

156094

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**COLEOPTERA TAKIMINA AİT FINDIK ZARARLILARINDA VİRÜS TESPİTİ VE
BİYOLOJİK MÜCADELEDE KULLANIM POTANSİYELİ**

Kazım SEZEN

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nce
"Doktor"
Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 17.05.2004

Tezin Savunma Tarihi : 11.06.2004

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mahmut EROĞLU

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Bilal KUTRUP

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Suat KIYAK

156094

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Yusuf AYVAZ

Trabzon 2004

ÖNSÖZ

“Coleoptera Takımına Ait Fındık Zararlılarında Virüs Tespiti ve Biyolojik Mücadelede Kullanım Potansiyeli” adlı bu çalışma, mikrobiyal mücadelede kullanılmak amacıyla ülkemizde yeni patojenik virüslerin araştırılması yönünde yapılan ilk çalışmalardan olup, bu araştırmanın bu alanda çalışacak yeni araştırmacılara bir temel teşkil edeceğini ümit ediyorum.

Tez süresince doktora tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi, gerekse çalışmaların yürütülmesi sırasında ilgisini ve emeğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, tezin geliştirilmesinde yardımcı olan tez izleme jüri üyelerimden sayın Prof. Dr. Mahmut EROĞLU’na ve sayın Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e, çalışmalarına proje desteği sağlayan Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne (Proje No: 21.111.004.4) ve Devlet Planlama Teşkilatı’na (Proje No: 21.111.004.1) ve tez süresince her türlü yardımlarını esirgemeyen tüm bölüm arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Kazım SEZEN
Trabzon, 2004

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET.....	VI
SUMMARY.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
SEMBOLLER DİZİNİ	X
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Fındığın Ülke Ekonomisindeki Yeri.....	3
1.3. Fındık Zararlılarının Ekonomik Önemi.....	4
1.4. Patojen Virüslerin Araştırılacağı Fındık Zararlıları.....	5
1.4.1. Kızılağaç Yaprak Böceği, <i>Agelastica alni</i> (L.) (Coleoptera:Chrysomelidae).....	5
1.4.2. Gün Dönümü Böceği, <i>Amphimallon solstitiale</i> (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae).....	6
1.4.3. Fındık Yaprak Deleni, <i>Anoplus roboris</i> (Suf.) (Coleoptera: Curculionidae).....	6
1.4.4. Fındık Kurdu, <i>Balaninus nucum</i> (L.) (Coleoptera: Curculionidae).....	7
1.4.5. Adi Mayıs Böceği, <i>Melolontha melolontha</i> (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae).....	8
1.5. Zararlı Böceklerle Mücadele Yöntemleri.....	9
1.5.1. Kimyasal Mücadele ve Etkileri.....	10
1.5.2. Biyolojik Mücadele.....	11
1.6. Böcek Virüsleri.....	12
1.7. Mikrobiyal Mücadelede Virüslerin Kullanımı.....	17
1.8. Böcek Virüslerinin Zirai Mücadelede Kullanım Avantajları.....	20
1.9. Böceklerde Virüslerin Araştırılması.....	20
1.10. Entomopoxvirüslerin Sınıflandırılması, Yapısı ve Biyolojisi.....	20
1.11. Entomopoxvirüslerin Biyoteknolojik Önemi.....	24
1.12. Tezin Amacı.....	25

2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	26
2.1.	Böceklerin Toplanması.....	26
2.2.	Böceklerin Makroskopik İncelenmesi.....	27
2.3.	Hastalıklı ve Ölü Böceklerin Ayrılması	28
2.4.	Böceklerde Virüslerin Araştırılması.....	28
2.4.1.	Işık Mikroskobu ile Virüs Varlığının Tespiti.....	28
2.4.1.1.	Giemsa ile Sferoidlerin Boyanması	29
2.4.1.2.	Buffalo Black 12B ile Sferoidlerin Boyanması.....	29
2.4.2.	Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile Virüs Varlığının Tespiti.....	29
2.4.3.	DNA-DNA Hibridizasyon Yöntemi ile Virüs Varlığının Tespiti.....	30
2.4.3.1.	MmEPV Sferoidlerinin İzolasyonu ve Saflaştırılması.....	30
2.4.3.2.	MmEPV DNA'sının İzolasyonu.....	30
2.4.3.3.	Virüs İçin Özel DNA Probu Hazırlanması.....	31
2.4.3.4.	Slot-Blot Hibridizasyonu.....	31
2.5.	Tespit Edilen Virüs'ün (MmEPV) Özelliklerinin Belirlenmesi.....	32
2.5.1.	MmEPV'nin SDS-PAGE Analizi.....	32
2.5.2.	MmEPV'nin Histopatolojisi.....	33
2.5.3.	MmEPV'nin Morfolojik Özellikleri.....	33
2.5.4.	MmEPV'nin İnsektisidal Etkisinin Belirlenmesi.....	33
2.5.5.	MmEPV Enfeksiyonunun Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi.....	34
2.5.6.	MmEPV'nin Konak Hassasiyetinin Belirlenmesi.....	34
2.5.7.	MmEPV'nin Horizontal Enfeksiyonunun Belirlenmesi.....	35
2.6.	Çeşitli Entomopoxvirüslerin İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi.....	35
3.	BULGULAR.....	36
3.1.	Viral Enfeksiyon Gösteren Larvaların Belirlenmesi.....	36
3.2.	Işık Mikroskobu ile MmEPV'nin İncelenmesi.....	37
3.3.	Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile MmEPV'nin İncelenmesi.....	39
3.4.	Slot-Blot Hibridizasyonu	41
3.5.	MmEPV'nin Özellikleri.....	42
3.5.1.	Viral Proteinlerin SDS-PAGE Analizi.....	42
3.5.2.	MmEPV'nin Histopatolojisi.....	43

