

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BIYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***RİCANİA SİMULANS*'İN BAKTERİYAL MÜCADELE ETMENİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Biyolog Feyza ALEV**

**MAYIS 2014**

**TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***RİCANIA SIMULANS*'İN BAKTERİYAL MÜCADELE ETMENİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**Biyolog Feyza ALEV**

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

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 02/05/2014**  
**Tezin Savunma Tarihi : 26/05/2014**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Kazım SEZEN**

**Trabzon 2014**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Biyoloji Anabilim Dalında**

**Feyza ALEV tarafından hazırlanan**

***RİCANİA SİMULANS*'İN BAKTERİYAL MÜCADELE ETMENİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 29/04 /2014 gün ve 1551 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

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

**Üye : Prof. Dr. Mahmut EROĞLU .....**

**Üye: : Prof.Dr. Kazım SEZEN .....**

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

“*Ricania simulans*’ın bakteriyal mücadele etmeninin araştırılması” isimli bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Kazım SEZEN’e, tezin değerlendirilmesi ve geliştirilmesinde yardımcı olan değerli jüri üyeleri hocalarıma, laboratuvarında maddi ve manevi imkanlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, laboratuvar çalışmalarım sırasında göstermiş oldukları ilgiden ötürü Doç. Dr. Remziye Nalçacıoğlu, Doç. Dr. İsmail DEMİR, Yrd. Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU, Meriç DEMELİ, Arzu ÖZGEN, Aydın YEŞİLYURT, İslam YILDIZ’a teşekkür ederim. Bu tezin hazırlanması sırasında her türlü desteği sağlayan aileme minnet ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca, tez çalışmam süresince laboratuvar imkânlarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Hüseyin İNCEER’e teşekkür ederim.

Feyza ALEV  
Trabzon 2014

## TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Ricana simulans*’ın bakteriyal mücadele etmeninin araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Kazım SEZEN’in sorumluluğunda tamamladığımı, örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri 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. 26/05/2014

Feyza ALEV

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VIII
SUMMARY .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Çay Bitkisi ( <i>Camellia sinensis</i> ) .....	3
1.2.1. Dünya’da Çayın Önemi ve Gelişimi.....	4
1.2.2. Türkiye’de Çayın Önemi ve Gelişimi.....	6
1.3. <i>Ricania simulans</i> ’ın Sistematikteki Yeri .....	8
1.3.1. <i>Ricania simulans</i> ’ın Biyolojisi .....	8
1.3.1.1. Hayat Döngüsü .....	8
1.3.1.1.1. Yumurta Evresi .....	9
1.3.1.1.2. Nimf Evresi.....	10
1.3.1.1.3. Ergin Evresi .....	10
1.3.2. <i>Ricania simulans</i> ’ın Zararı ve Yayılışı .....	12
1.4. Zararlı Böceklerle Mücadele Yöntemleri .....	13
1.4.1. Kültürel Mücadele .....	14
1.4.2. Fiziksel Mücadele .....	14
1.4.3. Mekanik Mücadele .....	14
1.4.4. Kimyasal Mücadele .....	14
1.4.4.1. Kimyasal Mücadelenin Zararları .....	15
1.4.5. Biyoteknik Mücadele.....	17
1.4.6. Entegre Mücadele .....	17
1.4.7. Biyolojik Mücadele .....	17

1.4.7.1.	Biyolojik Mücadelede Kullanılan Etkin Gruplar.....	19
1.4.7.1.1.	Parazitoitler.....	19
1.4.7.1.2.	Predatörler.....	19
1.4.7.1.3.	Entomopatojenler.....	20
1.4.7.1.3.1.	Entomopatojenik Bakteriler.....	23
1.4.7.1.3.2.	<i>Bacillus thuringiensis</i> 'in Hedef Böceklerde Etki Mekanizması.....	25
1.4.8.	<i>Ricania simulans</i> 'a Karşı Yapılan Mücadele Yöntemleri .....	26
1.5.	Çalışmanın Amacı .....	28
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	29
2.1.	Örneklerin Toplanması .....	29
2.2.	Bakteri İzolasyonu ve Karakterizasyonu .....	29
2.2.1.	Saf Kültürlerin Hazırlanması ve Stoklanması .....	30
2.3.	Bakteriyal İzolatların Boyama ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi .....	30
2.3.1.	Gram Boyama .....	30
2.3.2.	Endospor Boyama .....	30
2.4.	Bakteriyal İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi .....	31
2.4.1.	Bakteriyal İzolatların Optimum Büyüme Sıcaklıklarının Belirlenmesi .....	31
2.4.2.	İzolatların NaCl İhtiyaçlarının Belirlenmesi .....	31
2.4.3.	İzolatların Büyüdüğü pH'ın Belirlenmesi .....	31
2.4.4.	Katalaz Testi .....	32
2.4.5.	Oksidaz Testi .....	32
2.4.6.	Nişasta Hidroliz Testi .....	32
2.4.7.	API Test Kitleri ile Bakteriyal İzolatların Tanımlanması .....	32
2.4.7.1.	API 20E Panel Test Sistemi.....	32
2.4.7.2.	API 50CHB Panel Test Sistemi .....	34
2.5.	Bakteriyal İzolatların Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi.....	36
2.5.1.	Genomik DNA İzolasyonu .....	36
2.5.2.	16S rDNA Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması .....	36
2.5.3.	16S rDNA Gen Bölgesinin pGEM-T Vektörüne Klonlanması.....	37
2.5.4.	Kompetent Hücre Hazırlanması .....	37
2.5.5.	16S rDNA Gen Bölgesinin Kompetent <i>E. coli</i> JM101'e Aktarımı .....	38
2.5.6.	Rekombinant Plazmidlerin İzolasyonu ve Restriksiyon Endonükleaz ( <i>EcoRI</i> ) ile Muamelesi .....	38

2.5.7.	Klonların İÇerdiği DNA Parçalarının Baz Dizilimlerinin Belirlenmesi .....	39
2.5.8.	Elde Edilen Baz Dizilerinin İncelenmesi .....	39
2.5.9.	Bakteriyal İzolatların <i>cry</i> Gen İçeriklerinin Belirlenmesi .....	39
2.6.	Bakteriyal İzolatların İsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi .....	40
2.6.1.	Bakteriyal Süspansiyonların Hazırlanması .....	40
2.6.2.	Bakteriyal İzolatların Böcekler Üzerindeki İsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi .....	40
3.	BULGULAR .....	42
3.1.	<i>Ricania simulans</i> Zararlısından Bakteri İzolasyonu .....	42
3.2.	Bakteriyal İzolatların Boyama ve Morfolojik Özellikleri .....	42
3.3.	Bakteriyal İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	43
3.3.1.	API 20 E ve API 50 CH Panel Test Sistemiyle Tespit Edilen Özellikler.....	46
3.4.	Bakteriyal İzolatların Moleküler Özellikleri .....	49
3.4.1.	16S rDNA Dizi Analizi Sonuçları .....	49
3.4.2.	Bakteriyal İzolatların <i>cry</i> Gen İçerikleri.....	51
3.5.	Bakteriyal İzolatların İsektisidal Etkileri.....	52
4.	TARTIŞMA .....	57
5.	SONUÇLAR.....	64
6.	ÖNERİLER.....	66
7.	KAYNAKLAR .....	67
8.	EKLER .....	76
ÖZGEÇMİŞ		



## Yüksek Lisans Tezi

### ÖZET

#### *RİCANİA SİMULANS*'IN BAKTERİYAL MÜCADELE ETMENİNİN ARAŞTIRILMASI

Feyza ALEV

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Kazım SEZEN  
2014, 75 Sayfa, 12 Sayfa Ek

*Ricania simulans* adlı böcek başta çay olmak üzere birçok sebze ve meyveye zarar verdiği bilinmektedir. *R. simulans*, ülkemizin Doğu Karadeniz bölgesinde yayılış gösteren bir zararlıdır. Dünyada Çin, Japonya ve Tayvan'da yayılış göstermektedir. *R. simulans* ağız yapısından dolayı bitkilerin öz suyunu emerek kurumalarına neden olmaktadır. Her türlü bitkiye yumurta bırakmaktadır. Zararlıya karşı sadece mekanik mücadele yapılmaktadır. Mekanik mücadele, *R. simulans*'ı kontrol altına almak için yetersiz kalmaktadır. Bu zararlıya karşı önemli bir mikrobiyal kontrol ajanı bulmak için, ilk olarak zararlıdan 16 adet bakteriyal izolat elde edildi ve bu izolatlardan morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler özellikleri belirlendi. Bu özelliklere göre *R. simulans*'dan elde edilen izolatlardan 9 tanesi tür seviyesinde, 7 tanesi cins seviyesinde tanımlandı. Bu sonuçlara göre Rs1 *Pseudomonas oleovorans*, Rs2, Rs3 ve Rs6 *Pseudomonas parafulva*, Rs4, Rs8, Rs10 ve Rs13 *Pseudomonas* sp., Rs5 ve Rs6 *Pantoea* sp., Rs9 *Microbacterium paraoxydans*, Rs11 *Bacillus* sp., Rs12 *Bacillus safensis*, Rs14 *Chryseobacterium indoltheticum*, Rs15 ve Rs16 ise *Bacillus thuringiensis* olarak tanımlandı. Bu izolatlardan insektisidal aktivitesi *R. simulans*'ın hem nimf hem ergin evresine karşı test edildi. Test sonuçlarına göre izolatlardan arasında nimf evresinde en yüksek insektisidal aktivite Rs4 nolu izolat tarafından %82 ile, ergin evresinde ise Rs16 nolu izolat tarafından %86 ile meydana getirildi. Bu sonuçlar Rs4 ve Rs16 nolu izolatlardan *R. simulans*'ın kontrolü için potansiyel bir biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus thuringiensis*, Bakteriyal flora, *Ricania simulans*, Mikrobiyal mücadele

Master Thesis

SUMMARY

DETERMINATION OF BACTERIAL CONTROL AGENTS OF *RICANIA SIMULANS*

Feyza ALEV

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Graduate Program  
Supervisor: Assoc. Prof. Kazım SEZEN  
2014, 75 Pages, 12 Pages Appendix

*Ricania simulans* damages on many vegetables and fruits, including tea. *R. simulans* is widespread through China, Japan and Taiwan in the world and in East Black Sea Region of Turkey. It damages the plants by sucking the nectar. Up to now, it has been controlled by mechanical methods only. This method is not sufficient enough to control *R. simulans*. In order to find a more effective and safer control agent against this pest, first of all, we determined 16 bacterial isolates from *R. simulans* and identified these isolates based on morphological, physiological, biochemical and molecular characteristics. Based on the identification tests, bacterial isolates were identified at species level for nine and at genus level for seven. According to these results, they were identified as *Pseudomonas oleovorans* (Rs1), *Pseudomonas parafulva* (Rs2, Rs3 and Rs6), *Pseudomonas* sp. (Rs4, Rs8, Rs10 and Rs13), *Pantoea* sp. (Rs5 and Rs6), *Microbacterium paraoxydans* (Rs9), *Bacillus* sp. (Rs11), *Bacillus safensis* (Rs12), *Chryseobacterium indoltheticum* (Rs14), *Bacillus thuringiensis* (Rs15 and Rs16). The insecticidal activities of these isolates were performed against both nimfs and adults of *R. simulans*. According to test results, the highest insecticidal activity was 82% for Rs4 isolate on nymphal stage and 86% for Rs16 isolate on adult stage of *R. simulans*. These results indicate that Rs4 and Rs16 isolates may be valuable as potential biological control agents for the control of *R. simulans*.

**Key Words:** *Bacillus thuringiensis*, Bacterial flora, *Ricania simulans*, microbial control

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1.	Karadeniz’de yetişen çaya ait görüntü .....	4
Şekil 2.	Ülkelerin çaylık alanlarına göre dağılımı .....	5
Şekil 3.	Dünya çay üretim miktarlarına göre ülkeler.....	5
Şekil 4.	Çaylık alanlara göre illerin dağılımı (%).....	7
Şekil 5.	Çay üzerinde <i>R. simulans</i> yumurtası .....	9
Şekil 6.	<i>R. simulans</i> yumurtasına ait mikroskopik görüntü .....	9
Şekil 7.	<i>R. simulans</i> nimfi.....	10
Şekil 8.	<i>R. simulans</i> ergininin mikroskopta boyunun ölçülmesi .....	11
Şekil 9.	<i>R. simulans</i> ergin kanatının mikroskopta boyunun ölçülmesi.....	11
Şekil 10.	<i>R. simulans</i> ergin dişi mikroskop görüntüsü .....	12
Şekil 11.	<i>R. simulans</i> ergin erkek mikroskop görüntüsü .....	12
Şekil 12.	a) <i>R. simulans</i> ’ın dünya üzerindeki yayılış alanlarını gösteren harita, b) <i>R. simulans</i> ’ın Türkiye üzerindeki yayılış alanlarını gösteren harita.....	13
Şekil 13.	Kristal proteinlerin etki mekanizması .....	26
Şekil 14.	Rs15 ve Rs16 numaralı izolatlara ait spor boyama görüntüleri .....	43
Şekil 15.	Nişasta hidroliz testi; soldaki negatif sonuç (Rs4), sağdaki pozitif sonuç (Rs15).....	45
Şekil 16.	Ekimleri yapılmış olan API testleri; a) API 20 E test panel sistemi, b) API 50 CHB test panel sistemi.....	46
Şekil 17.	Gram pozitif izolatların 16S rDNA dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı .....	51
Şekil 18.	Gram negatif izolatların 16S rDNA dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı .....	51
Şekil 19.	Tespit edilen <i>cry</i> genlerinin agaroz jel görüntüsü .....	52
Şekil 20.	Solda enfeksiyonlu nimf, BnSm ile enfekte <i>R. simulans</i> nimfi, sağda ise sağlıklı nimf görülmektedir .....	53
Şekil 21.	Solda enfeksiyonlu ergin, BnSm ile enfekte <i>R. simulans</i> nimfi, sağda ise sağlıklı ergin görülmektedir .....	53
Şekil 22.	Zararlıdan elde edilen izolatların <i>R. simulans</i> nimfleri üzerinde insektisidal etkisi .....	53
Şekil 23.	Zararlıdan elde edilen izolatların <i>R. simulans</i> erginleri üzerine insektisidal etkisi .....	55

Şekil 24. <i>B. thuringiensis</i> suşları (Xd3, MnD, BnBt) ve <i>S. marcescens</i> (BnSm) bakterilerinin <i>R. simulans</i> nimfleri üzerine insektisidal etkisi .....	55
Şekil 25. <i>B. thuringiensis</i> suşları (Xd3, MnD, BnBt) ve <i>S. marcescens</i> (BnSm) bakterilerinin <i>R. simulans</i> erginleri üzerindeki denemeleri.....	56

## TABLULAR DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1. API 20 E panel test sisteminin içerdiği testler.....	33
Tablo 2. API 50 CHB panel test sisteminin içerdiği testler .....	34
Tablo 3. PCR reaksiyonu ve programı.....	37
Tablo 4. Bakterilerin boyama ve morfolojik özellikleri .....	43
Tablo 5. Bakteriyal izolatların fizyolojik özellikleri .....	44
Tablo 6. pH testi .....	44
Tablo 7. Bakteriyal izolatların biyokimyasal özellikleri .....	46
Tablo 8. Bakteriyal izolatların API 20 E sonuçları.....	47
Tablo 9. Bakteriyal izolatların API 50 CHB sonuçları.....	48
Tablo 10. İzolatların 16S rDNA sekanslarının gen bankasındaki sıralarla karşılaştırmaları .....	49

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Dünya nüfusu hala hızla artmaktadır. 2050 yılına varıldığında dünya nüfusunun 9.5 milyara varacağı hesaplanmaktadır. Bu değerler dikkate alındığında bitkisel ve hayvansal gıda maddeleri ile su ürünleri üretiminin ne kadar önemli olduğu anlaşılmaktadır. Bugün şu ortamda bile önemli ölçüde gıda açlığı vardır. Son 35-40 yıl gibi bir dönemde, gıda maddeleri üretimi %35 dolayında artmıştır. Aynı dönemde, dünya nüfusu içerisindeki açlık veya yetersiz beslenme oranı %35'ten ancak %20'lere düşmüştür. Hala yaklaşık olarak dünyanın muhtelif yerlerinde 840 milyon insan açlık sorunu ile karşı karşıyadır. Bu insanların açlık duygusundan kurtulması için fazla yemeleri ve içmeleri yerine, daha kaliteli ve besleyici gıda maddeleri kullanabilmeleri için gerek üretim ve gerekse tüketim safhasında çevreye ve insana zarar vermeyecek tarımsal ürünleri üretmek üzerinde durulması gerekli bir alternatiftir (Er, 2009).

Hiç şüphesiz herhangi bir toplumun reel olarak en önemli sektörü ve faaliyet alanlarından biri tarım sektörüdür. Tarımsal faaliyetler insanın hayatı ile başlamış ve insan yaşadığı sürece sonsuza kadar devam edecektir. Hiç kuşku yoktur ki, tarım sektörü insanlık alemi ile beraber başlayıp çok değişik safhalardan geçerek, farklılaşıp ve gelişerek bugünkü seviyesine ulaşmıştır. Bilimin ve teknolojinin tarıma uygulanması tarımsal üretimin ve verimin daima artırılması, büyük insan kitlelerinin beslenmesi son derece önemlidir. Fakat bu iş yapılırken doğal kaynakları ve çevreyi de en iyi şekilde korumak, kullanmak ve değerlendirmek gereklidir. Yoksa doğanın vahşice ve biran evvel tüketircesine istismar edilmesi, açlığı önleyemediği gibi tabii kaynakları da tamamen yok etmekte ve doğadaki tabii dengeyi alt üst ederek ortadan kaldırmaktadır. Tüketimin kalitesinin artırılması, daha doğrusu üretilen gıda maddelerinin beslenme kalitesinin yükseltilerek açlığa engel olmaya çalışılması, besin sağlığı ve gıda güvenliğine önem verilmesi çok daha ehemmiyetlidir (Er, 2009).

Sürdürülebilir tarımda, toprak ve su kaynakları ile havayı kirletmeden toprak, bitki, hayvan, insan ve çevre sağlığını korumak organik tarımla mümkündür (Lampkin, 1994).

Toprak, tarımsal etkinliklerin temel ekonomik kaynağı olup, çiftçilerin en önemli sermayesidir (Bulut, 2006;Doğanay, 2007). Doğu Karadeniz Bölgesini oluşturan dağlık

kütlenin kuzey yamaçları üzerinde yağış ve buna bağlı olan aşırı yıkanma nedeniyle asit reaksiyon gösteren lateritik topraklar oluşmuştur. Asit reaksiyonlu topraklar, özellikle fındık, mısır ve çay bitkisinin yetişmesine uygun olup, Doğu Karadeniz bölgesinin tarımsal ürün deseninin oluşmasına katkı yapmıştır (Atalay, 2006).

Başta iklim özellikleri olmak üzere koşulların uygunluğu nedeniyle Türkiye, sanayi bitkileri tarımı için çok elverişli bir ülkedir (Doğanay, 1998). Ülkemizde tarımı yapılan çok çeşitli sanayi bitkilerinden birisini de çay bitkisi oluşturur (Doğanay, 2006). Çay Türkiye’de doğal yetişme koşullarını, özellikle Doğu Karadeniz Bölgesi kıyı kesimlerinde bulmuştur. Çok sayıda ailenin temel geçim kaynağı olan çay tarımı çözüm bekleyen bir takım sorunlarla karşı karşıyadır. Çay tarımı, tüm yıl boyunca bakım isteyen bir faaliyettir. Çay fidanlarının yetiştirilmesi, bahçelere taşınması, bahçelerin çapalanması, gübrenmesi, çay ağaçlarının budanması, zararlılarla mücadele ve çayın hasat edilmesi en önemli bakım faaliyetleridir (Doğanay, 2011). Avrupa Birliğine (AB) girme hazırlığında olan Türkiye, AB coğrafi hudutları içinde çay üreten ve dünyada kimyasal mücadeleye gerek duymayan doğal şartlarda çay yetiştiriciliği yapan tek ülkedir (Torun ve Taluğ, 2005).

Organik tarım, yanlış uygulamalar sonucu kaybolan doğadaki dengeyi yeniden kurmaya yöneliktir. Örneğin; tarım dışı organik ve ürün atıklarının kullanılması, kimyasal ilaçlar yerine hastalıklı, zararlı, yabancı otların mücadelesinde çevre dostu biyolojik mücadele yöntemi kapsamında doğal düşmanların kullanılması, toprak-bitki-hayvan-insan-çevre sağlığının korunmasında önemlidir (Öztemiz, 2008). Organik tarımda da biyolojik mücadele desteklenmeli ve doğal denge korunmalıdır.

Son yıllardaki nüfus artışına bağlı olarak gelişen besin yetersizliğinden dolayı, tüm ileri tarım tekniklerinden yararlanılarak birim alandan en yüksek düzeyde ürün elde etmek ve tüketime sunmak en önemli hedeflerden biri olmalıdır. Ancak tarımsal üretimde ekimden tüketime kadar geçen sürede ürün birtakım olumsuz faktörlerin etkisi altında kalmaktadır. Bunların başında hastalık ve zararlılar gelmektedir (Erdoğan, 2006).

Zararlıların neden olduğu ürün kaybını asgari seviyede tutmak için zararlı etmenlerle mücadele yapmak gerekmektedir. Mücadele yapılmadığı takdirde verim kaybı yıldan yıla ve bölgeden bölgeye değişmekle birlikte ortalama %60-80’e kadar ulaşabilmektedir (Anonim,1995).

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

Biyolojik mücadele, zararlı böceklerin yapmış olduğu zararları en aza indirmek için bu böceklerin tabii düşmanlarını kullanma olarak tanımlanabilir. Biyolojik mücadele de kullanılacak ajanların birçoğu doğadaki hastalıklı böceklerden izole edilir. Böceklerde hastalıklara neden olan mikroorganizmalar özelleşmiş doğal düşmanlar olarak kabul edilir (Burges ve Hussey, 1971).

Biyolojik mücadele, zararlı, hastalık ve yabancı otların diğer canlıların yardımıyla ekonomik zarar eşiğinin altında tutulmasıdır. Bir başka deyişle, doğada zararlı olan canlıları tamamen yok etmeden doğal dengeyi koruyucu, onarıcı ve destekleyici önlemler almaktır. Biyolojik mücadelede etkili olan doğal düşmanlar predatörler, parazitoidler ve patojenler olarak üç ana grupta toplanmıştır. Predatörler, zararlılar üzerinde doğrudan beslenerek etkili olan faydalı böceklerdir. Parazitoidler, yumurtalarını diğer bir böceğin ergin ya da ergin öncesi dönemleri dediğimiz yumurta, larva ve pupa gibi gelişme dönemleri içerisine bırakarak etkili olan genellikle arı grubundan faydalılardır. Patojenler ise diğer canlılarda olduğu gibi zararlılarda da hastalık yapan etmenlerdir. Hastalık yapan patojenler funguslar, bakteriler, virüsler ve nematodlar gibi canlılardır (URL-1, 2007).

Son birkaç yıldır, çay zararlısı olarak bilinen *Ricania simulans* adlı böceğe karşı biyolojik mücadele büyük önem arz etmektedir. Ayrıca *R. simulans*'ın sadece çayda değil Doğu Karadeniz Bölgesi'nde tarımı gerçekleştiren birçok bitkide de zararı mevcuttur. Özellikle kimyasal madde kullanılmadan zararlının kontrol altına alınması gerekliliği biyolojik mücadeleyi zorunlu kılmaktadır.

## 1.2. Çay Bitkisi (*Camellia sinensis*)

Çay bitkisinin ana vatanı Asya kıtası özellikle'de Muson Asya'sıdır. Sıcak ve nemli iklim bölgelerinin bir ürünü olan çay ağacı, 1-1.5 m ile 4-5 m kadar büyüyebilir. Kamelyagiller familyasına ait olan bu bitki, yıl boyunca yeşil kalan bodur bir ağaçtır (Göney, 1986), (Şekil 1). Taze yaprak ve filizlerinin fabrikalarda işlenmesiyle elde edilen kuru çay, bu bitkiye esas önemini kazandırmıştır. Çay yapraklarında *tein* denilen uyarıcı bir maddenin bulunması, ayrıca yapraklarda bazı kimyasal maddelerin suya aroma katması, günümüzde çayın en çok tüketilen içeceklerden birisi haline gelmesine zemin hazırlamıştır (Tunçdilek, 1960).

Çay bitkisinin vejetasyon süresi 12 ay kadardır. Bunda ise aylık sıcaklık ortalamalarının 18° C ile 20° C civarında seyretmesi ve yıl boyunca bol yağış düşmesi



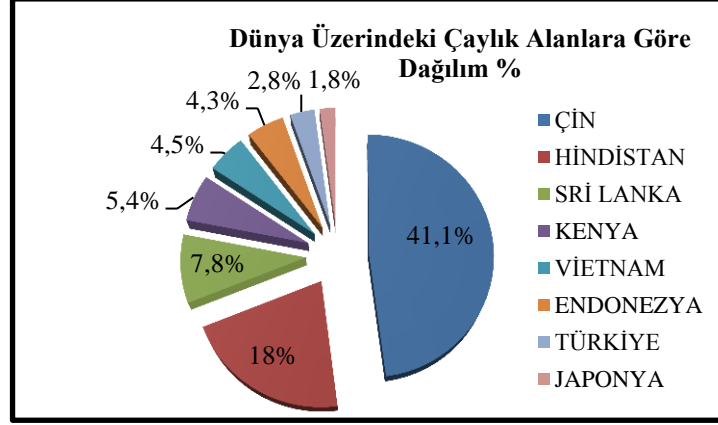
etkili olup, bitkinin fizyolojik etkinlikleri bütün bir yıla yayılmıştır. Çay tarımı için sıcaklık alt sınırı  $-6^{\circ}$  C iken sıcaklık üst sınırı ise  $35^{\circ}$  C civarındadır. Yağış açısından yıllık ortalama yağış miktarı en az 1200 mm kadar olmalıdır (Doğanay, 2007).



Şekil 1. Karadeniz’de yetişen çaya ait görüntü

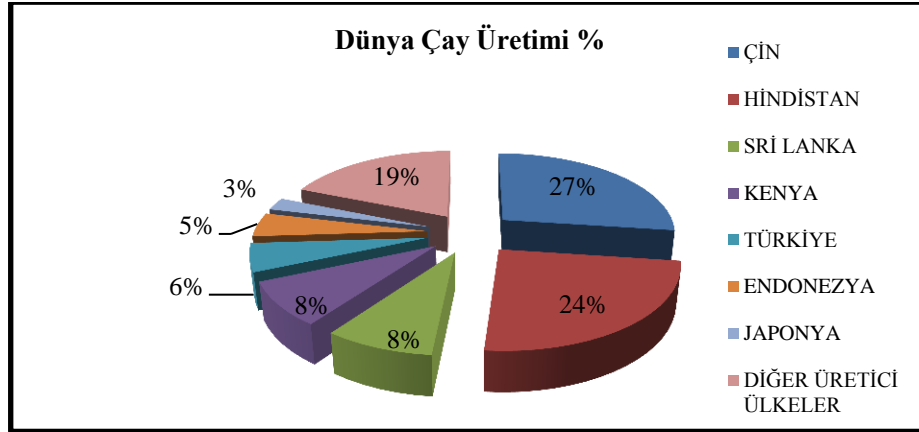
### 1.2.1. Dünya’da Çayın Önemi ve Gelişimi

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) – Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü 2006 yılı istatistiklerine göre; Dünya’da çay tarım alanları 2.717.398 hektara ulaşmıştır. Bu alanın % 87,8’i Asya, % 9,8’u Afrika, geri kalan % 2,4’lük kısmı ise Güney Amerika, Okyanusya ve Avrupa kıtalarında bulunmaktadır. 2002-2006 yılları arasında çay üretim alanları % 9 oranında genişlemiştir. Ülkeler itibariyle çay tarım alanlarının, % 41,1’i Çin, % 18’i Hindistan, % 7,8’i Sri Lanka, % 5,4’ü Kenya, % 4,3’ü Endonezya, % 4,5’i Vietnam, % 2,8’i Türkiye ve % 1,8’i Japonya’da bulunmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. Ülkelerin çaylık alanlarına göre dağılımı

Dünyada çay üretimi 2006 yılında 3.649.490 ton'a ulaşmıştır. Bu üretimin % 82'si Asya, % 15'i Afrika, % 3'ü ise Amerika, Okyanusya ve Avrupa kıtalarında gerçekleştirilmektedir. 2002-2006 yılları arasında, beş yıllık süreç sonunda dünya üretimi % 13 oranında artmıştır. Yıllık artış oranı ortalaması % 2,6'dır. Dünya toplam çay üretiminin % 27,1'ini Çin, % 24,4'ünü Hindistan, % 8,5'ini Sri Lanka, % 8,5'ini Kenya, % 5,5'ini Türkiye, % 4,7'sini Endonezya, % 2,5'ini Japonya ve % 18,8'ini diğer üretici ülkeler gerçekleştirmektedir (URL-2, 2009), (Şekil 3).



