engineered nuclear polyhedrosis viruses of *Autographa californica* for mortality, virus

- Küden, A.B. ve Küden, A., 2000. Şeftali Yetiştiriciliği, TÜBİTAK TARP Yayınları, Adana, 20s.
- Lacey L.A., Arthurs S.P. ve Headrick H., 2005. Comparative activity of the codling moth granulovirus against *Grapholita molesta* and *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae), J. Entomol. Soc. Brit. Columbia, 102, 79-80.
- Lacey, L.A. ve Kaya, H.A., 2000. Field Manuel of Techniques in Invertebrate Pathology, Kluwer Academic Publisher, Boston, 911 pp.
- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K. ve Vail, P., 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future?, Biological Control, 21, 230-248.
- Lacey, L.A., Vail, P.V. ve Hoffmann, D.F., 2002. Comparative activity of baculoviruses against the codling moth *Cydia pomonella* and three other tortricid pests of tree fruit, Journal of Invertebrate Pathology, 80, 64–68.
- Lacey L.A., Arthurs S.P. ve Headrick H., 2005. Comparative activity of the codling moth granulovirus against *Grapholita molesta* and *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae), J. Entomol. Soc. Brit. Columbia, 102, 79-80.
- Laird, M., Lacey L. A. ve Davidson E. W. 1990. Safety of microbial insecticides. CRC, Boca Raton, FL.
- Lipa, J.J., 1975. An Outline of Insect Pathology, Warsaw, Poland.
- 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, Annual Review of Entomology, 45, 287-306.
- Lua, L.H., Nielsen, L.K. ve Reid, S. 2003. Sensitivity of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus polyhedra to sodium dodecyl sulfate. Biological Control. Vol.26, ISSN 1049-9644, pp. 57-67.
- Maddox, J.V., 1987. Protozoan Diseases, In “Epizootiology of Insect Diseases” (Fuxa, J.R. ve Tanada, Y., Eds.), 417-452, Wiley, New York.
- Matthews, R.E.V. 1982. Classification and nomenclature of viruses. Intereirology 17, 52-54.
- Miller, L.K. 1997. The Baculoviruses Plenum Press, New York.
- Moscardi, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. Annu. Rev. Entomol. 44, 257-289.
- Moscardi, F. ve Sosa Gomez D.R. 2000. Microbial control of insect pests of soy bean. In “Field manual of techniques in invertabrate pathology: Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertabrate pests” (L. A. Lacey ve H. K. Kaya, Eds.), pp. 447-466. Kluwer Academic, Dordrecht.



- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. ve Erlich, H., 1992. Specific enzymatic amplifikation of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction, Biotechnology, 24, 17-27.
- Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A. ve Summers, M.D., 1995. Virus Taxonomoy- The Classification and Nomenclature of viruses: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Springer-Verlag, New York.
- Muruniak, J.E., Brown, S.E. ve Knudson, D.L., 1984). Physikal maps of SfMNPV baculovirus DNA and its genomic variants, Virology, 136, 221-234.
- Naser, W.L., Miltenburger, J.P., Harvey, J.P. ve Huger, A.M. 1984. In vitro replication of the *Cydia pomonella* (codling moth) granulosis virus. FEMS Microbiology Letters 24, 117-121.
- Natale, D., Mattiacci, L., Pasqualini, E. ve Dorn, S., 2004. Apple and peach fruit volatiles and the apple constituent butyl hexanoate attract female oriental fruit moth, *Cydia molesta*, in the laboratory, Journal of Applied Entomology, 128, 22-27.
- Oğurlu, İ., 2000. Biyolojik Mücadele, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın No: 8, Isparta.
- Öztemiz, S. ve Güllü, M., Özdemir, F., Fidan, H. ve Bülbül, F., 2008. Akdeniz Bölgesinde mısırdada entegre mücadele araştırma, uygulama ve eğitim çalışmaları üzerine araştırmalar, KSU Journal of Science and Engineering, 81, 11, 2, 2008.
- Öztürk, F., 2001. Malathion ve gamma radyasyonun kırma biti (*Tribolium confusum*)'nin gelişim evreleri üzerine etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Poinar, G.O., 1979. Nematodes for Biological Control of Insects, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Possee, R.D. 1993. Viral approaches for insect control, 99–112 pp., Kim, L. (Ed.), In “Advanced Engineered Pesticides” Dekker, New York.
- Ragni, A. ve Fridlender, B., 1999. Entomopathogenic Nematode Symbiotic Bacteria: A Novel Source of Insecticidal Toxins, 85-93, Virulence factors and secondary metabolites from symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, European Commission COST Action 819, Vienna, Austria, Entomopathogenic nematodes.
- Reis Fo, W., Nora, I. ve Melzer, R., 1988. Population dynamics of *Grapholita molesta*, Busk, 1916, and its adaptation on apple in South Brazil, Acta Horticulturae, 232, 204-208. replication and polyhedra production in *Trichoplusia ni* larvae. Entomol. Exp. App. 81, 251-257.
- Riga, E., Lacey, L.A., Guerra, N. ve Headrick, H.L. 2006. Control of the Oriental Fruit Moth, *Grapholita molesta*, Using Entomopathogenic Nematodes in Laboratory and Fruit Bin Assays, Journal of Nematology, 38, 1, 168-171.