Şekil 3. Dünya çay üretim miktarlarına göre ülkeler

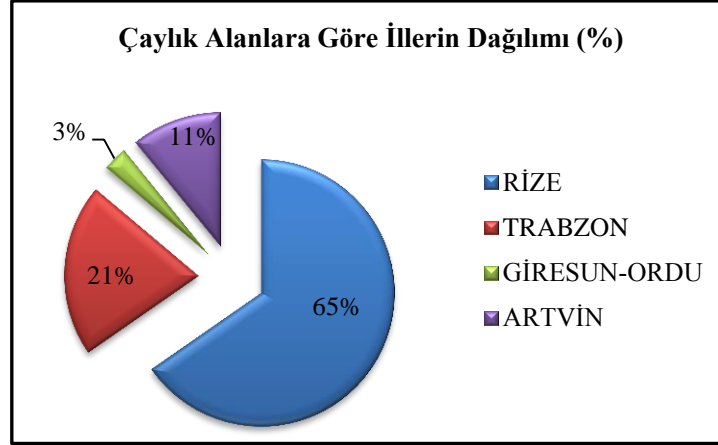
Dünya'da çay ithalatı, hem çay üreticisi olan ülkeler, hem de çay üreticisi olmayan ülkeler tarafından yapılmaktadır. FAO'nun 2004 yılı verilerine göre, toplam çay ithalatı 1.404.971 ton'dur. İthalatta en büyük paya sahip ülkeler, AB-25 ülke (% 23,1), Rusya

Federasyonu ve Bağımsız devletler (% 12,2), Pakistan (% 8,2), ABD (% 7,0), Mısır (% 5,2), Irak (% 4,9) ve Japonya (% 4,0) dır (URL-2, 2009).

### **1.2.2. Türkiye’de Çayın Önemi ve Gelişimi**

Türkiye’de çay tarımı Doğu Karadeniz Bölgesinde Gürcistan sınırından başlayarak Ordu ilinin Fatsa ilçesine kadar olan kuşakta yapılmaktadır. Bu bölge içerisinde başta Rize olmak üzere Trabzon, Ordu, Giresun ve Artvin illerinde çay yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bu bölge dünyada çay yetiştiriciliği yapılan alanlar içerisinde en üst bölgeler arasında yer almaktadır. Gürcistan sınırından Trabzon ilinin Araklı ilçesine kadar olan alan Türkiye’de çay yetiştirilmesi bakımından en elverişli ve birinci derecede verimli çay üretim alanlarını oluşturmaktadır. Çay Doğu Karadeniz Bölgesinde yaşayan halkın en önemli gelir kaynaklarından birisini teşkil etmektedir (URL-2, 2009).

Türkiye’de çay sektörü diğer üretici ülkelerle karşılaştırıldığında nispeten yeni bir faaliyet görünümünde olmasına rağmen kısa süre içerisinde büyük gelişme göstermiştir. 1950’li yıllarda kuru çay üretimi 25 000 tonun altında gerçekleşirken son dönemlerde bazı yıllar 200 bin tona yaklaşmış, 2004 yılından itibaren de 200 bin tonun üzerine çıkmıştır. Bugün Türkiye çay üretiminde önemli üretici ülkeler arasında yer almakta ve üretim miktarı açısından Çin, Hindistan, Sri Lanka, Kenya’dan sonra beşinci sırada bulunmaktadır (URL-2, 2009). Ülkemizde çay tarım sahalarını başta Rize olmak üzere, Trabzon, Artvin, Giresun ve Ordu illeri oluşturur. Çay tarım alanlarının %65’i (49.963 hektar) Rize, %21’i (15.832 hektar) Trabzon, %11’i (8.600 hektar) Artvin ve %3 kadarı da Giresun- Ordu (2.236 hektar) illerinde bulunur (Şekil 4). Türkiye’de gerek çay dikim alanları ve gerekse de üretim miktarları sürekli bir artış göstermiştir. 1940 yılında 155 hektar olan çay bahçeleri, 2004 yılında yaklaşık 76.631 hektara ulaşmıştır (Doğanay, 2011).



Şekil 4. Çaylık alanlara göre illerin dağılımı (%)

Doğu Karadeniz bölgesinde yetişen çaylar, ekolojik şartlar nedeniyle kış aylarında kar altında kalmaktadır. Bu doğal özellik dünyada Doğu Karadeniz kıyılarından başka hiçbir bölgede bulunmamaktadır. Coğrafi ve ekolojik şartlar gereği Doğu Karadeniz'deki topraklarda ve de çay bitkisi üzerinde hiçbir suretle kimyasal ilaçla mücadele yapmaya gerek duyulmamaktadır. Kimyasal zirai mücadele ilacı kullanılmadığından bölgede üretilen siyah ve yeşil çaylarda pestisit kalıntısına da rastlanmamıştır. Bu durum ise ülkemizi sağlıklı siyah, yeşil ve organik çay üretimi için ideal ülke durumuna getirmektedir. Sadece bu özelliğinden dolayı Türkiye çayı dünyanın en sağlıklı en doğal çayı olma özelliğini taşımaktadır (URL-3, 2013).

Birçok zararlı böcek ve hastalık yeni yapraklara, ince dallara, köklere ve olgun çaya zarar verir.

Giant looper (*Ascotis selenaria*); Bu zararlı Lepidoptera ordosundan olup, yılda 3 kez yumurtlar ve kışı pupa aşamasında geçirir. Çoğunlukla Ağustos ve Eylül'de benek şeklindeki enfeksiyonları göze çarpar.

Kanzawa kenisi (*Tetranychus kanzawai*); Bu zararlı Prostigmata ordosundan olup, Haziran'da ve Eylül'den Ekim'e kadar iki kez istilasının zirveye ulaştığı gözlenir. Bu kenenin popülasyonu Amblyseius cinsine ait akar predatörü tarafından doğal olarak baskılanır.

Küçük yaprak tırtılı (*Adoxophes honmai*); Bu zararlı Lepidoptera ordosundan olup, bir yılda 4 kez yumurtlar ve kış boyunca larva olarak kalır. İkinci ve üçüncü hasat mevsiminde istilası göze çarpar. Genel olarak hasattan sonra görülür.

Doğu ay tırtılı (*Homona magnanima*); Bu tır Lepidoptera ordosundan olup, bir yılda 4 kez yumurtlar ve kış boyunca larva olarak kalır. ay ürünü üzerinde onun meydana getirdiği bir seyrelme ile tanımlanır. Üçüncü ve dördüncü mevsimler de istilası göze çarpar.

Dut Kabuklu Biti (*Pseudaulacaspis pentagona*); Bu zararlı Hemiptera ordosundan olup, yılda 2 veya 3 kez yumurtlarlar ve dişileri kış süresince hayatta kalır. Yumurtadan ıkanlar (tırtıllar) kimyasal kontrol amacıyla kullanılan insektisitlere karşı yüksek derecede duyarlıdır.

Yellowish elongate chafer (*Heptophylla picea*); Bu zararlı Coleoptera ordosundan olup, uçamayan tek kanatlı bir böcektir. Birinci sürgünün zayıf büyümesine neden olan larvalar çay köklerini yerler. Çoğu erkekler türler uçma gücüne sahip değildir.

### **1.3. *Ricania simulans*'ın Sistematikteki Yeri**

Hemiptera takımına ait olan *R. simulans*, Ricaniidae familyasına ait bir çay zararlısıdır. Bahçelerde, tarım alanlarında başta çay olmak üzere birçok sebze ve meyvede bulunabilir.

–Takım: Hemiptera

•Familya: Ricaniidae

▪Cins: *Ricania*

•Tür: *Ricania simulans* (Walker, 1851)

#### **1.3.1. *Ricania simulans*'ın Biyolojisi**

##### **1.3.1.1. Hayat Döngüsü**

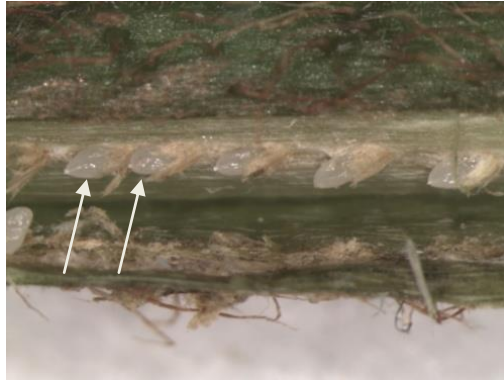
*R. simulans*'ın hayat döngüsü 3 evreden oluşmaktadır: yumurta evresi, nimf evresi ve ergin evre.

### 1.3.1.1.1. Yumurta Evresi

Ergin böcekler ilk yumurtalarını Ağustos başında veya ilk iki haftasında bırakmaya başlamaktadır. Böceğin yılda bir döl verdiği ve ortalama bir dişinin bir yılda 50 adet yumurta bıraktığı bilinmektedir (URL-4, 2013). Ergin böcek konak olarak çay, mandalina, asma, kivi, fasulye gibi birçok bitkiye yumurta bırakabilmektedir.



Şekil 5. Çay üzerinde *R. simulans* yumurtası



Şekil 6. *R. simulans* yumurtasına ait mikroskopik görüntü

Böcek yumurtaları günün her saatinde bırakabilmektedir. Ergin böcek yumurtaları bitkiye tek sıra halinde bırakmaktadır (Şekil 5, 6). Yumurtaların rengi şeffaf beyaz renktedir. Yumurtalar bitki üzerinde kışı geçirerek Haziran ayında nimfler ortaya çıkmaktadır.

### 1.3.1.1.2. Nimf Evresi

Nimflerin yumurtalardan çıkış zamanı genellikle Haziran ayı sonuna doğru gerçekleşmektedir. Nimfler yaklaşık olarak 3 ay doğada bulunmaktadır.

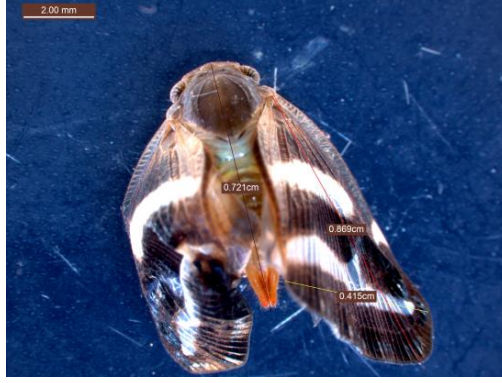
Nimf evresinde vücudun arka kısmında beyaz renkli tüyler mevcuttur (Şekil 7). Böcek kendisini düşmanlardan koruması için bu tüyleri kamufle amaçlı kullanmaktadır. *R. simulans* nimfinin yaklaşık uzunluğu 4 mm civarındadır.



Şekil 7. *R. simulans* nimfi

### 1.3.1.1.3. Ergin Evresi

Erginler de Temmuz ayı ortalarında çıkmakta olup, nimfler gibi 3 ay kadar sürede doğada bulunmaktadır. Erginler Ağustos başında çiftleşmeye başlamakta ve ilk iki haftasında yumurta bırakmaya başlamaktadır. Erginlerin boyu 7 mm ile 13 mm arasında değişmektedir (Şekil 8).



Şekil 8. *R. simulans* ergininin mikroskofta boyunun ölçülmesi

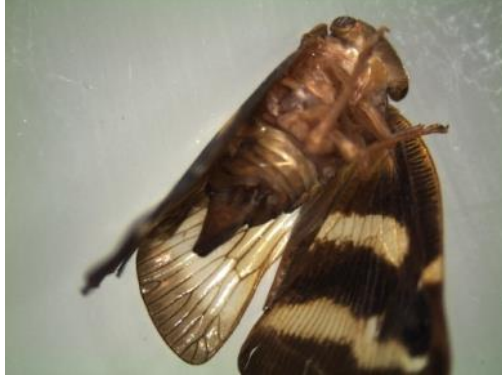
Üçgen şekilli, boyuna ve enine yoğun damarcık içeren sayısız çapraz damarlı, belirgin köşeli kanatlara sahiptir. Ortalama kanat boyu 8 mm'dir (Şekil 9).



Şekil 9. *R. simulans* ergin kanatının mikroskofta boyunun ölçülmesi

*R. simulans* erkeğinin kuyruk kısmı dişiye oranla daha küttür (Şekil 10,11).





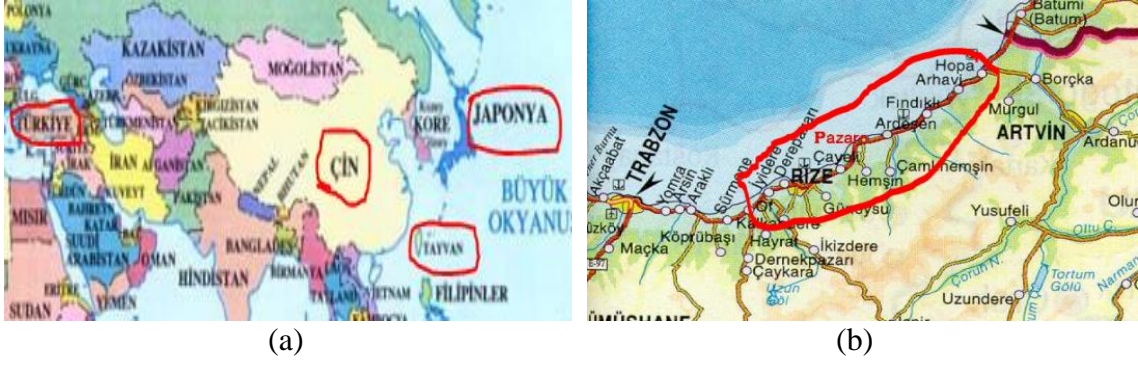
Şekil 10. *R. simulans* ergin dişi mikroskop görüntüsü



Şekil 11. *R. simulans* ergin erkek mikroskop görüntüsü

### 1.3.2. *Ricania simulans*'ın Zararı ve Yayılışı

*R. simulans*'ın dağılım gösterdiği alanlar Japonya, Çin, Tayvan'dır (Tsaur, 2005), (Şekil 12a). Türkiye'de ise yayılış gösterdiği şehirler Artvin, Rize ve Trabzon sahil kesimidir. İlk olarak İyidere İlçesi'nde gözlenirken üç yıl içerisinde hızla çoğalarak Trabzon'un Of İlçesi'nden Artvin'in Hopa İlçesi'ne kadar tüm sahil şeridinde etkili olmuştur (Şekil 12b).



Şekil 12. a) *R. simulans*'ın dünya üzerindeki yayılış alanlarını gösteren harita, b) *R. simulans*'ın Türkiye üzerindeki yayılış alanlarını gösteren harita

*R. simulans*'ın ağız yapısından dolayı bitkilerin öz suyunu emerek kurumalarına neden olduğu, bu aşamada salgıladıkları tatlı maddeden dolayı bitkileri kirlettikleri, yumurtalarını tipik olarak gövde altına açtıkları yaralara bıraktıkları belirtilmektedir (URL-4, 2013).

Böcek her türlü bitkiyi yumurta bırakmak için kullanmaktadır. Bu bitkiler arasında çay, asma, fasulye, mandalina, kivi sayılabilir. Ayrıca beslenme içinde kivi, çay, fasulye, salatalık gibi tarımsal ürünleri tercih etmektedir.

Gürcistan'da turunçgillerde önemli hastalık etmeni olan ve ülkemizde "Göçüren Hastalığı" olarak bilinen "Tristeza" etmenini diğer bitkilere bulaştırdığı belirlenmiştir (URL-4, 2013).

#### 1.4. Zararlı Böceklerle Mücadele Yöntemleri

Yeryüzündeki tür sayısı 1.250.000'nin üzerinde olan böcekler tüm hayvansal canlıların da %75'ini oluşturmaktadır. Bu kadar zengin türe sahip olan böceklerin hepsi zararlı değildir. Bunların yaklaşık üçte biri zararlı, üçte biri yararlı, üçte biri de nötr türlerdir. İnsanlara ve hayvanlara hastalık taşıyarak sağlığı tehdit edenler, kültür bitkilerinde ürün kayıplarına neden olanlar, Orman ve Süs bitkilerine zarar verenler ile kentsel yaşamda sorun yaratanlar zararlı kabul edilmektedir. Ancak bunların %99'a yakın bir kısmı doğal olarak baskı altında tutulmaktadır. Geriye kalan %1 kadarı bile ortaya çıkardığı çok önemli sorunlar nedeniyle insanoğlunu tarih boyunca uğraştırmaya yetmiştir. Gerek sağlık, gerek sosyal ve gerekse ekonomik açıdan birçok olumsuzlukları ortaya çıkaran bu türleri elemine etmek veya baskı altına alabilmek için tarihin ilk devirlerinden

bu yana çeşitli mücadele yöntem ve teknikleri geliştirilmiştir. Bunlar Kültürel Mücadele, Fiziksel-Mekaniksel Mücadele, Kimyasal Mücadele, Biyoteknik Mücadele, Entegre Mücadele ve Biyolojik Mücadele olarak gruplandırılabilir (Uygun, 2002).

#### **1.4.1. Kültürel Mücadele**

Hastalık ve zararlıların yaşamlarını güçleştiren çoğalmalarını azaltan veya engelleyen tarımsal işlemleri içeren savaş yöntemlerine kültürel mücadele denir. Kültürel mücadelede amaç hastalık ve zararlının tedavisi değil, önceden alınan önlemlerle kültürel bitki ve ürünleri zarardan korumaktır. Kültürel mücadele yöntemleri ucuz uygulamalar olup çoğunlukla bilinen ve uygulanan tarımsal yöntemlerdir (URL-5, 2007).

#### **1.4.2. Fiziksel Mücadele**

Yüksek sıcaklıktan yararlanma, yakma, su altında bırakma, suya daldırma, mineral tuzlardan yararlanma, nemden faydalanma, elektrik ve radyoaktivite kullanılarak böceklerin öldürülmesi veya kısırlaştırılmasını içeren mücadele yöntemidir.

#### **1.4.3. Mekanik Mücadele**

Ezme, toplama, engelleme ve yapışkan, kışlık, engel, ışık, renk, feromon tuzakları kullanarak yakalamak şeklinde uygulanan mücadele yöntemidir.

#### **1.4.4. Kimyasal Mücadele**

Kimyasal mücadele çeşitli kimyasalların toz ve sulu halde kullanılmasıyla yapılan mücadeledir.

Kimyasallar bitkiler üzerine püskürtüldükten sonra genellikle sıcaklık, ışık, yağış gibi çevresel etkiler nedeniyle zehirliliklerini zararlı için kaybederler. Belirli bir süre sonra zehirli kalıntı miktarı insan sağlığı için zararsız bir seviyeye düşer. Ürünler gün olarak verilen süre geçmeden hasat edilmemeli ve tüketilmemelidir. Bu nedenle bekleme süresi

ilacın son kullanımı ile hasadı arasında geçmesi gereken süre olarak tarif edilir. Bu süre her ilacın etiketinde yazılıdır. İlaçların bekleme süresi mümkün olduğu kadar uzun olmalıdır.

Hastalık ve zararlılara karşı kullanılacak ilaçlar, daima o hastalık ve zararlıya karşı ruhsatlı olmalıdır. Kimyasal mücadele, mücadele yöntemleri içinde en son başvuracağımız yöntem olmalıdır (URL-6, 2007).

#### **1.4.4.1. Kimyasal Mücadelenin Zararları**

Bitki ve hayvanlara zarar veren canlı organizmalara karşı kullanılan kimyasal ilaçların tümüne pestisit adı verilmektedir. Pestisitler kendi aralarında; böcek öldürücüler (insektisitler), fungus öldürücüler (fungusitler), akar öldürücüler (akarisitler), bakteri öldürücüler (bakterisitler) gibi birbirinden oldukça farklı kimyasal yapı ve özelliklere sahip yüzlerce bileşiklerden müteşekkildir (Karakaya ve Boyraz, 1992). Tarımsal ilaçların kullanımı bir taraftan tarımsal üretimi arttırırken diğer taraftan bilinçsiz ve hatalı kullanım sonucu doğrudan ya da dolaylı yollardan insan ve çevre sağlığı problemlerini de beraberinde getirirler. Pestisitler tavsiye edilen dozların üzerinde kullanıldıklarında, gereğinden fazla sayıda ilaçlama yapıldığında, gerekmediği halde birden fazla ilaç karıştırılarak kullanıldığında veya son ilaçlama ile hasat dönemi arasında bırakılması gereken süreye riayet edilmediği durumlarda gıda maddelerinde fazla miktarda kalıntı bırakabilirler (Karakaya ve Boyraz, 1992). Genelde bitkileri ve tarım ürünlerini zararlılardan korumak amacıyla kullanılan pestisitler bitkilerin, insanların ve diğer canlıların yaşadığı çevrede uygulanmaktadır. Bu sebeple, çevrede yaşayan canlılar doğrudan veya dolaylı olarak bu maddelerin olumsuz etkilerine maruz kalmaktadırlar. Ağız, deri ve solunum yoluyla insan vücuduna girebilen bu maddeler insan ve diğer canlılara karşı farklı etkiler göstermektedirler.

Bu genel etkileri;

- a) Doğrudan toksik etkiler
- b) Sekonder toksik etkiler
- c) Gıda türlerinin azalması
- d) Yaşama ortamının bozulması
- e) Rakip türün sayısındaki değişme
- f) Pestisitlere karşı dayanıklılık meydana gelmesi olarak özetlemek mümkündür.

Pestisitlerin uygulandığı bir alanda, mücadele edilen zararlı ile birlikte aynı ekosistem içindeki diğer canlılar da zarar görür. Bu da, bu alanda besin zincirinde kopmalara neden olur, unutulmamalıdır ki yeryüzündeki her canlı gereklidir. Av-avcı dengesinin bozulması bir ekosistem için sonun başlangıcıdır.

Su (yer üstü - yer altı), toprak ve hava ile gıdaların pestisitlerden etkilenmesi bu çevrede yaşayan insanların sağlığını da doğal olarak tehdit etmektedir. Pestisit istenmeyen özelliklerinden en önemlileri, çevrede kalıcılıklarının uzun süreli oluşu, biyo-akümülyasyon ile canlı organizmalarda depolanması ve kendilerinin, dönüşüm ürünlerinin veya içerdikleri gayri safiyetlerin canlılara önemli derecede toksikolojik etkilere sahip olmalarıdır (Anonim, 2005).

Bir kimyasalın bir kez veya kısa bir zaman diliminde birkaç kez alınması sonucunda vücutta oluşan hasar akut toksisite olarak tanımlanır (Ünal, 1998).

Akut toksisite ilacın üretimi sırasında çalışanların ilaçlardan zehirlenmesi sonucu ortaya çıkabildiği gibi bu ilacın taşınması, depolanması ve kullanılması esnasında güvenli kullanım kurallarına uyulmaması sonucu da ortaya çıkabilir (Ecevit, 1988).

Yüksek dozda pestisit kalıntısı içeren gıdalarla beslenen insanlarda ve çevredeki diğer canlılarda akut veya kronik zehirlenmelere neden olabildikleri gibi, özellikle bazı ürünlerde aroma ve kalite değişimleri meydana getirebilirler (Henning ve diğ., 1954).

Bilinçsiz ve gereksiz pestisit tüketiminin neden olduğu sorunlardan biri de zararlı organizmalar da görülen duyarlılık azalışı ve takiben dayanıklılık (direnc) sorunudur. Bir pestisite karşı organizmaların duyarlılığı azaldıkça, o pestisit duyarlılığı da düşmektedir. Üreticiler bu durumda kullandığı pestisit dozunun yükselterek aynı başarıyı yakalamaya çalışmaktadır. Bu durumda, dayanıklılık sorunu ortaya çıkmakta, daha fazla pestisit tüketilmekte, bir yandan ekonomik açıdan maliyet artmakta, bir yandan da etkisizlik nedeniyle organizmaların neden olduğu ürün ve kalite kayıpları devam etmekte ve en önemlisi de insan sağlığı ve çevre kirliliği açısından sorun daha da derinleşmektedir. Pestisitlere duyarlılığın azalışı, bir mikroorganizmanın genetik yapısında değişiklik olmaksızın, bir kimyasal maddeye uyum göstermesiyle kendini gösterir. Ancak dayanıklılıktan söz edildiğinde, organizmaların duyarlılığı genetik yapısındaki bir değişiklik yani mutasyon sonucu çok azalmakta ve genelde geri dönüşü olmayan bir durum ortaya çıkmaktadır (URL-8, 2013).

Dayanıklılığın ortaya çıkışına en fazla etki eden faktörlerin başında, pestisit duyarlılığı açısından riski ile pestisitlerin kullanım biçimi gelmektedir. Bilinçsiz ve

kontROLSÜZ kullanım, dayanıklılığın daha hızlı ortaya çıkmasına yol açmaktadır (Delen ve Tosun, 1996). Örneğin, DDT'nin keşfinden önceki 1940'ların başına kadar zararlılar tarafından üründe meydana gelen kaybın dünya ortalaması % 7 iken, 1980'lerin sonuna doğru bu kayıp %13'e yükselmiştir (Wilson, 1990). Bu ürün kaybındaki iki katlık artış, ilaç devriminden sonra başlamış ve aynı dönem içinde ilaç kullanımında ise 12 katlık bir artış meydana gelmiştir (Poppy, 1997).

#### **1.4.5. Biyoteknik Mücadele**

Zararlıların biyoloji, fizyoloji ve davranışları üzerine etkili olan yapay ve doğal maddeler kullanılarak zararlıların normal özelliklerini bozmak suretiyle uygulanan mücadele yöntemine, biyoteknik mücadele denir (URL-5, 2007).

#### **1.4.6. Entegre Mücadele**

Entegre mücadele, zararlı türlerin popülasyon dinamikleri ve çevre ile ilişkilerini dikkate alarak, uygun olan tüm mücadele yöntemlerini ve tekniklerini uyumlu bir şekilde kullanarak, zararlıların popülasyon yoğunluklarını ekonomik zarar seviyesinin altında tutan bir mücadele yöntemidir.

#### **1.4.7. Biyolojik Mücadele**

Biyolojik mücadele terimi ilk kez 1919 yılında Smith tarafından kullanılmış olup, biyolojik mücadeleyi basit olarak "zararlı popülasyonlarını doğal düşmanları vasıtasıyla baskı altına alma veya düzenleme" şeklinde tanımlamıştır. Yazar burada doğal düşman olarak sadece parazitoit, predatör ve patojenleri kastetmiştir. Van den Bosch ve diğ., (1982), biyolojik mücadele teriminin hem "Uygulamalı Biyolojik Mücadele" yani "insanlar tarafından doğal düşmanların zararlılara karşı kullanılması" ve hem de "Doğal Biyolojik Mücadele" yani "insanın müdahalesi olmadan doğada kendiliğinden oluşa gelen baskıyı" ifade etmek üzere kullanıldığını belirtmektedir. Debach (1974), biyolojik mücadeleyi doğal mücadelenin bir parçası olarak kabul etmekte ve ekolojik anlamda "parazitoit, predatör ve patojenlerle, herhangi bir zararlının popülasyon yoğunluğunu, bu

etmenlerin olmadığı zamanki yoğunluğundan daha düşük düzeyde tutulmasını sağlayan düzenlemeler” olarak tarif etmektedir. Debach (1974), doğal mücadeleyi ise “Doğada canlı popülasyonlarının belirli bir zaman periyodunda iniş ve çıkışlarının bir veya daha çok doğal faktörler kombinasyonu tarafından düzenlenmesi” şeklinde tarif etmekte ve bu faktörleri biyotik ve abiyotik olarak iki gruba ayırmaktadır. Bu faktörler;

- Doğal düşmanlar,
- Besin (kalite ve kantite),
- Tür içi rekabet,
- Türler arası rekabet (diğer doğal düşmanlar),
- İklim ve diğer fiziksel faktörler ve
- Yer ve yaşam alanı istekleri.

Burada da görüldüğü gibi “Doğal mücadele”de insan aktivitesi yoktur. Biyolojik Mücadele’de ise;

- Biyolojik mücadele alanını uygulayıcı belirler,
- Tüm faaliyetler insanlar tarafından yönetilir ve
- Ekonomik girdi gerektirir.

Dolayısıyla biyolojik mücadele kendiliğinden gelişen bir olay olmayıp, insan aktivitesini gerektiren düzenlemelerdir.

Hagler (2000), biyolojik mücadele’yi “Zararlıların mücadelesinde, doğal düşmanların insanlar tarafından kullanılmasıdır” şeklinde tarif etmekte ve biyolojik mücadeleyi doğal mücadeleden ayırmaktadır. Yazar ayrıca, ABD Ulusal Bilimler Akademisi’nde bir grubun, biyolojik mücadelenin tanımında bulunan canlı organizmalara gen ve gen ürünlerini de ekleyerek biyolojik mücadelenin çalışma alanını genişletmek istediklerini vurgulamaktadır (Uygun, 2002).

Zararlı böcek popülasyonlarını dolayısıyla böceklerin zararlarını azaltmak için canlı organizmalardan veya bu organizmalara ait ürünlerden (mikroorganizmalar, predatörler, parazitoid böcekler, omurgasızlar, omurgalılar, feromonlar, semikimyasallar, bitkisel insektisitler, böcek büyüme düzenleyicileri) faydalanarak yapılan ekonomik, güvenilir ve başarılı bir mücadele yöntemidir (Demirbağ ve diğ., 2008).

### **1.4.7.1. Biyolojik Mücadelede Kullanılan Etkin Gruplar**

Biyolojik mücadelede 3 grup etkin şekilde kullanılmaktadır: parazitoitler, predatörler ve entomopatojenler.

#### **1.4.7.1.1. Parazitoitler**

Parazitoitler konukçuları üzerinde beslenerek konukçusunu öldürürler, parazitler ise yine konukçuları ile beslenirler fakat konukçusunu öldürmezler. Parazitoitlerin ergin öncesi dönemleri sadece bir adet konukçu ile beslenirler, beslendiği konukçudan ayrılmazlar ve o konukçuyu aynı zamanda yaşama yeri olarak kullanırlar. Parazitoitlerin erginleri ise hareketlidirler ve yaşamlarını sürdürmek için genellikle ballı madde, nektar ve polene gereksinimleri vardır. Ancak bazı türlerin konukçuları ile de beslendiği ve bu yolla da konukçusu üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Parazitoitler genellikle sadece bir konukçu türe veya akraba birkaç türe saldırırlar. Bu durum parazitoitlerin biyolojik mücadelede kullanılabilen en uygun etmen olmasını sağlamıştır. Gerek üretiminin predatörlere göre kolay olması ve gerekse de konukçu spektrumunun dar olması nedeniyle klasik biyolojik mücadele ve çoğaltılarak salım yapılan biyolojik mücadele programlarında en çok kullanılan bir etmen grubunu oluştururlar (Uygun, 2002).

Doğal ve agroekosistemlerde sayılamayacak kadar çok türü bulunan parazitoitlerin yaklaşık %78'i sadece Hymenoptera ve bir bölümü de Diptera takımında bulunurken, predatörlerin ise böceklerin hemen hemen tüm takımlarında az veya çok oranda bulunduğu bildirilmektedir (Feener ve Brown, 1997).

#### **1.4.7.1.2. Predatörler**

Birçok böcek takımında bulunan predatörler genellikle polifagdırlar. Belirli bir ava özelleşmiş olanları çok azdır. Bunların hem ergin öncesi, hem de ergin dönemleri genellikle avcıdır. Çok yaygın olmamakla birlikte bazı predatörlerin erginleri avları ile değil, ballı madde, nektar, polen, su vb. maddelerle beslenirler. Ergin predatörler yumurtalarını avlarının bulunduğu yerlere bırakırlar, yumurtadan çıkan larvalar avlarını aramaya başlarlar ve bulduklarını ya çiğneyerek ya da sokup-emerek oburca tüketirler.



Bunlar genellikle kendinden daha ufak ve daha zayıf avlara saldırırlar. Ancak, bazı predatör türleri kendinden daha iri bireylere saldırdığında onu ilk önce bir zehirle hareketsiz hale getirir ve ondan sonra yemeye başlar. Bazı gelin böceği erginlerinin 1-2 aylık ömürlerinde günde 100 kadar yaprakbiti tükettiği bilinmektedir. Predatörlerin çoğaltılarak biyolojik mücadelede kullanılması tam olarak uygulamaya sokulamamıştır. Bunların kitle üretimi pahalı ve zordur. Yapay besi ortamlarında üretilenlerin de doğadaki etkinliğinin belirlenmesinde önemli eksiklikler vardır. Yapay besi ortamı hazırlama ve predatörlerin etkinliklerinin belirlenmesi konularındaki araştırmalar yoğun bir şekilde sürdürülmektedir (Uygun, 2002).

#### **1.4.7.1.3. Entomopatojenler**

Doğada böceklerin hastalanmasına neden olan ve sonra onları öldüren orijini bakteri, virüs, mantar, nematod veya protozoa olan pek çok mikroorganizma mevcuttur (Lipa, 1975; Poinar, 1978).

Bu mikroorganizmalar entomopatojen olarak adlandırılır. Birçok entomopatojen mikroorganizma, tarla ve bahçe bitkilerinde, seralarda, süs bitkilerinde, koruma altına alınmış bölgelerde 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 diğ., 2001).

Entomopatojenlerin yakın gelecekte, mikrobiyal kontrol ajanı olarak, sadece fiyat ve etkinlik bakımından değerlendirildiğinde bile kimyasal insektisidlere göre daha kullanışlı hale geleceği düşünülmektedir (Lacey ve diğ., 2001). Birçok virüsün böceklerin hastalanmasına neden olarak böcek salgınlarını kontrol ettikleri 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 ajanlardan daha fazla zarar görürler (Weiser, 1969).

Bu virüsler genellikle 2-3 yılda bir meydana çıkan salgınlarda çoğalarak birçok larvayı öldürürler ve böylece böcek afetlerini ortadan kaldırırlar (Lipa, 1975).

Virüsler birçok böcek takımıyla ilişkilidir. Bununla birlikte büyük bir kısmı Lepidoptera (%83), Hymenoptera (%10) ve Diptera (%4) takımlarında bulunmaktadır (Demirbağ ve Beldüz, 1997).

Virüsler içerisinde en az 16 familyanın böceklerle mücadelede etkili olduğu tespit edilmiştir (Tanada ve Kaya, 1993).

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 özeldir (Demirbağ ve Beldüz, 1997).

Çoğu bakulovirüsler 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).

Deacon (1983), entomopatojen fungusların diğer mikroorganizmalara göre çok daha geniş konukçuya sahip olduğu, Lepidoptera, Homoptera, Coleoptera ve Diptera takımlarına bağlı türlerde enfeksiyon yaptıkları, bunlardan, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* ve *Lecanicillium lecanii*'nin tüm dünyada yaygın olduğunu kaydetmektedir. Bazı fungus türleri de konukçuya spesifiktirler. Örneğin, *Hirsutella thompsonii* ile akarlar arasında ve *Culicinomyces* spp. ile sivrisinek türleri arasında spesifik bir ilişki mevcuttur (Deacon, 1983). Entomopatojen funguslarınla ilgili bazı faydalı genellemeler Deacon (1983) tarafından aşağıdaki şekilde belirtilmektedir. Bunlar;

1. Genelde, hemen hepsi patates dextrose agar veya malt extract agar gibi standart mikrobiyolojik ortamlarda rahatlıkla gelişebilir, bu yüzden funguslar beslenme problemi yaşamazlar.
2. Entomopatojenik fungusların genellikle optimum gelişme sıcaklığı 20-25°C'dir ve 37°C ve daha yüksek sıcaklıklarda gelişemezler. Bunun sonucu olarak bazı alerjiye sebep olan funguslar hariç, insanlar ve diğer sıcakkanlı memelileri etkileyen ciddi zararlar gösteremezler.
3. Katı substratlarda tipik elongate hif olarak gelişirler. Fakat daldırılmış kültürlerde bunların bir kaçı blastospor olarak adlandırılan maya benzeri tomurcuklanan hücreler şeklinde gelişirler.
4. Funguslar, kültürde veya ılıman şartlardaki konukçularda kolay bir şekilde aseksüel sporlar üretmekte ve tabiatta başlıca enfeksiyon kaynağı konumundadırlar. Bunlar temel olarak bakteri endosporlardan farklıdır. Çünkü fungal sporlar çok sayıda üretilir, rüzgâr ve yağmur tarafından rahatlıkla dağıtılabirler.

5. Böcek paraziti fungusların en önemli özelliklerinden biri de olumsuz çevre koşullarında dayanıklı formları ve saprofitlik özelliğe sahip olmalarıdır. Bu nedenle de bunlar topraktan ve organik artıklar üzerinden izole edilebilmekte ve biyolojik mücadelede kullanılma şansları artmaktadır.

Konukçularını öldüren ya da kısırlaştırılan pek çok entomopatojen nematod, mükemmel biyolojik mücadele ajanlarıdır. Pek çoğu canlı böcekler içinde ya da bir kısmı yapay ortamlarda kitle halinde üretilmekte ve daha sonra böceklere karşı savaşta su veya toprak içine uygulanabilmektedir (Kaşkavalcı, 1999).

Entomopatojenik nematodlar, toprak içinde konukçu böceği arama yeteneğine sahiptirler. Konukçu böceğe ulaşan entomopatojenik nematod'lar, böceğin içine girer ve çeşitli maddeler salgılayarak o böceğin ölümüne neden olurlar. Böceğin içine girişten ölümüne kadar geçen süre, ortam koşullarına bağlı olmakla beraber, yaklaşık 36 saattir. Böcek öldükten sonra entomopatojenik nematodlar böcek içinde ürer ve daha sonra ölü böceği terk ederek yeni konukçu arayışına başlarlar. Yaklaşık 3 adet entomopatojenik nematod bir böceğin ölümü için yeterlidir ve böceğe giriş yaptıktan ortalama 15 gün sonra ölü böcek içinden on binlerce entomopatojenik nematod çıkar (Durmuşoğlu ve diğ., 2013).

Entomopatojenik protozoalar böcek popülasyonlarının düzenlenmesinde önemli role sahiptir (Maddox, 1987)

Protozoonların zararlı böcek popülasyonlarında meydana getirdikleri salgınlar, az rastlanılan bir durum olmasına karşın, neden oldukları ferdi ve küçük gruplar halindeki ölümler, zararlı böcek popülasyonlarının zarar eşiğinin altında tutulması bakımından önemlidir (Maddox, 1987). Protozoa enfeksiyonları böcek popülasyonlarını dengede tutması bakımından büyük bir öneme sahiptirler (Maddox, 1987).

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

Çoğu entomopatojenik protozoonun hayat döngüsü komplekstir. Sadece canlı konak içerisinde gelişebilirler ve çoğu türün gelişimini tamamlayabilmesi için bir ara konağa ihtiyacı vardır.

#### 1.4.7.1.3.1. Entomopatojenik Bakteriler

Entomopatojenik bakteriler, böceklerde kitle halinde ölümlere neden olmaktadır (Çanakçıoğlu, 1989; Sezen ve diğ., 2007)

Böceklerde hastalık oluşturan bakterileri spor oluşturanlar ve spor oluşturmayanlar olmak üzere iki gruba ayırmak mümkündür. Spor oluşturmayan böcek patojeni bakteriler, Enterobacteriaceae, Pseudomonaceae ve Micrococcaceae familyalarına dahildirler. Böceklere önemli zarar veren bakteriler daha çok spor meydana getiren bakterilerdir. Spor oluşturan bakteriler Bacillaceae familyasından *Clostridium* ve *Bacillus* cinsleri içerisinde yer alırlar. Yapılan araştırmalar sporların kuraklığa ve yüksek sıcaklığa karşı dayanıklı olduğunu göstermiştir. Fakat spor oluşturmayan bakteriler ekstrem fiziksel koşullara karşı daha hassastır (Lipa, 1975).

Zararlı kontrolünde en yaygın kullanılan çevre dostu mikrobiyal patojen *Bacillus thuringiensis*'dir. *Bt* ürünleri farklı böcek takımlarına ait türlerin larval dönemlerinde larvaların orta barsağında hasara neden olarak veya septisemiye yol açarak kontrol sağlar. *B. thuringiensis* Gram pozitif, spor oluşturan, insektisidal özelliğe sahip kristal yapıda toksin protein üreten, çevreye ve insanlara karşı zararlı bileşiğe sahip olmayan, topraktan, böceklerden, depolanmış ürünlerden, yapraklardan izole edilen aerobik toprak bakterisidir (Raymond ve diğ., 2010).

*B.t.*'ler insanlara, faydalı böceklerin çoğuna ve diğer canlılara toksik etkisinin olmaması nedeniyle, geleneksel insektisitlerin meydana getirdiği çevre ve sağlık sorunlarına neden olmamaktadır (Beegle ve Yamamoto, 1992).

Genetik mühendisliğindeki son gelişmeler ile *B.t.* genlerinin pamuk, tütün ve domates gibi önemli ürünlere ve bitkilerde yaşayan ve patojenik olmayan bazı bakterilere nakledilmesi ayrıca farklı konukçu sprektumuna sahip yeni ırkların geliştirilmesi bu bakterinin önemini oldukça arttırmıştır (Gasser ve Fraley, 1989; Lindow ve diğ., 1989). Sporlanma sırasında oluşturdukları parasporal kristal proteinlerin ticari formülasyonları yapılmakta ve biyolojik kontrol amacıyla kullanılmaktadır (Tamez-Guerra ve diğ., 2004). İnsektisidal kristal proteinler (ICP) çok sayıda tarım ve orman zararlısı ile hastalık vektörüne karşı toksisite gösterir. *Bt*'nin farklı suşları Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera takımına ait zararlılara karşı sınırlı veya kapsamlı toksik etki gösterirler. Cry toksinlerin etki mekanizmasına yönelik çalışmalar daha çok Lepidopter zararlıları üzerinde yoğunlaşmıştır (Bravo ve diğ., 2007).

Bazı *Bt* suşlarının Nematod, Protozoa türleri ve Hymenoptera takımındaki böceklere karşı da etkili olduğu belirlenmiştir (Bone, 1989; Lacey ve Goettel, 1995; Prieto-Samsonov, 1997).

Biyolojik kontrol ajanı olarak *Bt* kullanımının çevresel faydası, hem geniş konak aralığı hemde böceklere karşı bilinen yüksek toksisitesiyle yeni suşlar için araştırmalarda ilgi sağlamıştır (Swamy ve diğ., 2013).

*B. thuringiensis* spor üretme sırasında kristal inklüzyonlar üretebilme yeteneğine sahiptir. Bu inklüzyonlar *cry* genleri tarafından kodlanan proteinlerdir ve çeşitli böceklerde, protozoa ve nematod gibi çeşitli organizmalarda toksik olduğu görülmüştür (Konecka ve diğ., 2007).

*B. thuringiensis*'in ürettiği bileşiklerin doğaya ve insanlara zararı yoktur. *B. thuringiensis* suşları Cry ve Cyt proteinlerinin dışında vejetatif büyüme süresince  $\beta$ -ekzotoksin, fosfolipazlar, proteazlar, kitinazlar, vejetatif insektisidal proteinler (VIP) ve antifungal bileşikler oluştururlar (Porcar ve Juarez-Perez, 2003).

$\beta$ -endotoksinler, aktivitelerine bakılarak beş önemli sınıfa ayrılırlar.

1. Lepidopteralara özgün,
2. Lepidoptera ve Coleopteralara özgün,
3. Coleopteralara özgün,
4. Dipteralara özgün,
5. Nematodlara özgün (Cannon, 1996).

Kristal (Cry) proteinleri kodlayan genler birkaç sınıf ve alt sınıflardan oluşmaktadır (Cannon, 1996). Adang ve diğ. (1993) 60'dan fazla *cry* geni (26 farklı ICP'leri kodlayan *cry* genleri) nükleotit dizinini belirlediler.

Baum ve Malvar (1995) adlı araştırmacılar ise 90'dan fazla ICP genlerinin nükleotit dizinini belirlediler ve klonladılar.

*Bt* suşlarının *cry* genleri onların toksisiteleri ile ilgilidir ve PCR yoluyla bu genler karakterize edilir, suşların insektisidal aktivitesi tahmin edilir (Carozzi ve diğ., 1991; Padidam,1992; Ben-Dov, 1997; Hansen,1998).Yine de daha tam bir karakterizasyon için alternatif metodlar gerekir. Fenotipik analizler karşılaştırmalı çalışmalarda kullanılacak bilgi sağlar (Alvarez ve diğ., 2009).

Ayrıca, insektisidal özellikleri saptamak için biyolojik faktörlerin daha iyi anlaşılmasına olanak sağlayacağı için *Bt* izolatlarının çeşitliliği ve biyolojik özellikleri

hakkındaki bilginin geliştirilmesi gerekir. Fosfolipazlar, proteazlar ve kitinazlar *Bt*'nin insektisidal aktivitesine sebep olduğu gösterilmiştir (URL-7, 2001).

Kristal (*cry*) genleri insektisidal kristal protein (ICP)'leri kodlamaktadırlar. Bu kristal genleri Lepidoptera (*cry* 1), Diptera ve Lepidoptera (*cry* 2), Coleoptera (*cry* 3), Diptera (*cry* 4), veya Coleoptera ve Lepidoptera (*cry* 5) böceklerine karşı etkilidir (Höfte ve Whiteley, 1989).

1980'li yılların başında, ICP'leri kodlayan çoğu genlerin büyük taşınabilir plazmitler (bu plazmitlerin çoğu konjugasyon ile suşlar arasında kolayca değişebilen plazmitlerdir) üzerinde bulunduğu tespit edildi (González ve Carlton, 1980; González ve diğ., 1981).

Bu ilk çalışmalardan sonra pek çok ICP geni klonlandı, dizileri belirlendi ve yeni insektisidal spektrumlu *B. thuringiensis* suşları yapmak için kullanıldı (Höfte ve Whiteley, 1989).

Doğal olarak meydana gelen çoğu *B. thuringiensis* suşları tek grup böceklerle karşı aktif ICP'ler içerir. Ancak, *B. thuringiensis* suşları ya da ilişkide olduğu diğer türler arasında konjugatif transfer meydana gelir, sonuçta çeşitli plazmit içerikli yeni suşlar oluşur. Bu yüzden *cry* genlerinin hareketliliği ve plazmitlerin değiş tokuşu *B. thuringiensis* de incelenen farklı ve kompleks aktivite spektrumu ile açıklanabilir (González ve Carlton, 1980; González ve diğ., 1981; González ve diğ., 1982; Reddy ve diğ., 1987; Jarrett ve Stephenson, 1990). İki böcek grubuna karşı toksik olan yeni *B. thuringiensis* suşları konjugasyon ile geliştirilmektedir.

#### **1.4.7.1.3.2. *Bacillus thuringiensis*'in Hedef Böceklerde Etki Mekanizması**

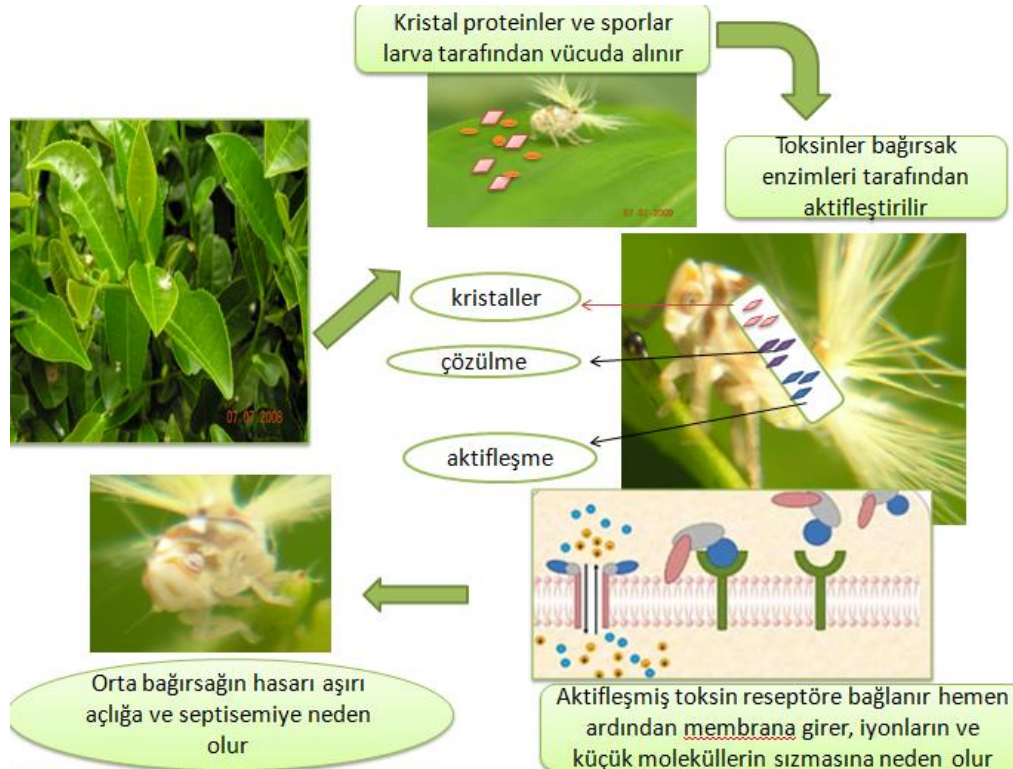
*B. thuringiensis*'in biyolojik aktivitesi Coleoptera, Diptera ve Lepidoptera gruplarındaki hassas böceklerle karşı *cry* genlerinin oluşturduğu aktif ICP'ler sayesinde. ICP'nin etkili olabilmesi için sindirilmesi gerekmektedir (Visser ve diğ., 1993).

Diğer böcek gruplarına (Hymenoptera, Homoptera, Dictyoptera, Mallophaga), nematodlara (Strongylida, Tylenchida), kenelere (Acari), yassı kurtlara (Digenea) ve protozoalara (Diplomonadida) karşı aktivite de buldukları tespit edilmiştir (Feitelson, 1993; Zukowski, 1995).

Cry proteinlerinin etki mekanizması şu şekilde özetlenebilir: İlk önce böcek bağırsağında inaktif protoksin halinde olan kristal çözünür ve Cry protein monomerlerindeki sülfid bağlarının yıkılması başlar. Daha sonra bağırsak proteazları

tarafından protoksinin proteolitik sindirimi gerçekleşir ve aktif Cry toksini açığa çıkar. Aktif toksin duyarlı böceklerin bağırsak mikrovilluslarının fırça kenarlı apikal bölgelerindeki spesifik reseptörlere bağlanır. Bir sonraki adım, toksinin apikal membrana girmesini ve iyon kanalları veya porları oluşturmasını içerir. Bu kanalların veya porların oluşması hücre bileşiklerinin dışa çıkmasıyla sonuçlanır ve bu durumu takiben böceğin ölümü gerçekleşir (Schnepf ve diğ., 1998), (Şekil 13).

*B. thuringiensis*'in larvalar üzerinde sebep olduğu semptomlar; yavaş hareket etme, beslenmeyi bırakma, sıvı halde dışkı çıkarma, kusma ve vücut içeriklerinin kahverengiden siyaha dönüşmesi olarak sayılabilir (Knowles, 1994).



Şekil 13. Kristal proteinlerin etki mekanizması

#### 1.4.8. *Ricania simulans*'a Karşı Yapılan Mücadele Yöntemleri

*R. simulans* ile mücadele için öneriler daha çok mekanik mücadeleye yöneliktir. Zararlının mücadelesinde yumurtalarını bıraktığı bahçe kenarlarında bulunan çit bitkileri, çalı formundaki bitkiler, böğürtlen, çok yıllık otsu bitkiler ve mürver gibi bitkilerin,

zararlıının çıkış yapmadan önce temizlenmesi ve imha edilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (URL-4, 2013).

*R. simulans*'ın mücadelesine yönelik çalışmalar arasında, Doğu Karadeniz Bölgesinde yeni zararlı *R. simulans*'a karşı Azadirachtin ve Spinosad etki maddeli biyopestisitlerin etkinliklerinin belirlenmesi gelir. Bu çalışma Hopa (Kemalpaşa) ve Rize (Merkez)'de 2009-2011 yılları arasında yapılmıştır. Biyolojik etkinlik denemeleri şeklinde yürütülen bu çalışma 2009 yılında Hopa, 2010-2011 yıllarında Rize'de yürütülmüştür. Denemeler 3 tekerrürlü olarak kurulmuş, ilaçların farklı dozları ve kontrol grubu denemenin karakterini oluşturmuştur. Çalışmada 60x80 cm ebadındaki kafesler zararlı ile bulaşık olmayan kivi sürgünlerine takılmış, bu kafeslerin her birine 20 adet nimf konulmuş ve içinde nimflerin bulunduğu sürgünlere farklı dozlarda uygulamalar yapılmıştır. Uygulamadan bir, iki, üç ve yedi gün sonra kafeslerdeki canlı ve ölü nimfler sayılarak elde edilen sonuçlar değerlendirilmiş ve uygulama yapılan dozların biyolojik etkinlikleri belirlenmeye çalışılmıştır. Denemeler sonucunda biyopestisitlerden azadirachtin'in denenilen en yüksek dozunun dahi (400 ml/ 100 lt) biyolojik etkinlik yönünden düşük etki gösterdiği (%30) belirlenmiştir. Spinosad'ın ise 35 ml/100 lt dozunun %71,2-78,7 oranında etkili olduğu tespit edilmiştir (Ak ve diğ., 2013).

Ayrıca *Lecanicillum muscarium*'un *R. simulans* üzerinde laboratuvar koşullarında nimf evresine ve doğal koşullarda nimf ve ergin evresine patojenitesini kontrol edilmiştir. Kivi meyvesinin ince dalları seçilip tülbent bezle kafes yapılmıştır. İlk kafese *R. simulans*'ın 10 nimfi eklenmiştir. İkinci kafes *R. simulans*'ın 10 ergini ile oluşturulmuştur. Kafeslere *L. muscarium*'un  $1 \times 10^7$  konidia/ml içeren Lm4 süspansiyonundan standart plastik el spreyi ile püskürtülmüştür. Kontrol dal, yalnızca su ile muamele edilmiştir. 7 gün süresinde hasta nimf ve erginlerin sayısı kayıt edilmiştir. *L. muscarium*'un izolasyonlarının uygulanmasından 7 gün sonra mortalite oranının %50.95 - 74.76 arasında olduğu belirlenmiştir. Hastalığın 2, 3 ve 4. günlerinden sonra nimflerin ölüm oranı %15.86, %60.95 ve %85.71'dir. Yetişkinler 2. günde %5.55 ölüm oranına sahiptir. 4., 6. ve 8. günde ölüm oranları %16.82, %36.84 ve %56.31' dir. Nimfal evre erginlere göre daha çok duyarlıdır (Ak ve diğ., 2013).

*R. simulans* ile ilgili yapılan entomopatogen deneme çalışmaları sonucunda umut vadeden gelişmeler sağlandığını, bu bağlamda *L. muscarium*, *Conidiobolus coronatus* ve *Sporoxrix* sp. isimli funguslardan izole edilen üç ayrı preparatın mücadelede ön plana çıktığını, *Sporotrix* sp.'nin suni ortamda gelişimi çok yavaş olduğundan, kitle üretimi için



uygun olmadığını, bu sebeple *L. muscarium* ve *C. coronatus*'un üzerinde yoğunlaştığı belirtilmiştir. Ancak bu çalışmaların henüz laboratuvar ortamında denemelerinin yapıldığı, mevcut sahada uygulanmasının zaman alacağı belirtilmiştir (URL-4, 2013).

### **1.5. Çalışmanın Amacı**

Çalışmadaki başlıca amacımız son yıllarda Karadeniz Bölgesi'nde öncelikle çay başta olmak üzere birçok sebze ve meyveye zarar veren *R. simulans*'ın popülasyonunu azaltmaktır. Bunun için biyolojik mücadele açısından önemli olan bilgilerin edinilmesi, zararlının bakteriyal florasının belirlenmesi, floradadaki mevcut bakterilerin fizyolojik, biyokimyasal, moleküler testleri yapılarak analiz edilmeleri ve zararlıya karşı kullanılacak etkin bakteriyal ajanın tespit edilmesi amaçlanmaktadır.