- Rothschild, G.H.L. ve Vickers, R.A., 1991. Biology, ecology and control of the oriental fruit moth, In: van der Geest, L.P.S., Evenhuis, H.H. (Eds.), *Tortricid Pests, Their Biology, Natural Enemies and Control*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Schneider, D., Eberle, K.E. ve Jehle, J.A., 2011. Transcriptome analysis of the *Cydia pomonella* granulovirus, *Insect Pathogens and Entomopathogenic Nematodes*, IOBC/wprs Bulletin, 66, 391-394.
- Sheppard, R.F. ve Stairs, G.R., 1977. Dosage-mortality and time-mortality studies of a granulosis virus in a laboratory strain of the codling moth, *Laspeyresia pomonella*. Journal of invertebrate pathology, 29, 216-221.
- Siegel, J.P., Lacey, L.A. ve Vossbrinck, C.R., 2001. Impact of a North American isolate of the microsporidium *Nosema carpocapsae* on a laboratory population of the codling moth, *Cydia pomonella*, Journal of Invertebrate Pathology, 78, 4, 244-250.
- Smith, G.E. ve Summers, M.D. 1979. Restriktion maps of five *Autographa californica* MNPV variants *Trichoplusia ni* MNPV, and *Galleria mellonella* MNPV DNAs with endonucleases *Sma*I, *Kpn*I, *Bam*HI, *Sac*I, *Xho*I, and *Eco*RI, Journal of virology, 30, 828-838.
- Smith, G.E. ve Summers, M.D. 1982. DNA homology among subgroup A, B and C baculoviruses. Virology 123, 393-406.
- Smith, I.R.L. ve Crook, N.E., 1988. *In vivo* isolation of baculovirus genotypes, Virology, 166, 240-244.
- Smith, I.R.L. ve Crook, N.E., 1993. Characterization of new baculovirus genotypes arising from inoculation of *Pieris brassicae* with granuloviruses, Journal of General Virology, 74, 415-424.
- Sosa-gómez, D.R. ve Moscardi, F., 2001. Resistencia de lepidópteros a los nucleopoliedrovirus: el caso de *Anticarsia gemmatalis* - AgMNPV. 451-478 pp., Caballero, P., López-ferber, M. and Williams, T. (Eds.), In: *Los Baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. Navarra: Phytoma-España, Universidad Pública de Navarra.
- Steinhaus, E.A., 1949. *Principles of Insect Pathology*, McGraw-Hill, New York.
- Steinhaus, E.A., 1956. Microbial Control: The Emergence of an Idea, Journal of Agricultural Science, 26, 107-160.
- Strasser, H., Vey, A. ve Tariq, M. B., 2000. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? Biocontrol Science and Technology, 10, 717-735.
- Tanada, Y. ve Kaya, H.K., 1993. *Insect Pathology*, Academic Press, Inc., San Diego, 666 pp.