Araştırma sonucunda zararlıyı kontrol altına alabilecek bir bakterinin tespit edilmesi tek kimyasal kullanılmadan üretimi yapılan ve Türkiye'de sadece Doğu Karadeniz Bölgesinde üretilen çayın daha verimli ve kaliteli olmasını sağlayacaktır. Diğer taraftan Türkiye'de üretilen çay kimyasal madde kullanılmadan üretimine devam edecektir. Böylece kimyasal ilaçların çevreye verdiği zarar azaltılmış olacaktır. Ayrıca çiftçilerin çay dışında ürettikleri sebze ve meyvedeki böceğin zararı da kontrol altına alınabilecektir.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Örneklerin Toplanması

Bu çalışmada *R. simulans* nimfleri Haziran, Temmuz 2012’de, *R. simulans* erginleri ise Ağustos 2012’de Trabzon’un Of ilçesinde araziden toplanmıştır.

Örnekler özellikle çay, fasulye, asma ve mısır bitkileri üzerinden yakalanıp, nimfler 10’arlı erginler 5’erli olarak, hava alması için delinmiş plastik kaplara konulup laboratuvara getirilip çalışmalarda kullanılmak üzere yetiştirilmiştir. Böceklerin besini olarak asma yaprağı ve çay yaprağı kullanılmıştır.

### 2.2. Bakteri İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Laboratuvara getirilen canlı *R. simulans* nimflerinden 20 adet, steril petri kapları içerisine konularak %70’lik etil alkol ile 10 saniye yüzey sterilizasyonuna maruz bırakıldı. Steril saf su bulunan petrilere nimfler alınarak alkol uzaklaştırıldı. Daha sonra tüpün üzerine 3 ml nütrient broth besiyeri ilave edildi. Steril bir homojenizatör ile nimflerin iyice ezilmesi sağlandı. Elde edilen karışım bir tülbent vasıtasıyla süzülerek, süzüntü başka bir tüpe alındı. Bu karışımdan 10 µl, 50 µl ve 100 µl alınarak ayrı ayrı nütrient agar besiyerine ekim yapıldı, petriker 30°C’lik etüve konuldu. Elde edilen bu karışımdan ayrıca 1,5 ml alınıp, endorf mikrosantrifüj tüp içerisinde 80°C’de 10 dakika bekletildi. Bundan da 10 µl, 25 µl ve 50 µl alınarak üç ayrı nütrient agar besiyerine ekim yapıldı. Böylece yüksek sıcaklığa dayanıklı bakterilerin izolasyonu sağlandı. Hem 80°C’den alınarak, hemde direkt ekimden kalan karışımlar ayrı ayrı 30 ml nütrient broth bulunan erlene eklendi. 30°C’de 3 saat inkübe edildiler. Bu inkübasyonun amacı, karışımda çok düşük sayıda olabilecek mikroorganizmaların sayısını artırarak, sonraki ekimde tespit edilmelerini kolaylaştırmaktır. 3 saat sonra alınan karışım 4 kez seyreltmeye tabi tutuldu. Her tüpten 25 µl ve 50 µl alınarak ayrı ayrı nütrient agar besiyerine ekim yapıldı. Nütrient agar besiyerine yapılan ekimlerin hepsi 30°C’lik etüvde 2 gün süreyle inkübe edildi.

### **2.2.1. Saf Kùltürlerin Hazırlanması ve Stoklanması**

İnkübasyondan sonra nùtrient agar besiyeri üzerinde büyüyen bakteriyel koloniler, binoküler mikroskop altında incelendi. Farklı renk ve morfolojiye sahip olanlar dikkatlice seçilerek çizgi ekimleri yapıldı. Elde edilen kùltürler, isimlendirilerek, sonraki çalışmalarında kullanılmak üzere – 80 °C’de stoklandı.

## **2.3. Bakteriyal İzolatların Boyama ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi**

### **2.3.1. Gram Boyama**

Gram boyama, bakterileri hücre duvarlarının fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre Gram pozitif ve Gram negatif olmak üzere iki büyük gruba ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Gram boyama için 16-24 saatlik taze kùltürler kullanıldı. Temiz lamın üzerine bir damla serum fizyolojik su damlatıldı. Steril öze yardımıyla bir koloniden alınan örnek, suyla homojen bir şekilde dağıtılarak smear hazırlandı, hemen ardından fikse edildi. Hazırlanan smear üzerine kristal viyoleto boyası damlatılıp 1 dakika bekletildi. İyot-lugol çözeltisi ile yıkanarak kristal viyoleto uzaklaştırıldı. Smeara tekrar iyot-lugol çözeltisi damlatılarak 1 dakika bekletilip, saf su ile yıkanarak iyot-lugol çözeltisi uzaklaştırıldı. Smearın üzerine aseton-alkol çözeltisi damlatılarak 20 - 30 saniye beklenip, saf su ile yıkandı. Son olarak safranin damlatıldı ve 1 dakika bekletildi. Smear saf su ile yıkanarak kendi halinde kurumaya bırakıldı. Kuruyan smearlar mikroskop yardımıyla incelendi. Mor renkli bakteriler Gram pozitif, pembe-kırmızı renkli bakteriler ise Gram negatif olarak değerlendirildi (Cappuccino ve diğ., 1992).

### **2.3.2. Endospor Boyama**

Endosporlar, bazı bakterilerin uygun olmayan şartlarda oluşturdukları yapılardır. İzolatların endospor oluşturup oluşturmadığını, eğer oluşturuyorsa endosporun hücre içersindeki pozisyonunu belirlemek için yalnız Gram pozitif izolatlar nutrient broth besiyerine ekildi. 48-72 saat 30°C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından bakteriyal smear hazırlandı, alevden geçirilerek tespit edildi. Hazırlanan smearlar lam

üzerini kaplayacak şekilde filtre kağıdıyla kapatılarak, malaşit yeşiliyle 5 dk boyunca su buharı üzerinde boyandı. Daha sonra dH<sub>2</sub>O ile yıkandı ve 30-60 saniye safranin ile muamele edildi. Tekrar dH<sub>2</sub>O ile yıkanarak açık havada kurutuldu. Mikroskop altında incelenerek kırmızı renkli hücreler içerisinde yeşile boyanmış sporların varlığı araştırıldı (Cappuccino ve diğ., 1992).

## **2.4. Bakteriyal İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi**

### **2.4.1. Bakteriyal İzolatların Optimum Büyüme Sıcaklıklarının Belirlenmesi**

İzolatların maksimum ve minimum büyüme sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla yapılmış bir testtir. İzolatlar nütrient sıvı besiyerine ekilerek 10° C, 30° C, 40° C, 45° C, 50° C'lerde inkübe edildi. 30° C ve üzerindeki sıcaklıklar için 1 gün, 20° C'nin altındaki sıcaklıklar için 3 gün inkübe edilerek maksimum ve minimum büyüme sıcaklıkları ortaya çıkarıldı (Sneath ve diğ., 1968).

### **2.4.2. İzolatların NaCl İhtiyaçlarının Belirlenmesi**

İzolatlar, NaCl ihtiyaçlarının belirlenmesi amacıyla % 3, 5, 7, 9 oranlarında NaCl içeren 3 ml nütrient sıvı besiyerine inoküle edildi. 30° C'de 48 saat 200 g'de inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyondan sonra, hangi oranda tuz ihtiva eden besiyerinde üreme olmuş ise o orandaki tuzda izolatların üreyebildiği sonucuna varıldı (Sneath ve diğ., 1968).

### **2.4.3. İzolatların Büyüebildiği pH'ın Belirlenmesi**

İzolatların büyüebildiği minimum ve maksimum pH değerlerini belirleyebilmek için, izolatlar farklı pH değerlerine (4-12) sahip 3 ml nütrient sıvı besiyerine inoküle edildi. 30° C'de 48 saat 200 g'de inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyondan sonra üreme olup olmadığı spektrofotometrede OD600'de ölçümler yapılarak belirlendi.

#### **2.4.4. Katalaz Testi**

Bakteriler, aerobik solunum sırasında hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve bazı durumlarda ise tamamen toksik olan süperoksitler üretmektedir. Böylece bu ürünlerin zararlı etkisinden kurtulmak için bu maddeleri yıkan katalaz ve peroksidaz enzimlerini üretirler. İzolatların katalaz enzimini üretilip üretilmediğini belirlemek için triptik soy agar besiyeri hazırlandı ve ekim yapıldı.  $30^\circ C$ 'lik etüvde 48 saat inkübasyondan sonra petrideki bakterilerin üzerine % 3'lük  $H_2O_2$  çözeltisi ilave edildi ve oluşan gaz kabarcıkları pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Cappuccino ve diğ., 1992).

#### **2.4.5. Oksidaz Testi**

Mikroorganizmalarda sitokrom oksidazın varlığının belirlenmesi için kullanılır. Oksidaz testi için Microbiology Bactident Oxidase (Merck) stripleri kullanıldı. İzolatlar triptik soy agar besiyerinde çizgi ekim yapıldı ve  $30^\circ C$ 'lik etüvde 48 saat inkübe edildi. Stripin uygulama bölgesi tek koloni üzerine dokunduruldu. 20-60 saniyede renk değişimi gözlemlendi. Oluşan mavi-mor renk pozitif sonuç olarak kaydedildi.

#### **2.4.6. Nişasta Hidroliz Testi**

Enzim aktivitesini görmek için nişasta agar besiyerine çizgi ekim yapılarak  $30^\circ C$ 'de etüvde 2-7 gün bekletilir. İnkübasyon sonunda nişasta agarda oluşan kolonilerin üzeri lügol ile kaplanır. Koyu kahverengi rengin oluşumu nişastanın hidroliz olduğunu, mavi rengin oluşumu ise nişastanın hidroliz olmadığını gösterdi (Benson, 1985).

#### **2.4.7. API Test Kitleri ile Bakteriyal İzolatların Tanımlanması**

##### **2.4.7.1. API 20E Panel Test Sistemi**

API20E, 21 minyatür hale getirilmiş biyokimyasal test ve veri tabanı kullanan Enteriobacteriaceae ve zor üremeyen Gram negatif çomaklar için standart hale getirilmiş tanımlama sistemidir (Tablo 1). Örneklerden bir gün önce triptik soy agar besiyerine çizgi

ekim yapıldı. 16 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra steril spatula yardımıyla alınan koloni “API Suspension Medium” besiyerinde süspansiyon haline getirildi. Hazırlanan tepsi kuyucuklarına nemli atmosfer sağlanması için 5 ml steril saf su koyulup, inkübasyon kutusunun uzun çıkıntısına izolat numaraları yazıldı. Steril pens ile API20E stribi tepsiye yerleştirildi. Homojen bir karışım olan süspansiyon tüplerde hava kabarcığı kalmayacak şekilde strip hafifçe öne eğilerek kuyucuklara dağıtıldı. 30°C’lik etüvde 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, metabolizma sonucu kendiliğinden ya da reaktiflerin eklenmesiyle oluşan renk değişimi okuma tablosuna göre değerlendirildi. Sonuçlar bilgisayar ortamında tanımlama programı kullanılarak elde edildi.

Tablo 1. API 20 E panel test sisteminin içerdiği testler

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

### 2.4.7.2. API 50 CHB Panel Test Sistemi

API 50 CHB mikroorganizmaların karbonhidrat metabolizmasının çalışmasını sağlayan 50 biyokimyasal testten oluşan standart bir sistemdir (Tablo2). API 50 CHB/E medium ile *Enterobacteriaceae* ve *Vibronaceae* ilgili türleri ile *Bacillus* türleri için API 50 kullanılır.

Bir gece önceden triptik soy agar besiyerine örnekler ekim yapıldı. İnkübasyondan sonra steril bir spatula ile alınan bakteriler API 50 CHB/E medium besiyerine aktarılarak süspansiyon haline geldi. Bir inkübasyon kutusu hazırlandı (tepsi ve kapak). Tepsinin uzatılmış kısmına suş referansı kaydedildi. Yaklaşık 10 ml distile suyu tepsinin kuyucuklarına nemli bir ortam oluşturmak için dağıtıldı. Stripleri paketten çıkarılıp inkübasyon tepsisine konuldu. Bakteriyel süspansiyonlar steril pipet kullanılarak 50 tüpe dağıtıldı. 30°C’de 24 ve 48 saat not alınacak şekilde inkübasyona bırakıldı. 0. tüp negatif kontrol olarak belirlendi ve diğer tüplerdeki renk değişimine göre (-) ya da (+) değer verildi. Eğer tüplerde renk değişimi varsa (+), renk değişimi yoksa (-) sonuç olarak değerlendirildi. Verilerin bilgisayar ortamında, izolatların tür seviyesinde tanımlamalarını sağlandı.

Tablo 2. API 50 CHB panel test sisteminin içerdiği testler

Test	Adı
GLY	Gliserol
ERY	Erythriol
DARA	D-arabinose
LARA	L-arabinose
RIB	D-ribose
DXYL	D-ksiloz
LXYL	L-ksiloz
ADO	D-adonitol
MDX	Metil-βD-ksilopiranosid
GAL	D-galaktoz
GLU	D-glukoz
FRU	D-fruktoz
MNE	D-mannoz
SBE	L-sorboz

Tablo 2'nin devamı

RHA	L-ramnoz
DUL	Dulsitol
INO	İnosidol
MAN	D-mannitol
SOR	D-sorbitol
MDM	Metil- $\alpha$ D-mannopiranosid
MDG	Metil- $\alpha$ D-glukopiranosid
NAG	N-asetilglukozamin
AMY	Amigdalın
ARB	Arbutin
ESC	Eskulin-ferrik sitrat
SAL	Salisin
CEL	D-selibioz
MAL	D-maltoz
LAC	D-laktoz (bovineorgine)
MEL	D-melibioz
SAC	D-sakkaroz (sukroz)
TRE	D-trehaloz
INU	İnulin
MLZ	D-melezitoz
RAF	D-rafinoz
AMD	Amidon (starch)
GLYG	Glikojen
XLT	Ksilitol
GEN	Gentiobioz
TUR	D-turanose
LYX	D-liksoz
TAG	D-tagatoz
DFUG	D-fruktoz
LFUC	L-fruktoz
DARL	D-arabitol
LARL	L-arabitol
GNT	Potasyum glukonat
2KG	Potasyum 2-ketoglukonat
5KG	Potasyum 5-ketoglukonat



## 2.5. Bakteriyal İzolatların Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi

### 2.5.1. Genomik DNA İzolasyonu

Bakteriler bir gece önceden 3 ml Leura-Bertani (LB) sıvı besiyerine ekim yapıldı. 30°C'de 16 saat süresince inkübasyona bırakıldı. Bu işlem için DNA izolasyon kiti (Promega- Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System) kullanıldı. 16 saatlik inkübasyonun ardından ependorf tüplere gece kültüründen 1 ml alınıp, 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatantı uzaklaştırılan tüpler içerisine 480 µl 0.5M EDTA ilave edilip, vortekslendi. Çözünen pelletin üzerine 120 µl 10 mg/ml lizozim ilave edildi. 37 °C'de 1 saat bekletildi. Daha sonra 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 600 µl "Nuclei Lysis Solution" eklenip karıştırıldı. 80 °C'de 5 dakika bekletilip soğutuldu. 3 µl "20 mg/ml RNase Solution" ilave edilip tüpler 2-5 kez alt üst edildikten sonra 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Oda sıcaklığına geldiğinde tüplere 200 µl "Protein Precipitation Solution" ilave edildi. 20 saniye vortekslendikten sonra 30 dakika buzda bekletilip 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant boş ependorflara alınıp, pellet atıldı. Süpernatantlara 600 µl izopropanol ilave edildi ve pellet oluşuncaya kadar alt üst edildi. 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. 600 µl etanol ilave edilip, alt üst edildi. 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar uzaklaştırıldıktan sonra etanolün iyice uzaklaşması için pellet açık havada kurumaya bırakıldı. Son olarak pellet 100 µl "DNA Rehidration Solution"da çözüldü ve 65°C'de 1 saat bekletildi. 4°C'de muhafaza edildi (Demeli, 2012).

### 2.5.2. 16S rDNA Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

16S rRNA genleri, herbir izolattan saflaştırılan genomik DNA'dan UNI16S-L (5'-ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA-3') ileri ve UNI16S-R (5'-ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3') geri primerleri kullanılarak PCR yardımıyla çoğaltıldı. Çoğaltma işlemi 200 µl'lik tüplerde "Bio-Rad Thermal Cycler" da gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin 5 µl'si 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %1'lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme sistemi (Gel Logic; Kodak) ile görüntülendi. Enzim koşullarına göre reaksiyon ve program Tablo 3'deki gibi oluşturuldu.

Tablo 3. PCR reaksiyonu ve programı

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95°C	2 dakika	1 döngü
Denatürasyon	95°C	0.5-1 dakika	
Bağlanma	42°C-65°C	0.5-1 dakika	25-35 döngü
Uzama	72°C	1dk/kb	
Son uzama	72°C	5 dakika	1 döngü

### 2.5.3. 16S rDNA Gen Bölgesinin pGEM-T Vektörüne Klonlanması

PCR yöntemi ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgeleri pGEM-T Easy Vector System (Promega)'i kullanılarak pGEM-T vektörüne klonlandı. Reaksiyon, 10 µl 2X Rapid Ligation Buffer, 8 µl Insert DNA, 1 µl pGEM-T Easy Vector ve 1µl T4 DNA Ligase içerecek şekilde karıştırıldı ve 16°C'de en az 16 saat bekletildi. Daha sonraki işlemlerde kullanmak üzere 4 °C'de saklandı.

### 2.5.4. Kompetent Hücre Hazırlanması

Daha önceden Nutrient Agar (NA) besiyerine ekilmiş *Escherichia coli* JM101 suşundan 3 ml Leura-Bertani (LB) besiyerine ekim yapıldı. 37°C'de 16 saat büyümeye bırakıldı. Hücrelerin yoğunluğu 600 nm dalga boyunda 0,1 olacak şekilde 30 ml LB besiyerine aşılandı. Hücreler, 37°C'de en az 1 saat, 600 nm dalga boyunda 0,45-0,55 arasında olana kadar sallamalı inkübatörde bekletildi. İstenilen yoğunluk elde edildikten sonra süspansiyonun tamamı steril falkon tüpe boşaltıldı. Soğutmalı santrifüjde 4°C'de 4.500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 10 ml 100 mM'lık soğuk CaCl<sub>2</sub> ile çözdürüldü, 30 dakika buzda bekletildi. Daha sonra tekrar 4 °C'de 4.500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 2 ml 100 mM'lık soğuk CaCl<sub>2</sub> ile çözdürüldü. Hazırlanan kompetent hücre 4 °C'de en az 2 saat bekledikten sonra 2 gün süresince kullanıldı.

### 2.5.5. 16S rDNA Gen Bölgesinin Kompetent *E. coli* JM101'e Aktarımı

Steril ependorfa 200 µl kompetent hücre ile 3-4 µl ligasyon ürününden koyuldu. 30 dakika buzda bekletildi. 46 °C'de 2 dakika ısıyla muamele edildikten sonra 1 ml LB sıvı besiyeri ilave edilip, 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 6.000 g'de 3 dakika santrifüj edildi. Yaklaşık 50 µl kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırıldı, pellet dikkatlice çözdürüldü. LB<sup>Amp</sup> agar besiyerine 40 µl X-Gal (40 mg/ml), 40 µl IPTG (24 mg/ml) ve transform olmuş hücre yayma ekim yapıldı. 37 °C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra içerisine plazmid alan hücreler beyaz koloni oluşturduğu için klonlar kolaylıkla seçildi.

### 2.5.6. Rekombinant Plazmidlerin İzolasyonu ve Restriksiyon Endonükleaz (*EcoRI*) ile Muamelesi

Transformasyon sonucunda petri üzerinde oluşan beyaz ve mavi renkteki kolonilerden beyaz koloniler seçildi, içerdikleri plazmid DNA'larını izole etmek için LB<sup>Amp</sup> sıvı besiyerine ekim yapıldı. 37°C'de 200 rpm'de gece boyu inkübe edildi. Plazmit DNA'larının izolasyonu için hızlı miniprep methodu kullanıldı. Gece kültürlerinden 1,5 µl ependorfa alınıp 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücrelerin üzerindeki süpernatant ependorfta 50 µl kalacak şekilde uzaklaştırıldı, pellet çözününceye kadar vortekslendi. Üzerine 300 µl TENS tamponu (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.1 N NaOH, % 0.5 SDS) ilave edildi. 4-5 kez alt üst edilen tüpe 150 µl 3M Sodyum Asetat pH 5.2 koyuldu. Tekrar alt üst edilen tüp 10-15 dakika buzda bekletildi. Ardından 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Bu aşamada süpernatant boş tüpe alınarak üzerine 900 µl % 96'luk etanol ilave edilip, 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra %70'lik etanol ilave edildi ve 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı. Etanolün iyice uçması için açık havada bekletildi. Son olarak pellet 30 µl TE tamponunda çözüldü ve yürütme işleminde görüntünün daha net görünmesini sağlamak için 3 µl RNaz ilave edildi. Elde edilen plazmidlerin 5 µl'si 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %1'lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme sistemi (Gel Logic; Kodak) ile görüntülendi. İzole edilen plazmid DNA'larının 16S rRNA gen bölgesini içerip içermediğini tespit etmek için plazmid DNA'ları *EcoRI* restriksiyon enzimi ile muamele edildi. 10 µl DNA, 0,5 µl DNA, 0.5 µl *EcoRI* (promega), 2 µl enzime

ait reaksiyon tamponu ve 7,5 µl dH<sub>2</sub>O içerecek şekilde 20 µl'lik hacimlerde reaksiyonlar hazırlandı. 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. 65 °C'de 10 dakika enzimin inaktive olması için bekletildi. Ardından %1'lik jelde elektroforez yapıldı. Klonlanan DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi.

### 2.5.7. Klonların İçerdiği DNA Parçalarının Baz Dizilimlerinin Belirlenmesi

Klonlanan DNA fragmentlerini içeren klonlar 5 ml LB<sup>Amp</sup> sıvı besiyerine ekildi, 37°C'de 200 rpm'de 16 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra elde edilen kültürler 14.000 rpm'de 2 dakika boyunca çöktürüldükten sonra plazmit izolasyon kiti (Fermantas-GeneJET Plasmid MiniPrep Kit) kullanılarak izole edildi. Plazmid DNA konsantrasyonları OD<sub>260</sub>'da belirlendi. Tüm DNA'lardan 20 µl'lik hacim içinde 20 ng/µl konsantrasyonlarında hazırlandı. Tüpler etiketlendikten sonra Macrogen Firmasına (Hollanda) DNA bazlarının analiz edilmesi için gönderildi.

### 2.5.8. Elde Edilen Baz Dizilerinin İncelenmesi

Sekans sonucunda elde edilen 16S rDNA gen bölgesinin baz dizilimi gen bankasında bulunan diğer dizilerle karşılaştırıldı ve Mega (0.05) programı ile de bu dizilerin birbirleriyle olan benzerlikleri incelendi. Bu programda analiz için Maksimum Parsimoni metodu, filogeni testi için 1.000 tekrarlı Bootstrap metodu kullanılarak izolatların filogenetik ağacı çizildi, ağaçta 50'nin üzerindeki benzerlikler gösterildi. Sonuçlar değerlendirildi (Demeli, 2012).

### 2.5.9. Bakteriyal İzolatların *cry* Gen İçeriklerinin Belirlenmesi

Bakteriyal izolatların *cry* gen içeriklerinin tespiti için PCR yapıldı. Bu çalışmada kullanılan genel primerler: *cry* 1 (ileri, 5'-CAT GAT TCA TGC GGC AGA TAA AC-3'; geri, 5'- TTG TGA CAC TTC TGC TTC CCA TT-3') , *cry* 2 (ileri, 5'- GTT ATT CTT AAT GCA GAT GAA TGG G-3'; geri, 5'-CGG ATA AAA TAA TCT GGG AAA TAG T-3'), *cry* 3 (ileri, 5'-CGT TAT CGC AGA GAG ATG ACA TTA AC-3'; geri, 5'-CAT CTG TTG TTT CTG GAG GCA AT-3') ve *cry* 4 (ileri, 5'GCA TAT GAT GTA GCG

AAA CAA GCC -3'; geri, 5'- GCG TGA CAT ACC CAT TTC CAG GTC C-3') [197]. PCR reaksiyonu Tablo 8'de gösterildiği gibi gerçekleştirildi. Kullanılan primerler sayesinde çoğaltılan baz uzunlukları; *cry* 1, 277 bp; *cry* 2, 689-701; *cry* 3, 589-604 bp ve *cry* 4, 498 bp şeklindedir.

## 2.6. Bakteriyal İzolatların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

Bakterilerin insektisidal aktiviteleri *R. simulans* üzerinde belirlendi. Trabzon'un Of ilçesinden toplanan *R. simulans*'in nimfleri ve erginleri üzerinde bioassay yapıldı.

### 2.6.1. Bakteriyal Süspansiyonların Hazırlanması

İnsektisidal etki çalışmalarında uygulanacak bakteriyal süspansiyonların hazırlanması için bu çalışma kapsamında izole edilen bakteriyal izolatlar 1 gece önceden 5 ml nütrient sıvı besiyerine ekildi ve 30°C'de 200 rpm'e ayarlı sallayıcıda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda bakteri yoğunluğu spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçülerek 1,89 ( $1,8 \times 10^9$  bakteri/ml) olacak şekilde ayarlandı. Elde edilen çözelti ayrı tüplerde seyreltmeye ( $1,8 \times 10^8$ ,  $1,8 \times 10^7$ ,  $1,8 \times 10^6$ ,  $1,8 \times 10^5$ ) tabi tutuldu. Elde edilen her bir bakteri için 5 seyreltik 3.000xg'de 10 dakika santrüfuj edildi ve pellet 5 ml fosfat tampon solüsyonu (PBS)'nda çözüldü (Ben-Dov, 1995).

Ayrıca bioassay çalışmalarında pozitif kontrol amaçlı KTU Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilen *Bacillus thuringiensis tenebrionis* Xd3, *Bacillus thuringiensis kurstaki* MnD, *Bacillus thuringiensis kurstaki* BnBt ve *Serratia marcescens* BnSm de kullanıldı.

### 2.6.2. Bakteriyal İzolatların Böcekler Üzerindeki İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

*R. simulans*'tan izole edilen bakteriyal izolatların asma yapraklarının yüzeyine uygulanmasıyla denemeler kuruldu. Tüm izolatların farklı 5 dozu için, 10'ar nimf kullanılarak bioassayler kuruldu. Bu farklı dozlar için 10 nimf steril hava alan kaplara konuldu, bakteriyal izolatlarla muamele edilen asma yaprakları eklendi ve  $26 \pm 2$  °C'de % 60 nem içiren iklim dolaplarına bırakıldı. *R. simulans* nimfi asma yaprakları ile

beslendikçe, meydana gelen ölümler 10 gün boyunca günlük olarak kayıt edildi. Kontrol için 10 nimf sadece su ile muamele edilmiş asma yaprağı ile beslenmesi sağlandı. Deneyler farklı zamanlarda (Haziran'da başlayıp Temmuz'un 15'ine kadar) üç tekrarlı yapıldı.

Her bakterinin farklı 3 dozu ( $1,8 \times 10^9$ ,  $1,8 \times 10^8$ ,  $1,8 \times 10^7$ ) için 5'er tane erginle bioassayler kuruldu. Bu farklı dozlar için 5 ergin steril hava alan kaplara konuldu, bakteriyal izolatlarla muamele edilen asma yaprakları eklendi ve  $26 \pm 2$  °C'de % 60 nem içiren iklim dolaplarına bırakıldı. *R. simulans* ergini asma yaprakları ile beslendikçe, meydana gelen ölümler 10 gün boyunca günlük olarak kayıt edildi. Deneyler farklı zamanlarda 3 tekrarlı olarak (Temmuz'un 15'inden Ağustos ayı sonuna kadar) yapıldı.

### **3. BULGULAR**

Bu alışmada Trabzon ilinin Of ilçesinden toplanan *Ricania simulans* zararlısından 2'si *Bacillus* cinsine ait toplam 16 bakteri izolasyonu yapıldı. Bakteriyal izolatlara Rs 1-16 şeklinde kodlama yapıldı. İzole edilen bakterilerin morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler tanımlamaları yapılarak insektisidal etkileri araştırıldı.

#### **3.1. *Ricania simulans* Zararlısından Bakteri İzolasyonu**

İzolasyon alışmaları sonucunda *Ricania simulans* zararlısından koloni şekli, rengi ve büyüklüğü gibi farklı morfolojik özelliklerinden yararlanarak 16 kültüre edilebilir bakteriyal izolatlar izole edildi. 16 farklı kültüre edilebilir bakteriyal izolat Rs1, Rs2, Rs3, Rs4, Rs5, Rs6, Rs7, Rs8, Rs9, Rs10, Rs11, Rs12, Rs13, Rs14, Rs15 ve Rs16 olarak kodlandı.

#### **3.2. Bakteriyal İzolatların Boyama ve Morfolojik Özellikleri**

Bakteriyal izolatlara Gram boyama ve endospor boyama yapılması ile 5 bakterinin Gr + olduğu, bunların 4'ünde spor taşıdığı tespit edildi. Koloni morfolojilerine göre seçilen bu bakterilerin binoküler mikroskop altında incelemeleri yapıldı, koloni şekli ve rengi belirlendi. Ayrıca mikroskop ile bakterilerin boyları ölçüldü. Bu bakterilerin boyama ve morfolojik özellikleri Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Bakterilerin boyama ve morfolojik özellikleri

Kodlar	Koloni Şekli	Koloni Rengi	Hücre Şekli	Gram Boyama	Spor Boyama
Rs1	Dalgalı	Sarı	Basil	Gr (-)	-
Rs2	Yuvarlak	Sarı	Basil	Gr (-)	-
Rs3	Yuvarlak	Sarı	Basil	Gr (-)	-
Rs4	Dalgalı, oval	Sarı	Basil	Gr (-)	-
Rs5	Yuvarlak	Sarı	Basil	Gr (-)	-
Rs6	Yuvarlak	Sarı	Basil	Gr (-)	-
Rs7	Yuvarlak	Sarı	Basil	Gr (-)	-
Rs8	Yuvarlak	Sarı	Basil	Gr (-)	-
Rs9	Yuvarlak	Sarı	Basil	Gr (+)	-
Rs10	Yuvarlak, oval	Sarı	Basil	Gr (-)	-
Rs11	Dalgalı	Koyu krem	Basil	Gr (+)	Merkezi, +
Rs12	Dalgalı	Kremsi	Basil	Gr (+)	Merkezi, +
Rs13	Yuvarlak	Sarı	Basil	Gr (-)	-
Rs14	Yuvarlak	Sarı	Basil	Gr (-)	-
Rs15	Dalgalı	Kremsi	Basil	Gr (+)	Merkezi, +
Rs16	Dalgalı	Kremsi	Basil	Gr (+)	Merkezi, +

Spor boyama sonuçları ışık mikroskopunda fotoğraflandı. Şekil 14'te bazı izolatlara ait spor görüntüleri görülmektedir.



Şekil 14. Rs15 ve Rs16 numaralı izolatlara ait spor boyama görüntüleri

### 3.3. Bakteriyal İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Mikroorganizmaların büyüme aralıklarını ve optimum büyüme özelliklerini belirlemek için pH, NaCl ve sıcaklık testleri yapıldı. Bu testlerin sonuçları Tablo 5 ve 6'da verilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre bakteriler en iyi alkali, %3'lük tuz çözeltilisinde ve optimum 30°C'de büyüdükleri gözlemlendi.



Tablo 5. Bakteriyal izolatların fizyolojik özellikleri

Kodlar	NaCl Testi				Sıcaklık Testi			
	3%	5%	7%	9%	30°C	40°C	45°C	50°C
Rs1	+	+	-	-	+	+	-	-
Rs2	+	-	-	-	+	-	-	-
Rs3	+	-	-	-	+	-	-	-
Rs4	+	-	-	-	+	+	-	-
Rs5	+	+	+	-	+	-	-	-
Rs6	+	-	-	-	+	-	-	-
Rs7	+	+	+	-	+	-	-	-
Rs8	+	-	-	-	+	-	-	-
Rs9	+	-	-	-	+	-	-	-
Rs10	+	-	-	-	+	-	-	-
Rs11	+	+	-	-	+	+	+	-
Rs12	+	+	+	+	+	+	+	+
Rs13	+	-	-	-	+	-	-	-
Rs14	+	-	-	-	+	-	-	-
Rs15	+	+	+	-	+	+	-	-
Rs16	+	-	-	-	+	+	-	-

Tablo 6. pH testi

Kodlar	pH4	pH5	pH7	pH8	pH9	pH10	pH11	pH12	pH13
Rs1	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Rs2	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Rs3	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Rs4	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Rs5	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Rs6	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Rs7	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Rs8	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Rs9	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Rs10	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Rs11	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Rs12	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Rs13	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Rs14	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Rs15	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Rs16	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Bazı enzimlerin varlığı veya yokluğu, bazı enzimlerin üretilip üretilmediği ve izolatların bazı organik maddeleri fermente edip edemediklerini belirlemek bakteri sistematiği açısından büyük önem taşımaktadır. İzolatların bu enzimleri üretilip üretilmediklerinin belirlenmesi amacıyla katalaz, oksidaz ve nişasta hidroliz testleri yapıldı. Bu testler ve sonuçları Tablo 7’de verilmektedir.

Katalaz testi sonucunda Rs8’in katalaz enzimi üretilmediği, Rs10’un katalaz enzimini zayıf ürettiği gözlemlendi. Rs1, Rs2, Rs3, Rs4, Rs5, Rs6, Rs7, Rs9, Rs11, Rs12, Rs13, Rs14, Rs15 ve Rs16’nın ise katalaz enzimi ürettiği tespit edildi.

Oksidaz testi sonucunda Rs1, Rs11, Rs13, Rs15 ve Rs16 izolatlarının oksidaz üretilmediği, Rs7 ve Rs12’nin oksidazı zayıf ürettiği, Rs2, Rs3, Rs4, Rs5, Rs6, Rs8, Rs9, Rs10 ve Rs14 izolatlarının ise oksidazı ürettiği tespit edildi.

Nişasta hidroliz testi sonucunda ise Rs11, Rs15 ve Rs16’da nişastanın hidroliz olduğu, Rs1, Rs2, Rs3, Rs4, Rs5, Rs6, Rs7, Rs8, Rs9, Rs10, Rs12, Rs13 ve Rs14’te lügol ilavesinden sonra siyah zon oluşması nişastanın hidroliz olmadığını gösterdi (Şekil 15).



Şekil 15. Nişasta hidroliz testi; soldaki negatif sonuç (Rs4), sağdaki pozitif sonuç (Rs15).

Tablo 7. Bakteriyal izolatların biyokimyasal özellikleri

Biyokimyasal Testler			
Kodlar	Katalaz	Oksidaz	Nişasta Hidroliz
RS1	+	-	-
RS2	+	+	-
RS3	+	+	-
Rs4	+	+	-
Rs5	+	Z+	-
Rs6	+	+	-
Rs7	+	+	-
Rs8	-	+	-
Rs9	+	-	-
Rs10	Z+	+	-
Rs11	+	-	+
Rs12	+	Z+	-
Rs13	+	+	-
Rs14	+	+	-
Rs15	+	-	+
Rs16	+	-	+

Z: Zayıf

### 3.3.1. API 20 E ve API 50 CHB Panel Test Sistemiyle Tespit Edilen Özellikler

API 20 E test panellerine izolatlar, 30°C'de 16 saat süresince, inkübe edildikten sonra sistemin belirlediği renk değişimine göre sonuçlar belirlenir. Bazı kuyucuklara ise ayıraç eklenerek sonuçlar incelenir (Şekil 16 ve Tablo 8).



Şekil 16. Ekimleri yapılmış olan API testleri; a) API 20 E test panel sistemi, b) API 50 CHB test panel sistemi

Tablo 8. Bakteriyal izolatların API 20 E sonuçları

Testler	Rs1	Rs2	Rs3	Rs4	Rs5	Rs6	Rs7	Rs8	Rs10	Rs13	Rs14
ONPG	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
ADH	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
LDC	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIT	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
IND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
VP	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
GEL	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
GLU	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
MAN	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
SAC	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
MEL	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
AMY	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
ARA	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-
OX	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NO <sub>2</sub>	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
N <sub>2</sub>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
MOB	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
McC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OF-O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OF-F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

API 50 CHB test küpüllerine yapılan inkübasyondan sonra 0. tüp kontrol olarak alınarak renk değişikliğine göre değerlendirme yapıldı. Eğer tüplerde renk değişimi varsa (+), renk değişimi yoksa (-) sonuç olarak değerlendirildi (Şekil 16 ve Tablo 9).

Tablo 9. Bakteriyal izolatların API 50 CHB sonuçları

Testler	Rs9	Rs11	Rs12	Rs15	Rs16
GLY	+	+	+	+	+
ERY	-	-	-	-	-
DARA	-	-	-	-	-
LARA	+	-	+	-	-
RIB	+	+	+	+	+
DXYL	+	-	+	-	-
LXYL	-	-	-	-	-
ADO	-	-	-	-	-
MDX	-	-	-	-	-
GAL	+	+	+	-	-
GLU	+	+	+	+	+
FRU	+	+	+	+	+
MNE	+	+	+	-	-
SBE	-	-	+	-	-
RHA	-	-	-	-	-
DUL	-	-	-	-	-
INO	-	-	-	-	-
MAN	+	+	+	-	-
SOR	-	-	-	-	-
MDM	-	-	+	-	-
MDG	-	-	+	-	-
NAG	+	+	+	+	+
AMY	+	+	+	-	+
ARB	+	+	+	+	+
ESC	+	+	+	+	+
SAL	+	+	+	-	+
CEL	+	+	+	+	+
MAL	+	+	+	+	+
LAC	-	+	+	-	-
MEL	-	+	-	-	-
SAC	+	+	+	+	-
TRE	+	+	+	+	+
INU	-	-	-	-	-
MLZ	-	-	-	-	-
RAF	-	+	-	-	-
AMD	-	+	-	-	+
GLYG	+	+	-	+	+
XLT	-	-	-	-	-
GEN	-	+	+	-	-
TUR	+	-	+	-	-
LYX	-	-	-	-	-
TAG	-	-	+	-	-
DFUC	-	-	-	-	-
LFUC	-	-	-	-	-
DARL	-	-	-	-	-
LARL	-	-	-	-	-
GNT	-	-	-	-	-
2KG	-	-	-	-	-
5KG	-	-	-	-	-

### 3.4. Bakteriyal İzolatların Moleküler Özellikleri

#### 3.4.1. 16S rDNA Dizi Analizi Sonuçları

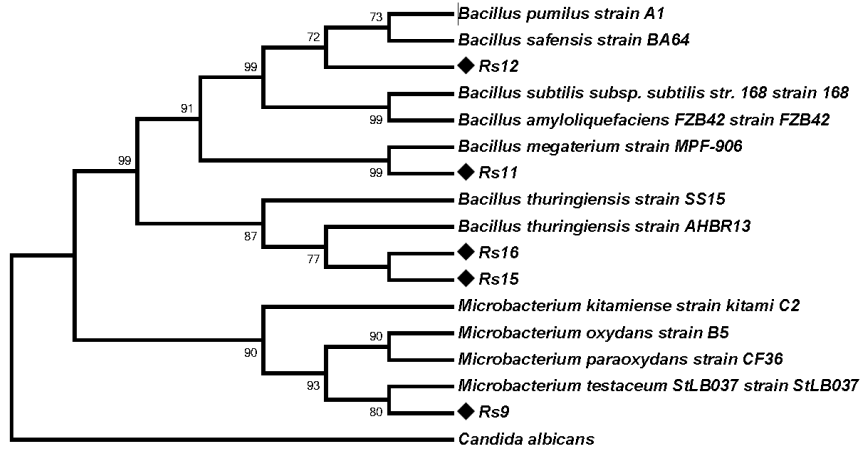
Tüm bakteri izolatlarından elde edilen genomik DNA'dan PCR yardımıyla 16S rDNA geni çoğaltılması sonucunda 1400- 1500 bp büyüklüğünde bantlar gözlemlendi. pGEM-T Easy klonlama vektörüne kopyalanan 16S rDNA gen bölgelerinin nükleotit sırası MacroGen tarafından belirlendi (Ek 2). Sonuçlar değerlendirilerek filogenetik ağaç Mega 5 programı kullanılarak Neighbor-Joining analizinden yararlanılarak çizildi. Filogenetik ağaç verileri ve 16S rDNA sonuçları birbirlerini desteklemektedir (Tablo 10).

Tablo 10. İzolatların 16S rDNA sekanslarının gen bankasındaki sıralarla karşılaştırmaları

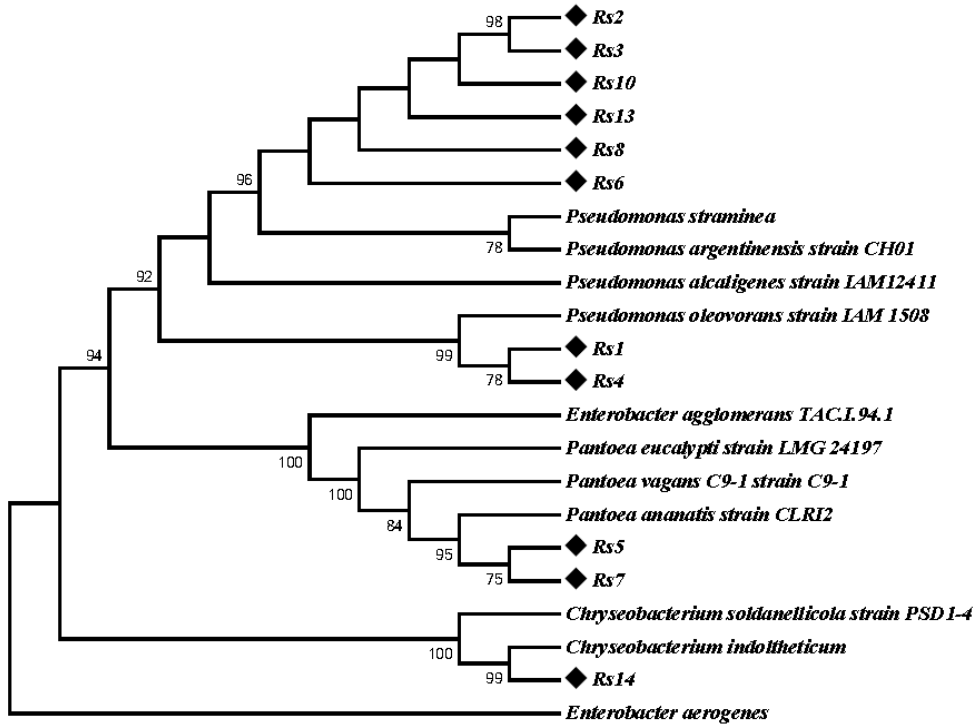
İzolat	Tür ve Cinsler	Benzerlik oranı (%)	Kayıt Numarası
Rs1	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	99	GQ250598.1
	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	99	AY623816.1
	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	99	KC477209.1
	<i>Pseudomonas sp.</i>	99	HQ840775.1
Rs2	<i>Pseudomonas argentinensis</i>	99	EU723817.1
	<i>Pseudomonas flavescens</i>	99	EU221398.1
	<i>Pseudomonas fulva</i>	99	AY741159.1
	<i>Pseudomonas straminea</i>	99	AB060135.1
	<i>Pseudomonas parafulva</i>	98	AB060133.1
	<i>Pseudomonas putida</i>	98	AB294558.1
Rs3	<i>Pseudomonas argentinensis</i>	99	EU723817.1
	<i>Pseudomonas flavescens</i>	99	EU221398.1
	<i>Pseudomonas fulva</i>	99	AB046997.1
	<i>Pseudomonas straminea</i>	99	AB060135.1
	<i>Pseudomonas parafulva</i>	98	AB060133.1
	<i>Pseudomonas putida</i>	98	CP003738.1
Rs4	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	99	GQ250598.1
	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	99	KC477209.1
	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	99	AY623816.1
Rs5	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	98	JX067680.1
	<i>Pantoea agglomerans</i>	98	FJ971873.1
	<i>Pantoea vagans</i>	98	NR_102966.1
	<i>Pantoea ananatis</i>	97	NR_074740.1
Rs7	<i>Pantoea vagans</i>	98	CP002206.1
	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	98	JX067684.1

Tablo 10'un devamı

Rs7	<i>Pantoea agglomerans</i>	98	HQ242739.1
	<i>Pantoea ananatis</i>	98	CP003085.1
Rs8	<i>Pseudomonas argentinensis</i>	99	EU723817.1
	<i>Pseudomonas flavescens</i>	99	EU221398.1
	<i>Pseudomonas fulva</i>	99	AY741159.1
	<i>Pseudomonas straminea</i>	99	AB060135.1
	<i>Pseudomonas parafulva</i>	98	AB060133.1
	<i>Pseudomonas putida</i>	98	AB294558.1
Rs9	<i>Microbacterium testaceum</i>	99	AP012052.1
	<i>Microbacteriaceae bacterium</i>	99	DQ490448.1
	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	99	AJ581908.1
	<i>Microbacterium oxydans</i>	99	DQ350825.1
Rs10	<i>Pseudomonas argentinensis</i>	99	EU723817.1
	<i>Pseudomonas flavescens</i>	99	EU221398.1
	<i>Pseudomonas fulva</i>	99	AY741159.1
	<i>Pseudomonas straminea</i>	99	AB060135.1
	<i>Pseudomonas putida</i>	98	AB294558.1
	<i>Pseudomonas parafulva</i>	98	AB060132.1
Rs11	<i>Bacillus megaterium</i>	97	FJ380122.1
	<i>Bacillus horikoshii</i>	97	KF054756.1
Rs12	<i>Bacillus pumilus</i>	99	NR_074977.1
	<i>Bacillus aerophilus</i>	99	KC414715.1
	<i>Bacillus safensis</i>	99	KC934873.1
Rs13	<i>Pseudomonas argentinensis</i>	98	EU723817.1
	<i>Pseudomonas flavescens</i>	98	EU221398.1
	<i>Pseudomonas fulva</i>	98	AY741159.1
	<i>Pseudomonas straminea</i>	98	AB060135.1
	<i>Pseudomonas putida</i>	98	AB294558.1
	<i>Pseudomonas parafulva</i>	97	AB060132.1
Rs14	<i>Chryseobacterium indoltheticum</i>	99	NR_042926.1
	<i>Chryseobacterium ginsengisoli</i>	98	JN852949.1
Rs15	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99	KC683724.1
	<i>Bacillus thuringiensis serovar kurstaki</i>	99	EU153549.1
	<i>Bacillus cereus</i>	99	GQ381280.1
Rs16	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99	KC683724.1
	<i>Bacillus thuringiensis serovar kurstaki</i>	99	EU153549.1
	<i>Bacillus cereus</i>	99	CP001186.1



Şekil 17. Gram pozitif izolatların 16S rDNA dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı



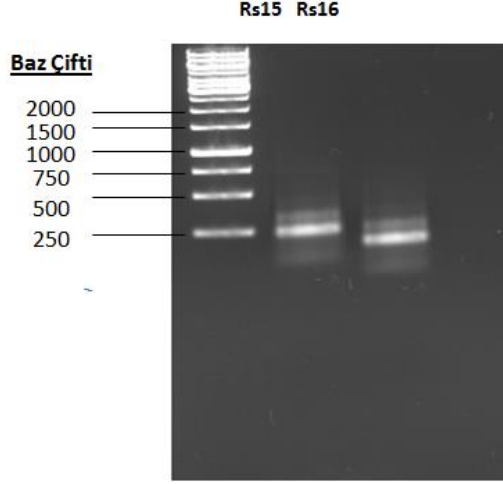
Şekil 18. Gram negatif izolatların 16S rDNA dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı

### 3.4.2. Bakteriyal İzolatların cry Gen İçerikleri

*Bacillus thuringiensis*'e ait bakterilerin kristal proteinlerini kodlayan genleri belirleyebilmek için *cry1*, *cry2*, *cry3* ve *cry4*'e ait genel primerler kullanılarak PCR



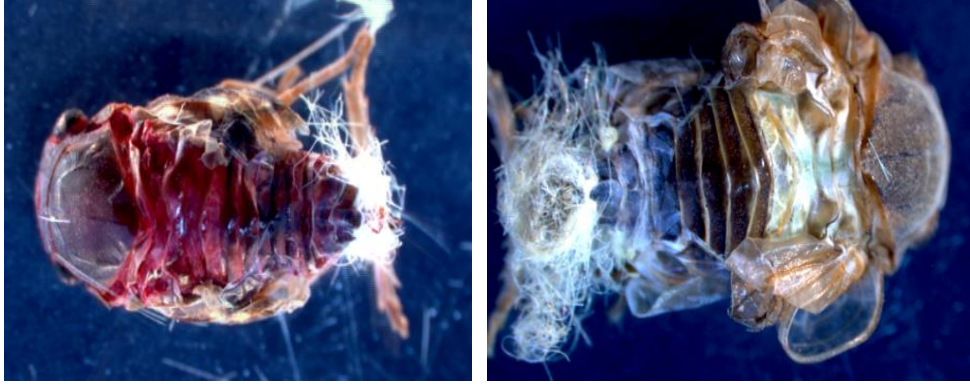
yapıldı. PCR sonucunda kılavuz suşlarla karşılaştırma yapılarak aynı büyüklükte olan bantlar belirlendi. Rs15 ve Rs16 kodlu izolatlarda *cryI* geni saptandı (Şekil 17).



Şekil 19. Tespit edilen *cry* genlerinin agaroz jel görüntüsü

### 3.5. Bakteriyal İzolatların İnsektisidal Etkileri

İnsektisidal aktivite çalışmaları için Trabzon ilinin Of ilçesinden toplanan larvalar ve erginlerle laboratuvar ortamında denemeler yapıldı. Elde edilen 16 izolat için ve de KTU Biyoloji bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarında bulunan 4 bakteri (*Bacillus thuringiensis tenebrionis* Xd3, *Bacillus thuringiensis kurstaki* MnD, *Bacillus thuringiensis kurstaki* BnBt ve *Serratia marcescens* BnSm) için insektisidal aktivite çalışması yapıldı. Zararlıdan izole edilen bakteriler 5 ayrı dozda ( $1,8 \times 10^9$ ,  $1,8 \times 10^8$ ,  $1,8 \times 10^7$ ,  $1,8 \times 10^6$ ,  $1,8 \times 10^5$ ) *Ricania simulans*'ın nimfi, 3 ayrı dozda ise ( $1,8 \times 10^9$ ,  $1,8 \times 10^8$ ,  $1,8 \times 10^7$ ) ergini üzerine 3 tekrarlı yapıldı. Diğer 4 bakteri için ise tek dozda ( $1,8 \times 10^9$ ) ve 3'er tekrarlı olarak çalışmalar tamamlandı. Her bir deneme 10 gün sürdü ve 10. gün sonunda sonuçlar kaydedildi.



Şekil 20. Solda enfeksiyonlu nimf, BnSm ile enfekte *R. simulans* nimfi, sağda ise sağlıklı nimf görülmektedir.



Şekil 21. Solda enfeksiyonlu ergin, BnSm ile enfekte *R. simulans* nimfi, sağda ise sağlıklı ergin görülmektedir.

Nimf evresinde yapılan insektisidal aktivite çalışmalarında en fazla etki %82 ile Rs4 nolu izolataın  $1,8 \times 10^9$  seyreltme oranında görüldü (Şekil 20).

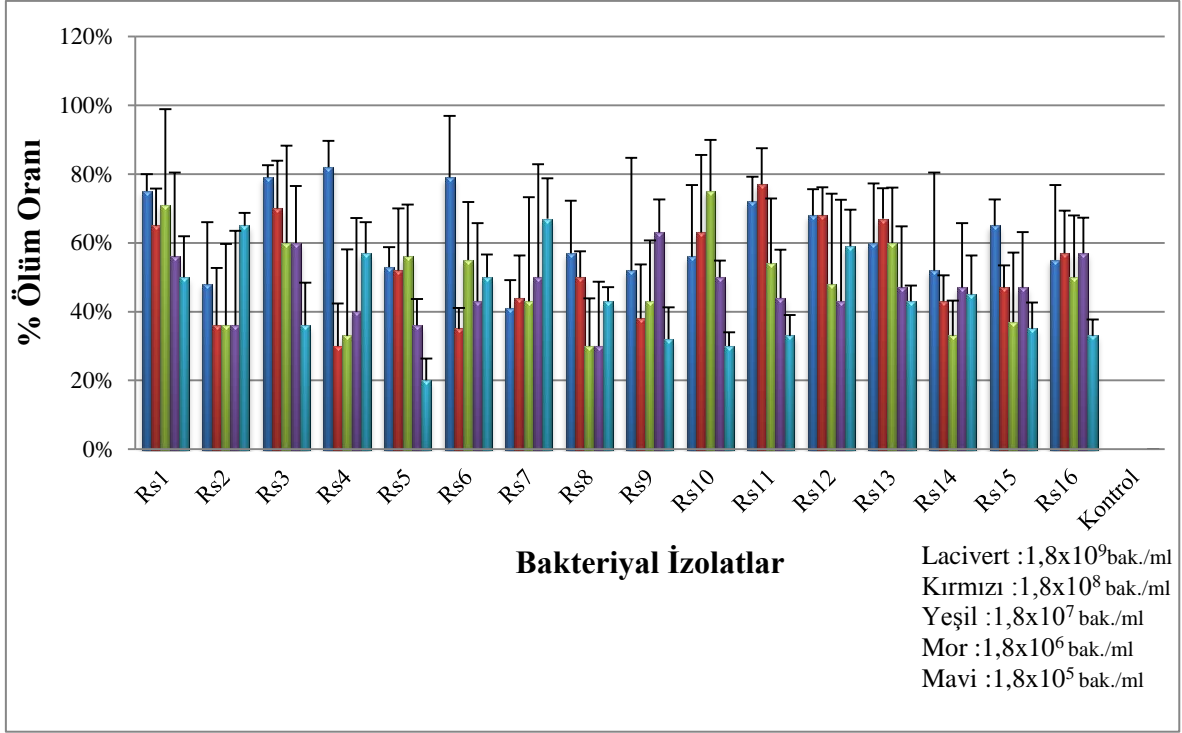
$1,8 \times 10^9$  seyreltme oranında Rs3 %79 ile, Rs6 %79 ile, Rs1 %75 ile, Rs11 %72 ile, Rs12 %68 ile, Rs15 ise %65 ile aktivite gösterir.

$1,8 \times 10^8$  seyreltme oranında en fazla etki Rs11'da %77 ile görüldü. Rs3 %70 ile, Rs12 %68 ile, Rs13 %67 ile, Rs1 %65 ile, Rs10 %63 ile Rs4'ü izledi.

$1,8 \times 10^7$  seyreltme oranında Rs10 %75 ile, Rs1 %71, Rs3 ve Rs13 %60 oranı ile etki gösterir.

$1,8 \times 10^6$  seyreltme oranında Rs9 %63, Rs3 %60 oranında insektisidal aktivite görüldü.

$1,8 \times 10^5$  seyreltme oranında Rs7 %67, Rs2 ise %65'lik ölüm oranıyla ile zararlı üzerinde etki görüldü.