- Tanada, Y., 1964. A granulosis virus of the codling moth, *Carpocapsa pomonella* (L.) (*Olethreutidae*, *Lepidoptera*), Journal of Insect Pathology, 6, 378-380.
- Tanada, Y., ve Hess, R.T. 1991. Baculoviridae, Granulosis virus, 227–257 pp., Adams, J.R. and Bonami J.R. (Eds), In “Atlas of Invertebrate Viruses” CRC Press, Boca Raton, FL.
- Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, 2011. Şeftali – Nektarin, Hastalık ve Zararlıları ile Mücadele, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Trager, W. 1935. Cultivation of the virüs of grasserie in silkworm tissue cultures. J. Exptl. Med. 61, 501-513.
- Trevan, J.W., 1927. The error of determination of toxicity, Proceedings of the Royal Society (London), Series B 101, 483-514.
- TUİK, 2004. Türkiye İstatistik Kurumu, 2004 yılı verileri.
- TUİK, 2009, Türkiye İstatistik Kurumu, 2009 yılı verileri.
- TUİK, 2011. Tarım İstatistikleri (Bitkisel üretim istatistikleri, Bitkisel ürünler denge tabloları).
- URL-1: <http://www.derszamani.net/biyolojik-mucadele-nedir.html>. 28 Haziran 2013.
- URL-2: <http://www.tarimsitesi.net/urun-detay.asp?id=701>. 28 Haziran 2013.
- URL-3: <http://tr.wikipedia.org/wiki/%C5%9Eeftali>. 28 Haziran 2013.
- URL-4: <http://www.etarim.net/bilgi-bankasi/bahce-bitkileri-notlari/seftali-prunus-persica-yetistiriciligi.html>. 28 Haziran 2013.
- URL-5: <http://forum.kanka.net/archive/index.php/t-789039.html>. 28 Haziran 2013.
- USDA, 2012. Stone Fruit: World Markets and Trade, Peach/Nectarine and Cherry: 2012/13 Forecast.
- Ünal, G., 1998. Zirai Mücadele İlaçları Toksikolojisi ve Çevre, Ankara Zirai Mücadele.
- Vail, P.V., Hostetter, D.L. ve Hoffmann, D.F., 1999. Development of the multi-nucleocapsid nucleopolyhedroviruses (MNPVs) infectious to loopers (Lepidoptera: Noctuidae: Plusiinae) as microbial control agents, Integrated Pest Management Review, 4, 231–257.
- Van Beek, N.A.M., Wood, H.A. ve Hughes, P.R. 1988. Quantitative aspects of nuclear polyhedrosis virüs infections in lepidopterous larvae: the döşe-survival time relationship. J. Invertebr. Pathol. 51, 58-63.

- Volkman, L.E., Blissard, G.W., Friesen, P., Keddie, B.A., Possee, R. Ve Theilmann, D.A. 1995. Family Baculoviridae. In *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses*, pp. 104-113. Edited by F. A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo & M. D. Summers. Vienna & New York : Springer-Verlag.
- Vural, N., 1996. Toksikoloji, Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi, No:73.
- Weiser, J., 1969. An Atlas of Insect Diseases, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague.
- Williams, C.F. ve Payne, C.C., 1984. The susceptibility of *Heliothis armigera* larvae to three nuclear polyhedrosis viruses, Annals of Applied Biology, 104, 405-412.

## ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Antalya’da doğdu. İlköğretimi Barbaros İlköğretim Okulu’nda bitirdi. Lise eğitimini Atatürk Lisesi’nde tamamladı. 2006-2007 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fatih Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliğinde lisans öğrenimine başladı. 2011 yılında mezun oldu. 2011-2012 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 2012-2013 yılında Almanya’da Jülius-Kühn Enstitüsünde yüksek lisans tez çalışmalarını tamamladı. İngilizce ve Almanca bilmektedir.