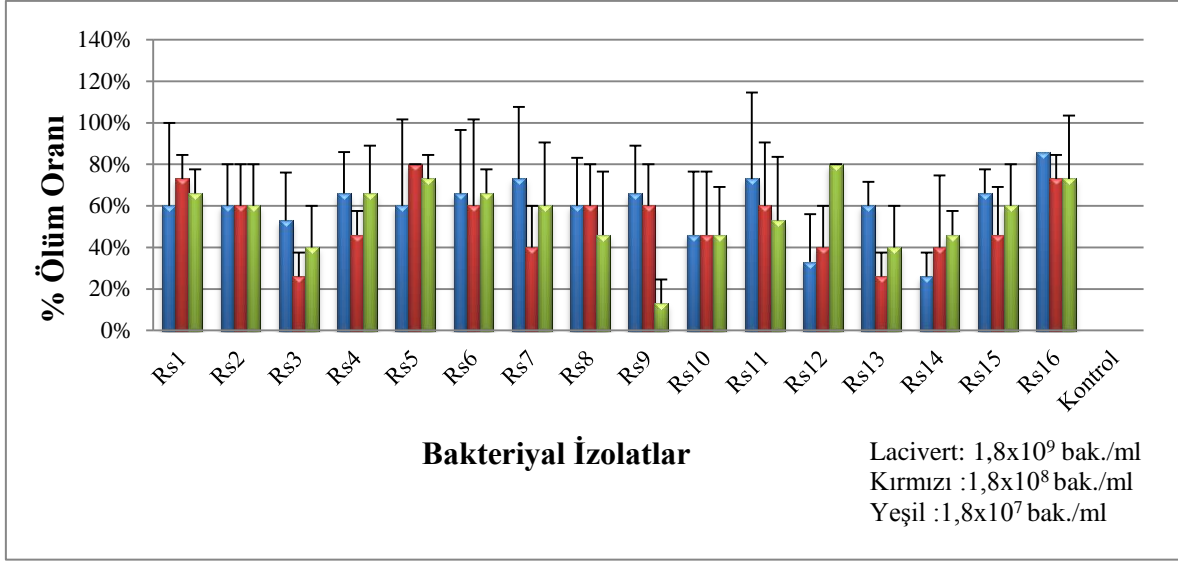
Şekil 22. Zararlıdan elde edilen izolatların *R. simulans* nimfleri üzerinde insektisidal etkisi.

Ergin evresinde yapılan insektisidal aktivite çalışmalarında en fazla etki %86 ile Rs16 nolu izolatın  $1,8 \times 10^9$  seyreltme oranında görüldü (Şekil 21).

$1,8 \times 10^9$  seyreltme oranında Rs7 %73 ile, Rs11 %73 ile, Rs6 %66 ile, Rs9 %66 ile, Rs15 %66 ile, Rs1, Rs2, Rs8, Rs13 %60 ile aktivite gösterir.

$1,8 \times 10^8$  seyreltme oranında en fazla etki Rs5'de %80 ile görüldü. Rs1 %73 ile, Rs16 %73 ile, Rs2 %60 ile, Rs6 %60 ile, Rs8 %60 ile, Rs9 %60 ile, Rs11 %60 ile Rs5'i takip etti.

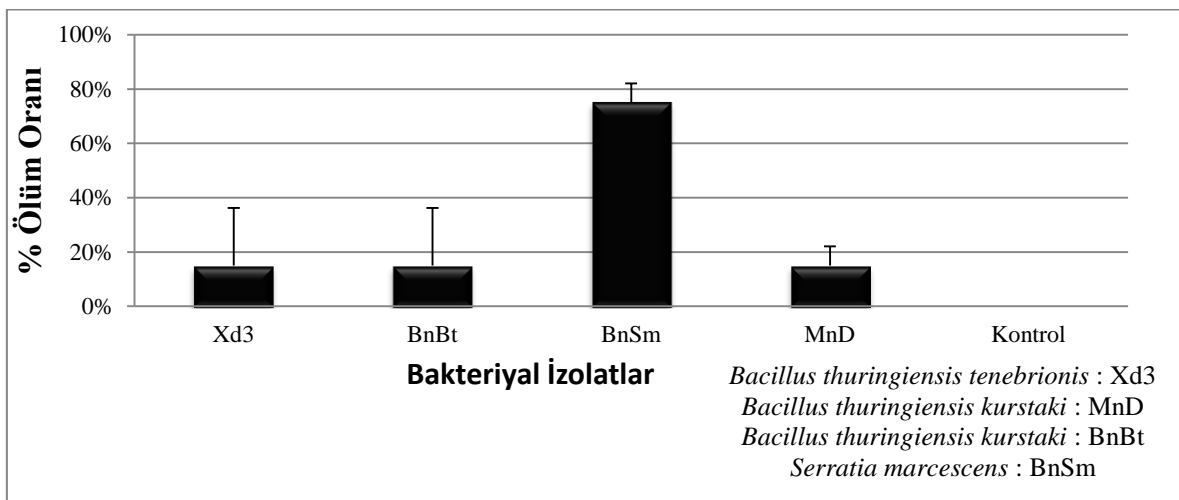
$1,8 \times 10^7$  seyreltme oranında Rs12 %80 ile, Rs1 %66 ile, Rs4 %66 ve Rs2, Rs7, Rs15 %60 oranı ile etki görüldü.



Şekil 23. Zararlıdan elde edilen izolatların *R. simulans* erginleri üzerine insektisidal etkisi

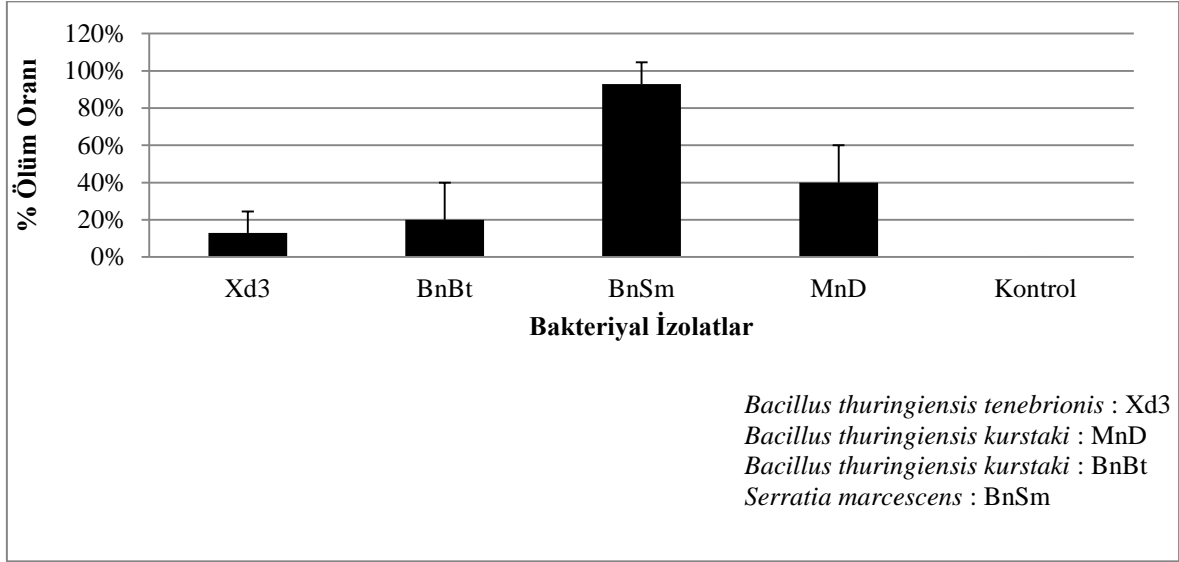
Xd3 Coleoptera grubu böceklerde, MnD ve BnBt Lepidoptera ve Diptera grubu böceklerde aktivite göstermektedir. Bunun nedeni bu gruplardaki böceklere karşı *cry* genlerinin oluşturduğu aktif ICP'ler sayesinde.

Bu gruplarla yapılan çalışmalarda *R. simulans*'ın nimf evresinde en fazla insektisidal aktivite *Serratia marcescens*'te (BnSm) %75 oranı ile görülmüştür. Xd3'te %15 oranında, MnD'de %15 oranında, BnBt'de ise %15 oranında zararlı üzerinde etki gözlenmiştir (Şekil 22).



Şekil 24. *B. thuringiensis* suşları (Xd3, MnD, BnBt) ve *S. marcescens* (BnSm) bakterilerinin *R. simulans* nimfleri üzerine insektisidal etkisi

*R. simulans*'ın ergin evresi üzerine yapılan çalışmada BnSm %93 oranıyla tüm insektisidal aktivite çalışmalarında en yüksek etkiyi gösterdiği belirlendi. MnD %40 oranında, BnBt %20 oranında, Xd3 ise %13 oranında bioassaylerde etki gösterdi (Şekil 23).



Şekil 25. *B. thuringiensis* suşları (Xd3, MnD, BnBt) ve *S. marcescens* (BnSm) bakterilerinin *R. simulans* erginleri üzerindeki denemeleri

#### 4. TARTIŞMA

Hiç şüphesiz herhangi bir toplumun reel olarak en önemli sektörü ve faaliyet alanlarından biri tarım sektörüdür. Tarımsal faaliyetler insanın hayatı ile başlamış ve insan yaşadığı sürece sonsuza kadar devam edecektir (Er, 2009). Başta iklim özellikleri olmak üzere koşulların uygunluğu nedeniyle Türkiye, sanayi bitkileri tarımı için çok elverişli bir ülkedir (Doğanay, 1998). Ülkemizde tarımı yapılan çok çeşitli sanayi bitkilerinden birisini de çay bitkisi oluşturur (Doğanay, 2006). Çay Türkiye’de doğal yetişme koşullarını, özellikle Doğu Karadeniz Bölümü kıyı kesimlerinde bulmuştur. Çok sayıda ailenin temel geçim kaynağı olan çay tarımı çözüm bekleyen bir takım sorunlarla karşı karşıyadır (Doğanay, 2006).

Ayrıca Avrupa ülkeleri arasında çay bitkisinde kimyasal ilaç kullanmayan tek ülke konumunda olan Türkiye için zararlı böceklere karşı biyolojik mücadele uygun bir yoldur. *R. simulans*’ın sadece çayda değil Doğu Karadeniz Bölgesi’nde tarımı gerçekleştiren birçok bitkide de zararı mevcuttur. Özellikle kimyasal madde kullanılmadan zararlının kontrol altına alınması gerekliliği biyolojik mücadeleyi zorunlu kılmaktadır.

*R. simulans*’ın ağız yapısından dolayı bitkilerin öz suyunu emerek kurumalarına neden olduğu, bu aşamada salgıladıkları tatlı maddeden dolayı bitkileri kirlettikleri, yumurtalarını tipik olarak gövde altına açtıkları yaralara bıraktıkları belirtilmektedir (URL-4, 2013). Böcek her türlü bitkiyi yumurta bırakmak için kullanmaktadır. Bu bitkiler arasında çay, asma, fasulye, mandalina, kivi sayılabilir. Ayrıca beslenme içinde kivi, çay, fasulye, salatalık gibi tarımsal ürünleri tercih etmektedir. Gürcistan’da turunçgillerde önemli hastalık etmeni olan ve ülkemizde “Göçüren Hastalığı” olarak bilinen “Tristeza” etmenini diğer bitkilere bulaştırdığı belirlenmiştir (URL-4, 2013).

Şu ana kadar zararlı üzerinde mücadele yöntemleri içinde yalnız mekanik mücadele yapılmış, bununla da yeterli bir sonuç alınamamıştır. Zararlı ile mücadele yapılabilmesi için zararlının biyolojisinin belirlenmesi amacıyla Artvin, Rize ve Trabzon sahil kesiminde araştırmalar yapılmıştır. Yapılan ilaç denemelerinde *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii*, *Sporotrix* sp., *Conidiobolus coronatus* isimli entomopatojenler ile Dopteril ve Spinosad etkili maddeli LASER isimli bitki koruma ürünleri farklı dozlarda uygulanmıştır. Yapılan bu çalışma ile özellikle *Lecanicillium muscarium*’un *R. simulans* üzerinde laboratuvar koşullarında nimf evresine ve doğal koşullarda nimf ve ergin evresine

patojenitesinin kontrol edilmesi amaçlanmıştır. Denemeler hem çay ve hem de kivi bitkisi kullanılmıştır (Güçlü ve diğ., 2011). Çalışmada laboratuvar şartlarında ele edilen başarı arazi koşullarında elde edilememiştir.

Böceklerle karşı kullanılan biyolojik kontrol ajanları arasında bakterilerde *Bacillus* türleri büyük önem taşımaktadır. Bunun için *R. simulans* adlı zararlıdan bakteriyal izolasyon gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma *R. simulans* üzerinde yapılan ilk bakteriyal izolasyon çalışmasıdır. Yapılan literatür araştırmalarında zararlıya ait hiçbir bakteri çalışması belirlenmemiştir.

Yapılan bakteriyal izolasyonda büyüme özellikleri, morfolojileri dikkate alınarak 16 bakteri izole edilmiştir. Bu bakterilerin 9 tanesi tür seviyesinde, 7 tanesi cins seviyesinde tanımlanmıştır.

Bakterilerin tür tayin çalışmalarında morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal testler kullanılmıştır. Daha kesin ve doğru sonuçlara ulaşabilmek için 16S rDNA dizin analizi, API 20E ve API 50 CHB tanımlama sistemlerinden faydalanılmıştır. Bu sistemler biyokimyasal testler yapılırken zaman ve masraftan bize kazanç sağlamıştır. Çünkü sistemler klasik yöntemlere göre, örnekler için eşit şartlar oluşturup kolaylıkla analiz edilebilmek üzere kullanıcıya sunulmuştur.

16S rDNA dizisi genotipik tanımlama için hedef bir bölgedir. Hem tür seviyesinde hemde hızlı tanımlama için oldukça önemlidir (Springer, 1996).

Rs1 nolu izolataın 16S rDNA sonuçlarının önerdiği bakterilerden *Pseudomonas oleovorans* olduğu yapılan biyokimyasal testlerden anlaşılmaktadır. *Pseudomonas psychrotolerans* inositol, mannitol, sorbitol, ramnoz testinin (+) olması ile *Pseudomonas oleovorans*'den ayrılmaktadır. *Pseudomonas oryzihabitans* ise sorbitol testinin (+), arjinin testinin (-) olması ile *Pseudomonas oleovorans*'den ayrılmaktadır (Kodama, 1985; Hauser, 2004). İnsektisidal aktivite çalışmalarında Rs1 kodlu izolat zararlının nimf evresinde %75 oranında  $1,8 \times 10^9$  bakteri/ml dozunda, ergin evrede ise %73 ile  $1,8 \times 10^8$  bakteri/ml oranında etkili olduğu görülmüştür.

Rs2 nolu izolataın 16S rDNA sonuçlarının önerdiği bakterilerden *Pseudomonas parafulva* olarak karar verildi. *Pseudomonas straminea* arjinin testi (-), mannitol testinin (+) olması ile, *Pseudomonas argentinensis* 41°C'de büyüebilmesi, mannitol testinin (+) sonuç vermesi ile, *Pseudomonas fulva* jelatin testi (-) olması ile, *Pseudomonas putida* ise jelatin testinin (-) sonuç vermesi ile, *Pseudomonas flavescens* arjinin (-), jelatin (-) olmasıyla *Pseudomonas parafulva*'dan ayrılmaktadır (Hildebrand ve diğ., 1994;

Romanenko, 2005). Rs2 kodlu izolatin insektisidal aktivite çalışmasında nimf evresinde %65 oranında  $1,8 \times 10^5$  bakteri/ml dozunda, ergin evrede ise her dozda %60 oranında etkili olduğu görülmüştür.

Rs3 nolu izolatin 16S rDNA sonuçlarının önerdiği bakterilerden *Pseudomonas parafulva* olarak karar verildi. *Pseudomonas straminea* arjinin testi (-), mannitol testinin (+) olması ile, *Pseudomonas argentinensis* 41°C'de büyüebilmesi, mannitol testinin (+) sonuç vermesi ile, *Pseudomonas fulva* jelatin testi (-) olması ile, *Pseudomonas putida* ise jelatin testinin (-) sonuç vermesi ile, *Pseudomonas flavescens* arjinin (-), jelatin (-), lizin (-) olmasıyla *Pseudomonas parafulva*'dan ayrılmaktadır. Rs3 kodlu izolatin insektisidal aktivitesi nimf evresinde %79 oranında  $1,8 \times 10^9$  bakteri/ml dozunda, ergin evrede ise %53 ile  $1,8 \times 10^9$  dozunda etkili olduğu görülmüştür (Hildebrand, 1994; Romanenko, 2005).

Rs4 nolu izolatin 16S rDNA sonuçlarının önerdiği bakterilerden tür seviyesinde tanımlama yapılamamıştır ve cins seviyesinde *Pseudomonas* sp. olarak tespit edilmiştir. *Pseudomonas oleovorans* melibiose testi (+), sitrat testi (+) olduğu için, *Pseudomonas psychrotolerans* 4°C'de büyüebilmesi, mannitol (+), sorbitol, ramnoz zayıf (+), inositol (+) sonuç vermesi ile *Pseudomonas oryzihabitans* ise sorbitol (+) sonuç vermesi ile biyokimyasal testlerin yardımıyla cins seviyesinde tanımlama yapılabilmıştır (Kodama,1985; Hauser, 2004). İnsektisidal aktivite çalışmasında Rs4 kodlu izolat nimf evresinde %82 oranında  $1,8 \times 10^9$  bakteri/ml dozunda en etkili bakteri olduğu görülmüştür. Ergin evrede ise % 66 oranında  $1,8 \times 10^9$  bakteri/ml dozunda etki göstermiştir.

Rs5 ve Rs7 kodlu bakteriler *Pantoea* sp. olarak cins seviyesinde belirlendi. *Pantoea agglomerans*, Rs5 ve Rs7 kodlu bakteriler arjinin testine (+), inositol testine (-), melibiose testine (+) sonuç verdiği için, *Pantoea vagans*, Rs5 ve Rs7 kodlu bakterilerde arabitol testi (+), ornitin testi (-) olduğu için, *Pantoea ananatis*, Rs5 ve Rs7 kodlu bakteriler indol (-), arjinin testi (+), jelatin testi (+), inositol testi (-) sonuçlandığı için tür seviyesinde tanımlama yapılamamıştır. Bu iki bakteri için API 20 test sonuçları da *Pantoea* sp. olarak sonuç vermiştir (Brady, 2009; Delétoile, 2009). İnsektisidal aktivite çalışmasında Rs5 kodlu izolat nimf evresinde %56 oranında  $1,8 \times 10^7$  bakteri/ml dozunda etkili olduğu görülmüştür. Ergin evrede ise %80 oranında  $1,8 \times 10^8$  bakteri/ml dozunda etki göstermiştir. Rs7 nolu izolat ise nimf evresinde %50 oranında  $1,8 \times 10^6$  bakteri/ml dozunda, ergin evrede %73 ile  $1,8 \times 10^9$  bakteri/ml dozunda etkili olduğu görülmüştür.

Rs6 nolu izolatin 16S rDNA sonuçlarının önerdiği bakterilerden *Pseudomonas parafulva* olarak karar verildi. *Pseudomonas straminea* arjinin testi (-), jelatin testinin (-)



olması ile, *Pseudomonas argentinensis* 41°C’de büyüebilmesi, jelatin testinin (-), arjinin testinin (-) sonuç vermesi ile, *Pseudomonas fulva* jelatin testi (-) olması ile, *Pseudomonas putida* ise jelatin testinin (-) sonuç vermesi ile, *Pseudomonas flavescens* arjinin (-), jelatin (-), sukroz testinin (-), sitrat testinin (-) olmasıyla *Pseudomonas parafulva*’dan ayrılmaktadır (Hildebrand, 1994; Romanenko, 2005). Rs6 kodlu izolat insektisidal aktivite denemelerinde nimf evresinde %79 oranında  $1,8 \times 10^9$  bakteri/ml dozunda, ergin evrede %66 oranında aynı dozda etkili olduğu görülmüştür.

Rs8 nolu izolatin 16S rDNA sonuçlarının önerdiği bakterilerden *Pseudomonas sp.* olarak yapılan fizyolojik ve biyokimyasal testlerle belirlenebilmiştir. *Pseudomonas argentinensis* Rs8 nolu izolat triptofan deaminaz testinde (+), glukoz testinde (-), mannitol testinde (-), katalaz testinde (-) sonuç verdiği için, *Pseudomonas flavescens* Rs8 nolu izolat melibiose testi (+), jelatin testi (+) sonuçlandığı, *Pseudomonas fulva* Rs8 nolu izolat 41°C’de büyüebildiği, %8 NaCl’de büyüebildiği, lizin testi (+), jelatin testi (+), glukoz testi (-) olduğu için ve *Pseudomonas straminea* Rs8 nolu izolatin inositol testi (-) olduğu için cins seviyesinde karar verilmiştir (Hildebrand, 1994; Romanenko, 2005). Rs8 kodlu izolatin insektisidal aktivitesi nimf evresinde %57 oranında  $1,8 \times 10^9$  bakteri/ml dozunda, %60 oranında aynı dozda etkili olduğu görülmüştür.

Rs9 nolu izolatin 16S rDNA sonuçlarının önerdiği bakterilerden *Microbacterium paraoxydans* olduğuna API 50 CHB sisteminin yardımıyla karar verilmiştir. *Microbacterium testaceum*’dan H<sub>2</sub>S testi (+), glukoz testi (+) olmasıyla, *Microbacterium oxydans*’dan H<sub>2</sub>S testi (+), L arabinose testi (+) olmasıyla ayrılmaktadır (Schippers ve diğ., 2005; Kim ve diğ., 2008; Wu ve diğ., 2008; Madhaiyan ve diğ., 2010). İnsektisidal aktivitesi Rs9 kodlu izolatin nimf evresinde %63 oranında  $1,8 \times 10^6$  bakteri/ml dozunda, ergin evrede %66 oranında  $1,8 \times 10^9$  bakteri/ml dozunda etkili olduğu görülmüştür.

Rs10 nolu izolatin 16S rDNA sonuçlarının önerdiği bakterilerden yapılan fizyolojik ve biyokimyasal testlerle cins seviyesinde tanımlama yapılabilmektedir. *Pseudomonas argentinensis* jelatin testi (-), glukoz testinde (+), mannitol testinde (+) sonuç verdiği için, *Pseudomonas flavescens* 4°C’de büyüebildiği, sukroz testinde (+), melibiose testinde (+) sonuç vermesi gerektiği için, *Pseudomonas fulva* 4°C’de büyüebildiği, jelatin testi (-), glukoz testi (+), lizin testi (+) sonuç vermesi gerektiği için, *Pseudomonas straminea* 4°C’de büyüebildiği, inositol testi (+), melibiose testi (-) sonuç vermesi gerektiği için Rs10 nolu izolattan ayrılırlar (Hildebrand ve diğ., 1994; Romanenko, 2005). Rs10 kodlu

izolat insektisidal aktivite denemelerinde nimf evresinde %75 oranında  $1,8 \times 10^7$  bakteri/ml dozunda, ergin evrede her dozda %46 oranında etkili olduğu görülmüştür.

Rs11 nolu izolatın 16S rDNA sonuçlarının önerdiği bakterilerin ikisinden de API 50 CHB testi yardımıyla ayrıldığı belirlenmiştir. Rs11 *Bacillus* sp. olarak cins seviyesinde bırakılmıştır. *Bacillus megaterium* inositol testine (+), mannoz testine (+), ramnoz testine (+), riboz testine (-), laktoz testine (+), mannitol testine (-) sonuç verdiği için, *Bacillus horikoshii* koloni rengi sarı, laktoz (-), melibiose (-), rafinose (-) sonuç verdiği için Rs11'den ayrılmaktadır (Suresh ve diğ., 2004; Lee ve diğ., 2008). İnsektisidal aktivite denemelerinde Rs11 kodlu izolat nimf evresinde %77 oranında  $1,8 \times 10^8$  bakteri/ml dozunda, ergin evrede %73 oranında  $1,8 \times 10^9$  bakteri/ml dozunda etkili olduğu görülmüştür.

Rs12 nolu izolatın 16S rDNA sonuçlarının önerdiği bakterilerden *Bacillus safensis* olduğuna karar verildi. Rs12 için API 20 E sisteminin verdiği tanımlama bilgilerinden ve 16S rDNA sekans analiz verilerinin sonuçlar birbirini desteklemiştir. *Bacillus pumilus* Rs12 nolu izolatın jelatin testine (+), D riboz testine (+), D turanose testine (+), maltoz testine (+), metilalfaglukopiranosid testine (+) sonuç verdiği için, *Bacillus aerophilus* Rs12 nolu izolat  $45^\circ\text{C}$ 'de büyüdüğü için, N asetilglukozamin testine (+), D arabinose testine (-), D sellobiose testine (+), inulin testine (-), rafinose testine (-) sonuç verdiği için birbirinden ayrılmışlardır (Satomi ve diğ., 2006; Shivaji ve diğ., 2006; Suresh ve diğ., 2006). Rs12 kodlu izolat insektisidal aktivite çalışmalarında nimf evresinde %68 oranında  $1,8 \times 10^9$  dozunda, ergin evrede %80 oranında  $1,8 \times 10^7$  bakteri/ml dozunda etkili olduğu görülmüştür.

Rs13 nolu izolatın 16S rDNA sonuçları ve API 20 E testi değerlendirilerek cins seviyesinde tanımlaması yapılmıştır. 16S rDNA sonuçlarından *Pseudomonas argentinensis*'den sukroz testi (+), glukoz testi (-), mannitol testi (-), sitrat testi (+) sonuçlandığı için, *Pseudomonas flavescens*'den sukroz testi (+), arjinin testi (+), lizin testi (+) sonuç verdiği için, *Pseudomonas fulva*'dan glukoz testi (-) sonuçlandığı için, *Pseudomonas straminea*'dan arjinin (+), glukoz testi (-), sukroz testi (+), mannitol testi (-), lizin testi (+) olduğu için, *Pseudomonas putida*'dan glukoz testi (-) olduğu için ayrılmaktadır ve tür seviyesinde tanımlaması yapılamamıştır (Hildebrand ve diğ., 1994; Romanenko, 2005; Vanparys ve diğ., 2006). İnsektisidal aktivite çalışmalarında Rs13 kodlu izolat nimf evresinde %67 oranında  $1,8 \times 10^8$  dozunda, ergin evrede %60 oranında  $1,8 \times 10^9$  bakteri/ml dozunda etkili olduğu görülmüştür.

Rs14 izolatın 16S rDNA sonuçları ve API 20 E testi değerlendirilerek *Chryseobacterium indoltheticum* olduğuna karar verilmiştir. *Chryseobacterium scophthalmum* üre testi (+), indol testi (+) sonuç verdiği için, *Chryseobacterium soldanellicola* indol testi (+) olduğu için Rs14'ten ayrılmıştır (Hugo ve diğ., 2003; Young ve diğ., 2005; Park ve diğ., 2006; Beer ve diğ., 2006; Szoboszlay ve diğ., 2008). Rs14 kodlu izolat nimf evresinde %52 oranında  $1,8 \times 10^9$  dozunda, ergin evrede %46 oranında  $1,8 \times 10^7$  dozunda etkili olduğu görülmüştür.

Rs15 ve Rs16 kodlu izolatların 16S rDNA dizin analiz sonucuna göre, *Bacillus thuringiensis*'e % 99 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi. Bu izolatların yaklaşık 277 bp büyüklüğünde *cry1* içermesi ve API 50 CHB test sisteminin de bu sonucu desteklemesi ile Rs15 ve Rs16 kodlu izolatların *B. thuringiensis* olduğunu göstermiştir. Rs15 ve Rs16 kodlu izolatların biyokimyasal test sonuçlarındaki farklılıklar ise bu bakterilerin farklı suş olduğunu göstermektedir. İnsektisidal aktivite denemelerinde Rs15 kodlu izolat nimf evresinde %65 oranında  $1,8 \times 10^9$  dozunda etkili olduğu, ergin evrede ise %66 oranında aynı dozda etkili olmuştur. Rs16 nolu izolatın ise nimf evresinde %57 oranında  $1,8 \times 10^8$  dozunda etki görülmüştür. Ergin evrede ise %86 oranında  $1,8 \times 10^9$  dozunda bakteriler arasında en etkili olduğu görülmüştür.

Nimf evresinde %82 ile Rs4 nolu *Pseudomonas* sp., ergin evrede ise %86 ile Rs16 nolu izolat olan *Bacillus thuringiensis* en yüksek insektisidal aktivite göstermiştir.

Aynı bakteri için doz arttıkça ölüm oranı da ona bağlı olarak artmamıştır. Bu zararlının beslenme sırasında bakteriyi besinle birlikte alıp almamasına bağlanmıştır.

Ayrıca pozitif kontrol amaçlı KTU Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilen *Bacillus thuringiensis tenebrionis* (Xd3), *Bacillus thuringiensis kurstaki* (MnD), *Bacillus thuringiensis kurstaki* (BnBt) ve *Serratia marcescens* (BnSm) de kullanıldı.

Xd3 Coleoptera grubu böceklerde, MnD ve BnBt Lepidoptera ve Diptera grubu böceklerde aktivite göstermektedir. Bunun nedeni bu gruplardaki böceklere karşı *cry* genlerinin oluşturduğu aktif ICP'ler sayesinde.

Bu gruplarla yapılan çalışmalarda *R. simulans*'ın nimf evresinde en fazla insektisidal aktivite *Serratia marcescens*'te (BnSm) %75 oranı ile görülmüştür. Xd3'te %15 oranında, MnD'de %15 oranında, BnBt'te %15 oranında zararlı üzerinde etki gözlenmiştir.

*R. simulans*'ın ergin evresi üzerine yapılan çalışmada BnSm %93 oranıyla tüm insektisidal aktivite çalışmalarında en yüksek etkiyi göstermiştir. MnD %40 oranında, BnBt %20 oranında, Xd3 %13 oranında çalışmalarda etki göstermiştir.

## 5. SONUÇLAR

Bu çalışma sonucunda, ülkemizde Doğu Karadeniz Bölgesi'nde başta çay, mısır, kivi olmak üzere birçok tek ve çok yıllık bitki üzerinde zarara sebep olan *R. simulans*'dan 16 bakteriyal izolat elde edildi. Elde edilen bu izolatların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler özellikleri belirlenerek *R. simulans*'ın nimf ve erginleri üzerinde insektisidal etkileri tespit edildi. Çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir:

1. *R. simulans*'dan 16 bakteriyal izolat elde edildi. Bu izolatların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler özelliklerine göre karakterizasyonları yapıldı ve tanımlanmaları gerçekleştirildi.
2. Bunlardan 9 tanesi tür seviyesinde, 7 tanesi cins seviyesinde tanımlandı. Bu sonuçlara göre Rs1 *Pseudomonas oleovorans*, Rs2, Rs3 ve Rs6 *Pseudomonas parafulva*, Rs4, Rs8, Rs10, Rs13 *Pseudomonas* sp., Rs5 ve Rs7 *Pantoea* sp., Rs9 *Microbacterium paraoxydans*, Rs11 *Bacillus* sp., Rs12 *Bacillus safensis*, Rs14 *Chryseobacterium indoltheticum*, Rs15 ve Rs16 ise *Bacillus thuringiensis* olarak tanımlandı.
3. Rs15 ve Rs16 numaralı bakteriyal izolatların *Bacillus thuringiensis* türüne ait farklı suşlar olabileceğine karar verildi.
4. *Bacillus thuringiensis* olduğu belirlenen Rs15 ve Rs16 numaralı bakteriyal izolatların ikisinde *cry1* genini bulduklarını belirlendi.
5. İzolatlar arasında nimf evresinde en yüksek insektisidal aktivite Rs4 nolu izolat tarafından %82 ile, ergin evresinde ise Rs16 nolu izolat tarafından %86 ile meydana getirildi.
6. Farklı zararlı böceklerden izole edilmiş olan ve KTU Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilen bakteriler arasından *R. simulans*'ın nimfleri üzerinde en yüksek insektisidal aktivite *Serratia marcescens* (BnSm) tarafından %75 oranı ile, ergin evresi üzerine yapılan çalışmada ise %93 oranıyla tüm insektisidal aktivite çalışmalarında belirlenen en yüksek etkiyi gösterdi.
7. Böylelikle en yüksek öldürücü etkinin *S. marcescens* tarafından oluşturulduğu belirlendi.
8. Zararlıdan izole edilen bakterilerden ise Rs4 ve Rs16 nolu bakterilerde en yüksek ölüm oranı elde edildi. Rs4 nolu bakteri %82 ile nimf evresinde  $1,8 \times 10^9$  seyreltme

oranında, Rs16 nolu bakteri %86 ile ergin evresinde  $1,8 \times 10^9$  seyreltme oranında insektisidal aktivite gösterdi.

## 6. ÖNERİLER

Bu çalışmada, *R. simulans*'dan 16 farklı bakteriyal izolatlar elde edildi. Bunların 7'si cins 9'u tür seviyesinde tanımlandı ve bunların zararlı ve aynı zamanda konağı olan böcek üzerindeki insektisidal etkileri araştırıldı. Ayrıca, farklı böceklerden izole edilen yüksek insektisidal etkiye sahip KTU Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilen *Bacillus thuringiensis tenebrionis* (Xd3), *Bacillus thuringiensis kurstaki* (MnD), *Bacillus thuringiensis kurstaki* (BnBt) ve *Serratia marcescens*'in (BnSm) *R. simulans* nimfleri ve erginleri üzerindeki insektisidal etkileri belirlendi. Çalışmada ulaşılan sonuçlardan hareketle, gelecek çalışmalara yönelik olarak aşağıdaki hususlar belirlendi.

1. Elde edilen *B. thuringiensis* izolatlarının cry toksin protein içeriği belirlenebilir. *cry1* geninin alt türleri tespit edilebilir.
2. Elde edilen *B. thuringiensis* izolatlarından saflaştırılan kristal proteinlerin toksin çeşidine göre biyolojik aktivitesi farklı böceklerde test edilebilir.
3. Cins seviyesinde tanımlanan bakterilerin, G+C içeriği, DNA-DNA hibridizasyonu ve yağ asitleri gibi ilave yöntemler kullanarak tür seviyesinde tanımlamaları gerçekleştirilebilir.
4. Aynı bakteri türünün farklı bir suşu olduğu düşünülen izolatların alt tür belirleme çalışmaları yapılabilir.
5. Farklı özelliklerdeki mikrobiyal etmenlerin (virüs, fungus, protozoa ve nematod gibi) zararlı üzerindeki etkileri belirlenebilir.
6. Laboratuvar koşullarında elde edilen yüksek öldürme gücüne sahip bakteriler, çevre ve insanı tehdit edip etmeyeceği belirlenip, alan uygulamasına sunulabilir.
7. Yüksek öldürücü etkiye sahip olan izolatların mikrobiyal mücadele preparatına dönüştürme çalışmaları yapılabilir.
8. *R. simulans* üzerinde zararlıyı kontrol altına almak için entegre mücadele yöntemi denenebilir.

## 7. KAYNAKLAR

- Adang, M.J., Brody, M.S., Cardinau, G., Eagan, N., Roush, R.T., Shewmaker, C.J., Jones, A., Okes, J.V. ve McBride, K.C., 1993. The Reconstitution and Expression of a *Bacillus thuringiensis* Cry III Gene in Protoplasts and Protoplasts, Plant Mol. Biol., 21, 1131–1145.
- Ak, K., Güçlü, Ş. ve Sekban, R., 2013. Doğu Karadeniz Bölgesinde Yeni Bir Zararlı *Ricania simulans* (Walker, 1851) (Hemiptera: Ricaniidae)'a Karşı Azadirachtin ve Spinosad Etki Maddeli Biyopestisitlerin Etkinliklerinin Belirlenmesi, Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi, 6 ,1, 10-14.
- Alvarez, A., Virla, E., Pera, L. ve Baigorí, M., 2009. Characterization of Native *Bacillus thuringiensis* Strains and Selection of an Isolate Active Against *Spodoptera frugiperda* and *Peridroma saucia*, Biotechnol., 31, 1899-1903.
- Anonim, 1995. Zirai Mücadele Teknik Talimatı, Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü, 2, 13.
- Anonim, 2005. Zirai Mücadele İlaçları Üretimi Yapılan İşyerlerinde İş Sağlığı ve Güvenliği Proje Denetimi Değerlendirme Raporu, T.C. Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı İş Teftiş Kurulu Başkanlığı, Yayın No,4, 27-28.
- Arif, B. ve Kurstak, E., 1991. Viruses of Invertebrates, Kurstak, E. (Ed.), Marcel Dekker, New York, USA, Inc., 179.
- Atalay, İ., 2006. Toprak Oluşumu, Sınıflandırılması ve Coğrafyası, Meta Basım, 3. Baskı, İzmir, 455.
- Baum, J.A. ve Malvar, T., 1995. Regulation of Insecticidal Crystal Protein Production in *Bacillus thuringiensis*, Mol. Microbiol., 18, 1–12.
- Beegle, C. C. ve Yamamoto T.,1992. Invitation paper (C.P. Alexander Fund): History of *B. thuringiensis* Berliner Research and Development, Can. Ent., 124, 587-616.
- Beer, H., Hugo, C.J., Jooste, P.J., Vancanneyt, M., Coenye, T. ve Vandamme, P., 2006. *Chryseobacterium piscium* sp. nov., isolated from fish of the South Atlantic Ocean off South Africa, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56, 1317–1322.
- Ben-Dov, E., Boussiba, S. ve Zaritsky, A., 1995. Mosquito Larvicidal Activity of *Escherichia coli* with Combinations of Genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, J. Bacteriol., 2581-2587.



- Ben-Dov, E., Zaritski, A., Dahan, E., Barak, Z., Sinai, R., Manasherob, R., Khamraeb, A., Troitskaya, E., Dubitsky, A., Berezina, N. ve Margalith, Y., 1997. Extended Screening by PCR for Seven *cry*-group Genes from Field-Collected Strains of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4883-4890.
- Benson, H. J., 1985. Microbiological Applications, a Laboratory Manuel in General Microbiology, Brock, Fourth Edition, Wm C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa.
- Bone, L.W., 1989. Activity of Commercial *Bacillus thuringiensis* Preparations against *Trichostrogylus colubriformis* and *Nippostrrogylus brasiliensis*, J. Invertb. Pathol., 53,2, 276-277.
- Brady, C.L., Venter, S.N., Cleenwerck, I., Engelbeen, K., Vancanneyt, M., Swings, J. ve Coutinho, T.A., 2009. *Pantoea vagans* sp. nov., *Pantoea eucalypti* sp. nov., *Pantoea deleyi* sp. nov. and *Pantoea anthophila* sp. nov., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59, 2339–2345.
- Bravo, A., Gill, S.S. ve Soberon, M., 2007. Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt Toxins and Their Potential for Insect Control, Toxicon, 49, 423-435.
- Bulut, İ., 2006. Genel Tarım Bilgileri Ve Tarımın Coğrafi Esasları (Ziraat Coğrafyası), Gündüz Eğitim ve Yayıncılık, Ankara, 9.
- Burges, H.D. ve Hussey, N.W., 1971, Microbial Control of Insects and Mites, Academic Press, London, New York.
- Burges, H.D. (Ed.), 1981. Microbial Control of Pests and Plant Diseases, Academic Press, London.
- Cannon, R.J.C., 1996. *Bacillus thuringiensis* Use in Agriculture: A Molecular Perspective, Biol. Rev., 71, 561–636.
- Cappuccino, J. G. ve Sherran, N., Microbiology, a Laboratory Manual, Third Edition, Rockland Community College, Suffern, New York, 1992.
- Carozzi, N., Kramer, V., Warren, G., Evola, S. ve Koziel, M.G., 1991. Prediction of Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains by Polymerase Chain Reaction Product Profiles, Appl. Environ. Microbiol., 57, 3057-3061.
- Çanakçıoğlu, H., 1989. Orman Entomolojisi, Genel Bölüm, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul.
- Deacon, J. W., 1983. Microbial Control of Pests and Diseases, New York., 31-41.
- DeBach, P., 1974. Biological Control by Natural Enemies. Cambridge University Press, London, 323.

- Delen, N. ve Tosun, N., 1996. Reduced Sensitivity in *Botrytis cinerea* to Thiram and Mancozeb, XI th International Botrytis Symposium, June, Wageningen, Programme and Book of Abstracts, 31, 23-27.
- Delétoile, A., Decré, D., Courant, S., Passet, V., Audo, J., Grimont, P., Arlet, G. ve Brisse, S., 2009. Phylogeny and Identification of *Pantoea* Species and Typing of *Pantoea agglomerans* Strains by Multilocus Gene Sequencing, *J. Clin. Microbiol.*,47,2,300.
- Demeli M., 2012. Fındık ve tahıl ambarlarından *Bacillus* İzolasyonu, Karakterizasyonu ve İzolatların İnsektisidal Özelliklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Demirbağ, Z. ve Beldüz, A. O., 1997. Bakulovirüs'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, Trabzon, 3.
- Doğanay, H., 1998. Türkiye Ekonomik Coğrafyası, Çizgi Kitabevi Yayınları, Konya.
- Doğanay, S., 2006. Trabzon'da Çay Tarımının Coğrafi Esasları, *Doğu Coğrafya Dergisi*, 16,89-111.
- Doğanay, H., 2007. Ekonomik Coğrafya-3: Ziraat Coğrafyası, Aktif Yayınevi, İstanbul.
- Doğanay, S., 2011. Trabzon'da Çay Tarımının Coğrafi Esasları, *Doğu Coğrafya Dergisi*, 16, 108-109.
- Durmuşoğlu, E., Tiryaki, O., Canhilal, R., Türkiye'de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Dayanıklılık Sorunları, [http://ziraat.uludag.edu.tr/ureticiler/ENTOMOPATOJEN\\_NEMATODLAR.pdf](http://ziraat.uludag.edu.tr/ureticiler/ENTOMOPATOJEN_NEMATODLAR.pdf) 16.06.2013.
- Ecevit, O., 1988. Zirai Mücadele İlaçları ve Çevreye Olan Etkileri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları, 27, Samsun.
- Er, C., 2009. Organik Tarım Bakımından Türkiye'nin Potansiyeli, Bugünkü Durumu ve Geleceği, İstanbul ticaret odası yayınları yayın no:2009-3,İTO, İstanbul,12-15.
- Erdoğan, P., 2006. Sebze ve Meyve Bitkilerinde Görülen Zararlılar ve Mücadele Yöntemleri, Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü, *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*,15,1-10.
- Feener, D.H., ve Brown, B.V., 1997. Diptera as Parasitoids. *Annual Review of Entomology*, 42, 73-97.
- Feitelson, J.S., 1993. The *Bacillus thuringiensis* Family Tree, In Kim, L. (ed.), Advanced Engineered Pesticides. Marcel Dekker. Inc., New York, N.Y. 63-71.
- Gasser, C. S. ve R. T. Fraley, 1989. Genetically Engineering Plants for Crop Improvement, Science (Washington, DC), 244, 1290-1299.

- González, J.M. Jr. ve Carlton, B.C., 1980. Patterns of Plasmid DNA in Crystalliferous and AcrySTALLIFEROUS Strains of *Bacillus thuringiensis*, Plasmid, 3, 92-98.
- Gonzales, J.M. Jr., Dulmage, H.T. ve Carlton, B.C., 1981. Correlation between Specific Plasmids and  $\delta$ -endotoxin Production in *Bacillus thuringiensis*, Plasmid, 5, 351-365.
- González, J.M. Jr., Brown, B.J. ve Carlton, B.C., 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* Plasmids Coding for  $\delta$ -endotoxin among Strains of *B. thuringiensis* and *B. Cereus*, Proc. Natl. Acad. Sci., (USA), 79, 6951-6955.
- Göney, S., 1986. Sıcak Bölgelerde Ziraat, Coğr. Enst. Yayın No, 116, Ziraat Coğrafyası Cilt 4, İstanbul.
- Granados, R. R. ve Federici, B. A., 1986. The Biology of Baculoviruses, Practical Applications for Insect Control, Boca Raton, FL, 2.
- Gröner, A., 1986. Specificity and Safety of Baculoviruses, In "The Biology of Baculoviruses, Practical Applications for Insect Control, (Granados, R. R. ve Federici, B. A., Eds.), Boca Raton, FL, 2, 177-202.
- Güçlü, Ş., Ak, K., Eken, C., Akyol, H., Sekban, R., Beytut, B. ve Yıldırım, R., 2010. Pathogenicity of *Lecanicillium muscarium* against *Ricania simulans*. Bulletin of Insectology, 63,2, 243-246.
- Hagler, J.R., 2000. Recheigl, E.S. and N.A. Recheigl Ed.,; Biological control of insects, Techniques for Environmental Protection, Insect Pest Management ,7, CRC Press LLC.
- Hansen, B., Damgaard, P., Eilenberg, J. ve Pedersen, J.C., 1998. Molecular and Phenotypic Characterization of *Bacillus thuringiensis* Isolated from Leaves and Insects, J. Invertebr. Pathol., 71, 106-114.
- Hauser, E., Kampfer, P. ve Busse, H.J., 2004. *Pseudomonas psychrotolerans* sp. nov., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54, 1633-1637.
- Heming, J.C., Davis, A. C. ve Robinson, W. B., 1954. Flavor and Color Evaluation of Canning Crops Grown in Soil Treated with Insecticides, J.of. Food Tech, 8, 227.
- Hildebrand, D. C., Palleroni, N.J., Hendson, M., Toth, J. ve Johnson, J. L., 1994. *Pseudomonas flavescens* sp. nov. Isolated from Walnut Blight Cankers, International Journal of Systematic Bacteriology, 44, 3, 410-415.
- Hoffman, M. P. ve Frodsham, A. C., 1993. Naturel Enemies of Vegetable Insect Pests, Cooperative Extension, 63, Cornell University, Ithaca.
- Höfte, H. ve Whiteley, HR., 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*, Microbiol. Rev., 53, 242-255.

- Hugo, C.J., Segers, P., Hoste, B., Vancanneyt, M. ve Kersters, K., 2003. *Chryseobacterium joostei* sp. nov., Isolated from the Dairy Environment, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53, 771–777.
- Jarrett, P. ve Stephenson, M., 1990. Plasmid Transfer between Strains of *Bacillus thuringiensis* Infecting *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis*, Appl. Environ. Microbiol., 56, 1608-1614.
- Karakaya, M. ve Boyraz N., 1992. Gıda Kirlenmesinde Pestisitler ve Korunma Yolları, Ekoloji dergisi, 1, 4, 11-15.
- Kaşkavalcı, G., 1999. Böceklere Karşı Biyolojik Savaşta Nematodların Yeri, Türkiye Entomoloji Dergisi, 23, 4, 305-314.
- Kim, K.K., Lee, K.C., Oh, H.M. ve Lee, J.-S., 2008. *Microbacterium aquimaris* sp. nov., Isolated from Seawater, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58, 1616–1620.
- Knowles, B. H., 1994. Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal  $\delta$ -endotoxin, In Advances in Insect Physiology, Volume 24, Evans, P.D. (ed.), Academic Press, London, 275-308.
- Kodama, K., Kimura, N. ve Komagata, K., 1985. Two New Species of Pseudomonas: *P. oryzihabitans* Isolated from Rice Paddy and Clinical Specimens and *P. luteola* Isolated from Clinical Specimens, International journal of systematic bacteriology, 35, 4, 467-474.
- Konecka, E., Kaznowski, A., Ziemnicka, J. ve Ziemnicki, K., 2007. Molecular and Phenotypic Characterization of *Bacillus thuringiensis* Isolated During Epizootics in *Cydia pomonella* L, J. Invertebr. Pathol. 94, 56-63.
- Lacey, L.A. ve Goettel, M.S., 1995. Current Developments in Microbial Control of Insect Pests and Prospects for The Early 1st Century, Entomophaga, 40,1, 3-27.
- 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.
- Lampkin, N.H., 1994. Organic Farming: Sustainable Agriculture in Practice, The Economics of Organic Farming: An International Perspective, Ed:N.H. Lampkin and S. Padel, Guilford. Farming Press Books, Wharfedale Road, Ipswich IP1 4 LG, UK.
- Lee, J.C., Lee, G.S., Park, D.J. ve Kim, C.J., 2008. *Bacillus alkalitelluris* sp. nov., an Alkaliphilic Bacterium Isolated from Sandy Soil, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58, 2629–2634.
- Lipa, J.J., 1975. An Outline of Insect Pathology, United States. Dept. of Agriculture, Warsaw, Poland, 269-1975.

- Lindow, S. E., Panopoulos N. J. ve Mc Farland, B. I. 1989. Genetic Engineering of Bacteria from Managed and Natural Habitats, Science, 244,1300-1307.
- Maddox, J.V., 1987. Protozoan Diseases, Epizootiology of Insect Diseases, Ed. Fuxa, J.R., Tanada, Y., Wiley, New York., 417-452.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Lee, J.S., Lee, K.C., Saravanan, V.S. ve Santhanakrishnan, P., 2010. *Microbacterium azadirachtae* sp. nov., a Plantgrowth-Promoting Actinobacterium Isolated from the Rhizoplane of Neem Seedlings, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60, 1687–1692.
- Öztemiz, S., 2008. Organik Tarımda Biyolojik Mücadele, Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü, Ziraat Fakültesi Dergisi, 25, 2, 19-27.
- Padidam, M., 1992. The insecticidal crystal protein Cry1A (c) from *Bacillus thuringiensis* is highly toxic for *Heliothis Armigera*. J. Invertebr. Pathol., 59, 109-111.
- Park, M.S., Jung, S.R., Lee, K.H., Lee, M.S., Do, J.O., Kim, S.B. ve Bae, K.S., 2006. *Chryseobacterium soldanellicola* sp. nov. And *Chryseobacterium taeanense* sp. nov., Isolated from Roots of Sand-Dune Plants, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56, 433–438.
- Poinar, G.O., 1978. Identification of The Groups of Insect Pathogens, Plenum Press, New York.
- Porcar, M. ve Juarez-Perez, V., 2003. PCR-Based Identification of *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Genes, FEMS Microbiol. Rev., 26, 419-432.
- Poppy, G.M., 1997. Tritrophic interactions: Improving Ecological Understanding and Biological Control, Endeavour, 21, 61-65.
- Prieto-Samsonov, D.L., 1997. *Bacillus thuringiensis* from Biodiversity to Biotechnology, JIMB, 19, 3, 202-219.
- Raymond, B., Johnston, P.R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D. ve Crickmore, N., 2010. *Bacillus thuringiensis*: An Important Pathogen, Trends in Microbiol., 18, 5, 189-194.
- Reddy, A., Battisti, L. ve Thorne, C.B., 1987. Identification of Self-Transmissible Plasmids in Four *Bacillus thuringiensis* Subspecies, J. Bacteriol., 169, 5263-5270.
- Romanenko, L.A., Uchino, M., Falsen, E., Frolova, G.M., Zhukova, N.V. ve Mikhailov, V.V., 2005. *Pseudomonas pachastrellae* sp. nov., Isolated from a Marine Sponge, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55, 919–924.

- Satomi, M., Duc, M.T.L. ve Venkateswaran, K., 2006. *Bacillus safensis* sp. nov., Isolated from Spacecraft and Assembly-Facility Surfaces, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56, 1735–1740.
- Shivaji, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., Reddy, G.S.N., Dutt, C.B.S., Wainwright, M., Narlikar, J.V. ve Bhargava, P.M., 2006. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., Isolated from Cryogenic Tubes Used for Collecting Air Samples from High Altitudes, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56, 1465–1473.
- Schippers, A., Bosecker, K., Spröer, C. ve Schumann, P., 2005. *Microbacterium oleivorans* sp. nov. and *Microbacterium hydrocarbonoxydans* sp. nov., Novel Crude-Oil-Degrading Gram-positive bacteria, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55, 655–660.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rien, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. ve Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 775–806.
- Sneath, A. P., 1968. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2, Sneath, A. P., Mair, N. S., Sharge, M. S. ve Holt, J. G., Williams and Wilkins, Baltimore.
- Steinhaus, E. A., 1956. Microbial Control: The Emergence of an Idea, J. Agric. Sci., 26, 107-160.
- Sezen, K., Demir, İ. ve Demirbağ, Z., 2007. Identification and Pathogenicity of Entomopathogenic Bacteria from Common Cockchafer, *Melolontha melolontha* L. (Col., Scarabaeidae), New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 35, 79-85.
- Springer, B., Stockman, L., Teschner, K., Roberts, G. D. ve Bottger E.C., 1996. Two-Laboratory Collaborative Study on Identification of Mycobacteria: Molecular Versus Phenotypic Methods, J. Clin. Microbiol., 34, 296–303.
- Suresh, K., Prabakaran, S.R., Sengupta S. ve Shivaji S., 2004. *Bacillus indicus* sp. nov., an Arsenic-Resistant Bacterium Isolated from an Aquifer in West Bengal, India, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54, 1369–1375.
- Suresh, K., Prabakaran, S.R., Sengupta, S. ve Shivaji, S., 2006. *Bacillus indicus* sp. nov., an Arsenic-Resistant Bacterium Isolated from an Aquifer in West Bengal, India, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56, 1735–1740.
- Swamy, H.M., Birah, A., Thimmegowda, G.G. ve Asokan, R., 2013. *Bacillus thuringiensis* Isolates from Great Nicobar Islands, Curr Microbiol, 66,621–626.

- Szoboszlay, S., Atzel, B., Kukolya, J., Toth, E.M., Marialigeti, K., Schumann, P. ve Kriszt, B., 2008. *Chryseobacterium hungaricum* sp. nov., Isolated from Hydrocarbon-Contaminated Soil, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58, 2748–2754.
- Tanada Y. ve Kaya H.K., 1993. Insect Pathology, Academic Press, San Diego California, U.S.A.
- Torun, E. ve Taluğ, C., 2005. Çay Budama Projesi Kapsamında Üreticilerin Kullandıkları Bilgi Kaynakları, Tarım Ekonomisi Dergisi; 11, 41 – 49.
- Tunçdilek, N., 1960. Türkiye’de Çay Ziraatı (Gelişmesi ve Problemleri), İstanbul Univ, Cografya Enst. Dergisi, 11, 12-13.
- Tsaur, S.C., 2005., Some Fulgoroids (Insecta: Hemiptera) Collected on Turtle Island, Taiwan, Zoological Studies, 44,1, 1-4.
- Tamez-Guerra, P., Iracheta, M.M., Pereyra-Alférez, B., Galán-Wong L.J., Gomez-Flores, R., Tamez-Guerra, R.S. ve Rodríguez-Padilla, C., 2004. Characterization of Mexican *Bacillus thuringiensis* Strains Toxic for Lepidopteran and Coleopteran Larvae, J. Invertb, Pathol., 86, 1-2, 7-18.
- URL-1, <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol>, Biological Control: A Guide to Natural Enemies in North America. 05.10.2012.
- URL-2, <http://www.fao.org/>, Avrupa İşletmeler Ağı-Karadeniz, 05.06.2012.
- URL-3, [www.dkib.org.tr/.../CAY-RAPOR-SON%2029%20mart%202013.docx](http://www.dkib.org.tr/.../CAY-RAPOR-SON%2029%20mart%202013.docx), 06.03.2013.
- URL-4, <http://www.rizetarim.gov.tr/news.php?readmore=578>, 08.03. 2013.
- URL-5, [http://hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/bahcecilik/moduller/mucadele\\_yontemleri.pdf](http://hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/bahcecilik/moduller/mucadele_yontemleri.pdf), 09.04.2013.
- URL-6, [http://www.tarimkutuphanesi.com/ZIRAI\\_MUCADELENIN\\_TANIMI\\_VE\\_MUCADELE\\_YONTEMLERI\\_00185.html](http://www.tarimkutuphanesi.com/ZIRAI_MUCADELENIN_TANIMI_VE_MUCADELE_YONTEMLERI_00185.html), 10.05.2013.
- URL-7, <http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios /Cap12> Accessed 1 March 2011), 15.05.2013.
- URL-8, [http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/52cf38361a20908\\_ek.pdf](http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/52cf38361a20908_ek.pdf), 17.06.2013.
- Uygun, N., 2002. Zararlılara Karşı Biyolojik Mücadelede Gelişmeler, Türkiye 5. Biyolojik Mücadele Kongresi, Eylül, ERZURUM, 23-32.
- Ünal, G., 1998. Zirai Mücadele İlaçları Toksikolojisi ve Çevre, Ankara Zirai Mücadele Enstitüsü Seminer Notları, Ankara.

- Van den Bosch, R., Messenger P.S. ve Gutierrez A.P., 1982. An Introduction to Biological Control. Plenum Press, New York.
- Vanparys, B., Heylen, K., Lebbe, L. ve Vos, P.D., 2006. *Pseudomonas peli* sp. nov. and *Pseudomonas borbori* sp. nov., Isolated from a Nitrifying Inoculum, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56, 1875–1881.
- Weiser, J., 1969. An Atlas of Insect Diseases, Publishing House of the Czechoslovak, Academy of Sciences, Prague.
- Visser, B., Bosch, D. ve Honée, G., 1993. Domain-Function Studies of *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins: A Genetic Approach. In: Entwistle, P.F., Cory, J.S., Bailey, M.J., Higgs, S. (eds.), *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice. Chichester, New York, Toronto, Wiley and Sons, 71-88.
- Wilson, E.O., 1990. First Word. Omni., 12, 6.
- Walker, F., 1851. List of the specimens of Homopterous insects in the Collection of the British Museum, 2, 261-636.
- Wu, Y.H., Wu, M., Wang, C.S., Wang, X.G., Yang, J.Y., Oren, A. ve Xu X.W., 2008. *Microbacterium profundum* sp. nov., isolated from Deep-Sea Sediment of Polymetallic Nodule Environments, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58, 2930–2934.
- Young, C.C., Kampfer, P., Shen, F.T., Lai W.A. ve Arun, A.B., 2005. *Chryseobacterium formosense* sp. nov., Isolated from the Rhizosphere of *Lactuca sativa* L. (garden lettuce), International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55, 423–426.
- Zukowski, K., 1995. Laboratory Examination of the Effectiveness of New Biological Preparations for Reducing Populations of Cockroaches (*Blattella germanica* L.), Rocz. Panstw. Zakl. Hig., 46, 293-297.



## 8. EKLER

### Ek 1. Besiyeri, Ayıraç, Boyalar ve Kimyasalların Hazırlanışı

#### 1. Besiyerlerinin Hazırlanışı

Leura-Bertani Agar (LB Agar): 500 ml besiyeri için 5 g tripton, 2,5 g yeast extract, 2,5 g sodyum klorür (NaCl) ve 6 g agar-agar tartılarak saf su ile 500 ml ye tamamlanır, otoklavlanarak steril edilir.

Leura-Bertani Broth (LB Broth): 500 ml besiyeri için 5 g tripton, 2,5 g yeast extract ve 2,5 g sodyum klorür (NaCl) tartılarak saf su ile 500 ml ye tamamlanır, otoklavlanarak steril edilir.

Nişasta Agar: 1g nişasta 10 ml soğuk ddH<sub>2</sub>O'da çözüldükten sonra 100 ml nütrient agarla karıştırılır ve otoklavlanarak steril edilir.

Nütrient Agar (NA): Ticari olarak satılan hazır nütrient agar kullanıldı. 1000 ml besiyeri için 28 g tartılıp 1000 ml ye tamamlanır ve otoklavlanarak steril edilir. Kullanılan marka: Fluka, Katalog no: 70148

Nütrient Broth (NB): Ticari olarak satılan hazır nütrient broth kullanıldı. 1000 ml besiyeri için 13 g tartılıp 1000 ml ye tamamlanır ve otoklavlanarak steril edilir. Kullanılan marka: LAB M, Katalog No: 061915

Tryptic Soy Agar (TSA): Ticari olarak satılan hazır besiyeri kullanıldı. 1000 ml besiyeri için 40 g tartılıp 1000 ml ye tamamlanır ve otoklavlanarak steril edilir. Kullanılan marka: Merck, Katalog no: 1,05458,0500

#### 2. Ayıraçlar ve Boyaların Hazırlanışı

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

Gram İyodu: 1 g iyot ve 2 g potasyum iyodür (KI) 5 ml saf suda çözülüp; üzerine 250 ml saf su ve 60 ml % 5'lik sodyum bikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) ilave edilir.

Kristal Violet Boyası: Bu boya için iki ayrı solüsyon hazırlanıp ardından ikisi birbirine karıştırılır: 1) 1 g kristal violet, 10 ml %95'lik etanol, 90 ml saf su ile karıştırılır. 2) 4 g amonyum oksalat ve 400 ml saf su ile karıştırılır. Bu iki solüsyon daha sonra birbirine karıştırılarak 1 gece bekledikten sonra kullanılır.

Malaşit Yeşili: 5 g malaşit yeşili 100 ml saf suda çözülür; süzgeç kağıdı yardımıyla süzülerek kullanılır.

Safranin: 2,5 g safranin O, 100 ml etanol ve 500 ml saf su karıştırılarak hazırlanır.

#### Ek 3. Kimyasalların Hazırlanışı

X-Gal Hazırlanışı: 0,1M 10 ml hazırlamak için 400 mg tartılıp 10 ml ye tamamlanır, filtre yardımıyla steril edilir. X-Gal moleküler ağırlığı; 408,61 g'dir.

IPTG Hazırlanışı: 0,1M 10 ml hazırlamak için 238,3 mg tartılıp 10 ml'ye tamamlanır, filtre yardımıyla steril edilir. IPTG moleküler ağırlığı; 238,3 g'dir.

Ampicilin Sulandırılması: 1 g tuzlu ampicilin 9,5 ml saf suda çözülür ve filtre yardımıyla steril edilir.

TENS(Tris-EDTA-NaOH-SDS) Hazırlanışı: 10 mM pH 8,0 Tris, 1mM pH 8,0 EDTA, 0,1 N NaOH ve %0,5 SDS ile hazırlanır.

3M pH 5,2 Sodyum Asetat Hazırlanışı(100ml): 40,824 g sodyum asetat 50 ml saf suda çözüldükten sonra asetik asit yardımıyla pH'ı 5,2'ye ayarlanır ve daha sonra 100 ml'ye tamamlanır. Otoklavlanarak kullanılır.

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

### Rs1:

GGCGAAATATTAATCCACGCGCTTGGGAGCTCTCCATATGGTTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAAT  
 TCACTAGTGATTATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACAC  
 ATGCAAGTCGAGCGGATGAGAGGAGCTTGCTCCTCGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGC  
 CTAGGAATCTGCCTAGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCT  
 ACGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATTAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTA  
 GTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACGGTCTGAGAGGATGATCAGTCA  
 CACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATG  
 GGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCACTTTA  
 AGTTGGGAGGAAGGGCTCATAGCGAATACCTGTGAGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCAC  
 CGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTG  
 GCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGCTTGATAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGA  
 ACTGCATCCAAAAGTGTCTGGCTAGAGTGCAGGTAGAGGGTAGTGAATTTCCAGTGTAGCGTGAA  
 ATGCGTAGATATTGGAAGGAACACAGTGGCGAAGGCGACTACCTGGACTGACACTGACACTG  
 AGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG  
 TCAACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTG  
 GGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGC  
 ATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCA  
 GAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGC  
 GTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATG  
 GTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAT  
 CATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCC  
 GCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCG  
 TGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAACGTACAGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT  
 ACACACCGCCCGTCACACACGGTACCATAATCGAATTCGCGGCGCCGATGGCGGCCGGGAA  
 GCATGCGACGCCCGCCCCCTC

### Rs2:

GTGAACGGAGTCGCATGCTCCCGGCCGCGCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTATTCTAGAGTTT  
 GATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTTGACGGG  
 AGCTTGCTCCCTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGG  
 GACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAAAACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTC  
 GGGCCTTGCGCTAATAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAA  
 GGCGACGATCCGTAACGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACTGGAAGTGAACACGGTCCAG  
 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGC  
 CGCGTGTGTGAAAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTTGTAGATT  
 AATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGC  
 GGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTT

GTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAAGCTGGCAAGCTAG  
 AGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAAC  
 ACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA  
 AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTG  
 AGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAA  
 AACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAAC  
 GCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGG  
 AACTCAGACACAAGTGCTCCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGGAATGTTGGGTTAAGTCC  
 CGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGAACTCTAAGGAGACTG  
 CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGC  
 TACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCAT  
 AAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCGGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTTCGGAATCGCTAGTAA  
 TCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACACG  
 GTACCATAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTTCGACCATAGGGAGAGCTCCCAACGC  
 GTGAGTGTCTGTTT

**Rs3:**

GTGAACGGAGTCGCATGCTCCCGGCCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTATTCTAGAGTTT  
 GATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTTGACGGG  
 AGCTTGCTCCCTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGG  
 GACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAAAACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTC  
 GGGCCTTGCCTAATAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAA  
 GGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAG  
 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGC  
 CGCGTGTGTGAAAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTTGTAGATT  
 AATACTCTGCAATTTTACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGC  
 GGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTT  
 GTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAAGCTGGCAAGCTAG  
 AGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAAC  
 ACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA  
 AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTG  
 AGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAA  
 AACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAAC  
 GCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGG  
 AACTCAGACACAAGTGCTCCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGGAATGTTGGGTTAAGTCC  
 CGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGAACTCTAAGGAGACTG  
 CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGC  
 TACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCAT  
 AAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCGGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTTCGGAATCGCTAGTAA  
 TCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACACG

GTACCATAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATAGGGAGAGCTCCCAACGC  
GTGAGTGTCTGTTC

**Rs4:**

GGGGACCGAGTCCCATGGCTCCGGCCGCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTATTCTAGAGTTT  
GATCATGGCTCACACACACGGTACCATATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGG  
CGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAGAGGAGCTTGCTCTTCGATTACGCGGCGG  
ACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTAGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTA  
ATACCGCATAACGCCCTACGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATTAGATGAGCCT  
AGGTCCGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGA  
GAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
GAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGG  
GTCGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCTCATAGCGAATACCTGTGAGTTTGACGTTAC  
CAACAGAGTAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGT  
TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGCTTGATAAGTTGGATGTGAAATCCCCG  
GGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGTCTGGCTAGAGTGCGGTAGAGGGTAGTGAATTT  
CCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTACCTGG  
ACTGACACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC  
CACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCA  
TTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC  
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGAC  
ATGCTGAGAAGTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTCCAGACACAGGTGCTGCATGGC  
TGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTA  
GTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG  
GGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTAC  
AAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAG  
TCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAACGTCACGGTGAAT  
ACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACACGGTACCATAATCACTAGTGAATTCGCG  
GCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTGGATGTCAGAGC

**Rs5:**

GGGGGGCGAGGCGCATGCTCCCGGCCGCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTATGGTACCGTG  
TGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTACCGTGGCATTCTGATCCACGATTAC  
TAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACGCACTTTGTGA  
GGTCCGCTTGCTCTCGGAGGTGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTA  
CTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCC  
TTTGTGATTTCCGACCGAATCGCTGGCAACAAAGGATAAAGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC  
CCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACGGTTCCCGAAGGCA  
CTAAGGCATCTCTGCCAAATTCCGTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGA  
ATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCGAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGG  
CCGTAATCCCGAGGCGGTGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACTCCTCAAGGGAACAACC  
TCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTT

TCGCCACCTCTACTTCCTCCCCGATCTCCTACCGCATTTACCCGATACACCTGGAATTCCTAC  
 CCCCTTCTACAAGACTCAAGCCTGCCAGTTTCAAATGCAGTTCCCAGGTTAAGCCCCGGGATTT  
 CACATCTGACTTAACAGACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCA  
 CCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAA  
 TCGATAAGGTTATTAACCCCATCGCCTTCTCCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTT  
 CTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCT  
 CCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGG  
 GATCGTCGCCTAGGTGGGCCATTACCCCGCCTACTAGCTAATCCCATCTGGGTTTCATCCGATAGT  
 GAGAGGCCCGAAGGTCCCCCTCTTTGGTCTTGCACGTTATGCGGTATTAGCCACCGTTTCCAGT  
 GGTTATCCCCCTCTATCGGGCAGATCCCCAGACATTACTACCCGTCCGCCACTCGTCACCCAA  
 GGAGCAAGCTCCTCTGTGCTACCGTCCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCT  
 GAGCCATGATCAAACCTCTAGAATAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATAT  
 GGAGAGCTCCCAACGCGTCTGGATGAATGCTCCC

**Rs6:**

GGGGTGGGACGCGCATGCTCCCGGCCGCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTATTCTAGAGTT  
 TGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTTGACGG  
 GAGCTTGCTCCCTGATTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTATTAGTGGG  
 GGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGGAAGCGGGGGACCTT  
 CGGGCCTTGCCTAATAGATGAGCTTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAATGGCTCACCA  
 AGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCA  
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATG  
 CCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTTGTAGAT  
 TAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCG  
 CGGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCAAGGTGGTT  
 TGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCAAGCTA  
 GAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAA  
 CACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGC  
 AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTT  
 GAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTA  
 AAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAA  
 CGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGG  
 GAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCC  
 CGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGAACTCTAAGGAGACTG  
 CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGC  
 TACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCAT  
 AAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAA  
 TCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACACG  
 GTACCATAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGAGAGCTCCCAACG  
 CGTGGGATGCATGGTCCG

**Rs7:**

GGAGAGGGGGGAGCGAGGCGCAGCTCCGGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTATGGT  
 ACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGGGGCATTCTGATCCAC  
 GATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGACTACGACGCACT  
 TTGTGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTA  
 GCCCGTACTCGTAAGGGCCATGTGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGC  
 AGTCTCCTTTGAGTTCCCGACCGAATCGCTGGGAACAAAGGATAAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGG  
 ACTTAAGCCAACATTTGCAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGGCTCACGGTTCCC  
 GAAGGCACTAAGGCATCTCTGCCAAATCCCGTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTT  
 GCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAAC  
 CTTGCGGCCGTA TCCCCAGGCGGTGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCGACTCCTCAAGGG  
 AACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCC  
 CCACGCTTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCTCC  
 AGATCTCTACGATTTACGGCTACACCTGGGGGTTCTACCCCTCTCTACAAAACCTCAAACCTTC  
 CATTTTCAATTCCATTCCCACTTAAGCCCGGACATTCACATCTGACTTAACAGACCGCCTGCGTG  
 CGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGG  
 AGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATCGACGCGGTTATTAACCGCATCGCCTTCCT  
 CCCCCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGC  
 TTGCGCCCATGTGCAATATCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTC  
 CAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGGGCCATTACCCCGC  
 CTACTAGCTAATCCCATCTGGGTTTCATCCGATAGTGAGAGGGCCGAAGGTTCCCTCTTTGGTCT  
 TGCGACGTTATGCGGTATTAGCCACCGTTTCCAGTGGTTATCCCCCTCTATCGGGCAGATCCCCA  
 GACATTACTACCCGTCCGCCACTCGTCACCCAAGGAGCAAGCTCCTCTGTGCTACCGTCCGAC  
 TTGCATGTGTTAGGCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAATAATCAC  
 TAGTGAATTCGCGGCCCGCTGCAGGTCGACCATATGGAGAGCTCCCCAATCGCGTTGAGCTAGT  
 TTCCCT

**Rs8:**

TAGTAAGGGGGGCGAGATCCATGCTGCAGGTGCCATGGCGGCCGCGGGATTTCGATTATGGCAC  
 CGTGTGTGACGTGAGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGACATTCTGATTACGA  
 TTAGTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGACTACGATCGGTTTT  
 ATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGAACCCCTTTGTACCGACCATTGTTGCACGTGTGTAGC  
 CCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGT  
 CTCCTTAGAGTTCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGAC  
 TTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCTGAGTTCCCGA  
 AGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCAACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGC  
 TTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCT  
 TGCGGCCGTA TCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATT  
 CCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCA  
 CGCTTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTGGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCCTA  
 TATCTACGATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCTTGCCAGT

TTTGGATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCAACCTTAACAAACCACCTACGCG  
 CGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAG  
 AGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTGCGTAACGTCAA AATTGCAGAGTATTAATCTACAACCC TTCCT  
 CCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGC  
 TTTCGCCCATTTGTCCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTC  
 CAGTGTGACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCTTGGTGAGCCATTACCTCACC  
 AACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTATTAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCTCCC  
 GTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCCTTTGAAACGTTGTCCCCACTAATAGGCAGATTCT  
 AGGCATTACTACCCGTCCGCCGCTGAATCAGGGAGCAAGCTCCCGTCAACCGCTCGACTTGCA  
 TGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCATGATCAA ACTCTAGAATAATCACTAGTG  
 AATTCGCGGCCGCTGCAGGTGACCATATGGAGAGCTCCCAACGCCGGTGGAGCATAGTCGT

**Rs9:**

GGGATGCGGAGTCGCATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTTCGATTATGGTACCGTGT  
 GTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATTAC  
 TAGCGACTCCGACTTCATGAGGTCGAGTTGCAGACCTCAATCCGA ACTGGGACCGGCTTTTTGG  
 GATTTCGCTCCACCTCACGGTATTGCAGCCCTTTGTACCGGCCATTGTAGCATGCGTGAAGCCCA  
 AGACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTAC  
 CCCATGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACATAGAACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTT  
 AACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTTTACGAGTGTCAAAG  
 AGTTGACCATTTCTGGCCCGTTCTCGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCG  
 AATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCG  
 GCCGTACTCCCCAGGCGGGGA ACTTAATGCGTTAGCTGCGTCACGGAAACCGTGGAATGGTCCC  
 CACA ACTAGTTCCCAACGTTTACGGGGTGGACTACCAGGGTATCTAAGCCTGTTTGCTCCCCAC  
 CCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCCAGAGATCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCTGAT  
 ATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATTCCAATCTCCCCTACCGCACTCTAGTCTGCCCCGTA  
 CCCACTGCAGGCCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCAGACGCGACAAACCGCCTACGAG  
 CTCTTTACGCCAATAATCCGGATAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGT  
 AGTTAGCCGGCGCTTTTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTGCTAAAAGAGGTTTAC  
 AACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTTGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTTGTGCAATAT  
 TCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAATCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCAACCCTC  
 TCAGGCCGGCTACCCGTCGACGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACAAGCTGATAGGCCGCG  
 AGCCCATCCCAGACCGAAAAATCTTTCAAACACGACCATGCGATCACGTCTCATATCCAGTAT  
 TAGACACCGTTTCCAGCGCTTATCCCAGAGTCCAGGGCAGGTTGCTCACGTGTTACTACCCGTT  
 CGCCACTGATCCACCAAGCAAGCTTGGCTTACCGTTCGACTTGCATGTGTTAAGCACGCCGCC  
 AGCGTTCATCCTGAGCCATGATCAA ACTCTAGAATAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCA  
 GGTCGACCATATGGAGAGCTCCCAAGCGCGTGGATGCATGTTCTT

**Rs10:**

GGTTGTGGAGCGAGTCCCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTTCGATTATGGTACC  
 GTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGACATTCTGATTCACGAT  
 TACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTA

TGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGC  
 CCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGT  
 CTCCTTAGAGTTCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGAC  
 TTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACTTGTGTCTGAGTTCCCGA  
 AGGCACCA

ATCCATCTCTGGAAAGTTCTCAGCATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTA  
 AACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCATTTGAGTTTTAACCTTGC GGCCGT  
 ACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATTCCAACGGCT  
 AGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGC  
 ACCTCAGTGT CAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCTATATCTACGC  
 ATTTACCGCTACACAGGAAATCCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCTTGCCAGTTTTGGATGC  
 AGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGCTTTCACATCCA ACTTAACAAACCACCTACGCGCGCTTACG  
 CCCAGTAATTCGGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCC  
 GGTGCTTATTCTGTCGGTAAACGTCAA AATTGCAGAGTATTAATCTACAACCCTTCTCCCAACT  
 AAAGTGCTTTACAATCCGGAGA ACTTCTTCAACAACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCC  
 ATTGGCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGA  
 CTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTACCAACTAGCT  
 AATCCGACCTAGGCTCATCTATTAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTCTCCCGTAGGACG  
 TATGCGGTATTAGCGCTCCTTTCGAAGCGTTGTCCCCACTAATAGGCAGATTCTTAGGCATTAC  
 TCACCCGTCCGCCGCTGAATCAGGGAGCAAGCTCCCGTCAACCGCTCGACTTGCATGTGTTAGG  
 CCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCATGATCAA ACTCTAGAATAATCACTAGTGAATTCGCGG  
 CCGCCTGCAGGTCGACCATATGGAGAGCTCCAACGACGTGGGATGCAGGATC

**Rs11:**

GGGGTAGCGAGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTATGGTACCGTG  
 TGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTAC  
 TAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGA ACTGAGAATGGTTTTATGG  
 GATTGGCTTGACCTCGCGGTCTTGCAGCCCTTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAG  
 GTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACC  
 TTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC  
 CGACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGG  
 AACGCTCTATCTCTAGAGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCG  
 AATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCG  
 ACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTA  
 ACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGC  
 TTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAAAAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTCCACATCT  
 CTACGCATTTACCCGCTACACGTGGAATTCCGCTTTTCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCC  
 AATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACC GCCTGCGCGCGCT  
 TTACGCCAATAATTCGGATAACGCTTGCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGT  
 TAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACGAGCAGTTACTCTCGTACTTGTCTTCCC  
 TAACAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTT



CGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGGTGCCTCCCGTAAGAATCTGGGCCGTGGCTCAATCCCA  
 GTGTGGCCGATCACCTCTCAGATCTGTTCCGCATCGATGCCTCGGTGAGCGAGTTACCTCACC  
 AACTACTTAATGCACCGCGGGCCCTCTGTAAGTGATAGCCGAAACCTTAATTTCAATCATCTA  
 CCATGCAGGAGAAGACCCTTTCGCGCATTAGAATTGGCTTCCAGAAGTTGTACCTGTTTTACAG  
 TCTGGCTCGCCGACGTGTTATTCATCCGTCTGTTGCCCAAGTCATAGCAGCAAGCTTTTAATCCG  
 TTTGTTTCGACATCCATGTATTAGGCACGCCACCAGTTCATCTTGAGCCCTGATCAAACCTCTAG  
 AATAACCACTAGAGAATTCGCGGCCGCGTGCAGGTCGACCATAGCGAGAGCTCCCAACGCGCT  
 GATCATGTGTCCCCC

**Rs12:**

GGTGGGTAGCGAGTCGCATGCTCCGGCCGCTGGCGGCCGCGGAATTCGATTATTCTAGAGTT  
 TGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAAG  
 GGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAG  
 ACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAG  
 GATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACCTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGGGG  
 TAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT  
 GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTC  
 TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAG  
 AACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA  
 CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGG  
 GCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGA  
 AACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG  
 AGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGA  
 AAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAA  
 GTGTTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA  
 CGGTGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT  
 TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAAATAA  
 GGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGA  
 TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCAC  
 TCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC  
 TTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTT  
 TAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTG  
 GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCG  
 CCCGTACACACGGTACCATAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGA  
 GAGCTCCCAACGCGTGATTGTCAAGTGT

**Rs13:**

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGTGACATTCTGA  
 TTCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGAATCCATG  
 GGTTTTAAGGGTTAGTCTCACCTCGGGTTTTGCGAACCCCTTTGTACCGACCATTGTACAAGGTTGT  
 AACCTGGCCGTAAGGGCCATGATGATTGGACTTATCCCCACCTTCCTTCGGGTTGTCACCGGC  
 AGTTTCCTTAGAGTTCCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGG

GACTTAACCCAACATCTCAGGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCTGAGTTCC  
 CGAAGGCACCAATCCATTTCTGGAAAGTTCTCAGCATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGT  
 TGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCCTGTGCGGGCCCCATCAATTCATTTGAGTTTTAA  
 CCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGG  
 ATCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCC  
 CCACGCTTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTGGTTCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTTC  
 CTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCTTGCC  
 AGTTTTGGATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGCTTTTACATCCAACCTAACAAACCACCTAC  
 GCGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCA  
 CAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTGCGTAACGTCAAATTCAGAGTATTAATCTACAACCCT  
 TCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGCATGGCTGGATC  
 AGGCTTTTCGCCATTGTCCAATATTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCA  
 GTTCCAGTGTGACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCT  
 CACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTATTAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTC  
 TCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCTTTGAAACGTTGTCCCCACTAATAGGCAGATT  
 CCTAGGCATTACTACCCGTCGCGCTGAATCAGGGAGCAAGCTCCCGTCAACCGCTCGACTT  
 GCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

**Rs14:**

GGTGCAGATCGAGGGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTATGGTACCGTGTGT  
 GACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGCCATGGCTGATGCGCGATTACT  
 AGCGATTCCAGCTTCATAGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGAACCTGAGACCGGCTTTTCGAGA  
 TTCGCATCCTATCGCTAGGTAGCTGCCCTCTGTACCGGCCATTGTATTACGTGTGTGGCCCAAGG  
 CGTAAGGGCCGTGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCTCTACTTTCGCTAGGCAGTCTCACT  
 AGAGTCCCCAACTGAATGATGGCAACTAGTGACAGGGGTTGCGCTCGTTGCAGGACTTAACCTA  
 ACACCTCACGGCACGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTTGAAAATTGTCCGAAGAAAAGTC  
 TATTTCTAAACCTGTCAATTTCCATTTAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTATCATCGAATTA  
 CCACATAATCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCATTCTTGCGAACGTAC  
 TCCCAGGTGGCTAACTTATCACTTTCGCTTAGTCTCTGAATCCGAAAACCCAAAAACGAGTTA  
 GCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGTCCATC  
 AGCGTCAGTTAAAACATAGTGACCTGCCTTCGCAATTGGTGTCTAAGTAATATCTATGCATTTT  
 ACCGCTACACTACTTATTCAGCCACTTCTACCTTACTCAAGACCTGCAGTATCAATGGCAGTTT  
 CATAGTTAAGCTATGAGATTTACCACTGACTTACAGATCCGCTACGGACCTTTAAACCCAA  
 TAAATCCGATAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCAGTGC  
 TTATTCGTATAGTACCTTCAGCTTTCACACGTGGAAAGGTTTATCCCTATACAAAAGAAGTTTA  
 CAACCCATAGGGCCGTGCTCCTTACGTGGGATGGCTGGATCAGGCTCTCACCCATTGTCCAAT  
 ATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGTCCGTGTCTCAGTACCAGTGTGGGGGATCACCC  
 TCTCAGGCCCCCTAAAGATCACTGACTTGGTGGGCGGTTACCCTACCAACTATCTAATCTTGCGC  
 GTGCCCATCTCTATCCACCGGAGTTTTCAATAATAAGTGATGCCACTCATTATATTATGGGGTAT  
 TAATCTTCCTTTTCGAAAGGCTATCCCCCTGATAAAGGCAGGTTGCACACGTGTTCCGCACCCGT  
 ACGCCGCTCTCAAAGATCCGAAGATCTTCTACCGCTCGGCTTGCATGTGTTAGGCCTCCCGCTA

GCGTTCATCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAATAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAG  
GTCGACCATAGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATGTG

**Rs15:**

GGGTGCGGAGTCGCATGCTCCCGGCCGCCTGGCGGCCGCGGGAATTCGATTTATGGTACCGTGT  
GTGACGGGCGGTGTGCACAAGACCTGGGAACGTATTGACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACT  
AGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAACGGTTTTATGAG  
ATTAGCTCCACCTCGCGGTCTTGACGCTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGG  
TCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTACCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCT  
TAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC  
AACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCTCCCGAAGGAGA  
AGCCCTATCTCTAGGGTTTTAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAAT  
TAAACCACATGCTCCACCGTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCC  
GTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACA  
CTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTT  
CGCGCCTCAGTGTACAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTCCATATCTCTA  
CGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAA  
TGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTT  
ACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTA  
GCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTCTTCCCT  
AACAAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGCGTTGCTCCGTCAGACTTTC  
GTCCATTGCGGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGT  
GTGGCCGATACCCTCTCAGGTGCGGTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACT  
AGCTAATGCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTCAATTTGAAACCATG  
CAGTTCAAAATGTTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTATGGGCAGGT  
TACCACGTGTTACTACCCGTCCGCCGCTAACTTCATAAGAGCAAGCTCTTAATCCATTCGCTC  
GACTTGCATGTATTAGGCACGCCGACGCTTCATCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAATAAT  
CACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGATGCA  
TGTGT

**Rs16:**

GGGTAGCGGAGTCGCATGGCTCCCGGCCGCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTTTCTAGAGTTT  
GATCATGGCTCAAGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTG  
AGAGCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAA  
GACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCTGA  
AATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCTTCGCATTAGCTAGTTGGTGAG  
GTATCGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAC  
TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGT  
CTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAA  
GAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC  
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA  
GCGCGCGCAGGTGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTG

GAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGT  
AGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGAGGCGC  
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCT  
AAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG  
TACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG  
GTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAACCCTAGAGATA  
GGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGA  
TGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCAC  
TCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC  
TTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAGGACCGCGAGGTG  
GAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTG  
GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG  
CCCGTCACACACGGTACCATAAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTTCGACCATATGG  
AGAGCTCCCAACGCGTGGGATGCAGGTCT

## ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında İstanbul'un Fatih ilçesinde doğdu. İlköğretimi İstanbul'da, liseyi İstanbul Fatih Davutpaşa Lise'sinde okudu. 2006 yılında Ordu üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans öğrenimine başladı. 2010 yılında lisans öğrenimini bitirip, aynı yıl 2010'da Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 2013 yılının Kasım ayında Siirt Üniversite'si Zootečni Bölümü Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalına araştırma görevlisi olarak atanmıştır. İyi derecede İngilizce bilmektedir. Bu tez çalışması, Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 8642 no'lu proje ile desteklenmiştir.