3.5.3.	MmEPV'nin Morfolojik Özellikleri.....	43
3.5.4.	MmEPV'nin İnsektisidal Etkisi.....	44
3.5.5.	MmEPV Enfeksiyonunun Optimum Sıcaklığı.....	45
3.5.6.	MmEPV'nin Konak Hassasiyeti.....	45
3.5.7.	MmEPV'nin Horizontal Enfeksiyonu.....	46
3.6.	Çeşitli Entomopoxvirüslerin İnsektisidal Etkileri.....	46
4.	TARTIŞMA.....	47
5.	SONUÇLAR.....	53
6.	ÖNERİLER.....	54
7.	KAYNAKLAR.....	55
	ÖZGEÇMİŞ.....	61



ÖZET

Kızılağaç yaprak böceği, *Agelastica alni* (L.) (Coleoptera: Chrysomelidae), gün dönümü böceği, *Amphimallon solstitiale* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae), fındık yaprak deleni, *Anoplus roboris* (Suf.) (Coleoptera: Curculionidae), fındık kurdu, *Balaninus nucum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) ve adi mayıs böceği, *Melolontha melolontha* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae), Coleoptera takımına ait önemli fındık zararlılarıdır. Şu ana kadar bu zararlılar ile mücadele büyük oranda kimyasal ilaçlar ile yapılmaktadır. Kimyasal ilaçların yan etkilerinin keşfedilmesi, bilim adamlarını daha etkili ve daha güvenli bir mücadele yöntemi geliştirmeye sevk etmiştir. Bu çalışmada, Coleoptera takımına ait olan *A. alni*, *A. solstitiale*, *A. roboris*, *B. nucum* ve *M. melolontha*'da patojenik virüslerin tespiti, izolasyonu, karakterizasyonu, histopatolojisi, enfeksiyon özelliği, konak hassasiyeti ve horizontal enfeksiyonu araştırıldı. Adi mayıs böceği larvalarında bir viral enfeksiyon belirlendi. Yapılan ışık mikroskobu, elektron mikroskobu ve moleküler çalışmalar sonucunda tespit edilen virüsün entomopoxviridae familyasından *Melolontha melolontha* entomopoxvirüsün yeni bir izolatu olduğu belirlendi (MmEPV-TR). Işık ve elektron mikroskobu sonuçlarına göre, virüse ait sferoidlerin uzunluğu $5,45 \pm 2,34 \mu\text{m}$, genişliği ise $2,89 \pm 1,13 \mu\text{m}$ olarak tespit edildi. Mikroskobik çalışmalara ilave olarak virüsün varlığı ayrıca fusolin geni için özel prob kullanarak DNA-DNA hibridizasyon yöntemi ile moleküler olarak da tespit edildi. Yapılan bioassay çalışmaları MmEPV'nin ikinci-üçüncü evre *M. melolontha* larvaları üzerinde çok etkili olduğunu gösterdi. En yüksek insektisidal etki $7,5 \times 10^6$ sferoid/ml konsantrasyonla % 93,3 olarak belirlendi.

Yapılan çalışmalar, dünyada ikinci Türkiye için ilk ve tek izolat olan *M. melolontha* entomopoxvirüsün, *M. melolontha* larvaları ile biyolojik mücadelede etkili bir ajan olarak kullanılabilmesi sonucunu ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler : *Melolontha melolontha*, Mikrobiyal Mücadele, Entomopoxvirüs

SUMMARY

Determination of Viruses from Coleopteran Pests of Hazelnut and the Potential Usage as Biological Control Agent

Alnus beetle, *Agelastica alni* (L.) (Coleoptera: Chrysomelidae), summer chafer, *Amphimallon solstitiale* (L.) (Coleoptera: Scarabeidae), hazelnut leaf holer, *Anoplus roboris* (Suft.) (Coleoptera: Curculionidae), hazelnut weevil, *Balaninus nucum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) and common cockchafer, *Melolontha melolontha* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae) are very important hazelnut pests belong to Coleoptera order. Up to now, the chemical pesticides have been mostly utilized to control these pests. However, recent concern on the hazardous effects of chemical pesticides made scientists consider finding more effective and safer control agents. In this study, the isolation, characterization, histopathology, infection, host spectrum and horizontal infection of pathogenic viruses were investigated on the coleopteran hazelnut pests, *A. alni*, *A. solstitiale*, *A. roboris*, *B. nucum* and *M. melolontha*. The viral infection was observed only in the larvae of common cockchafer. Morphological, microscopical and molecular studies of the virus showed that the virus is an entomopoxvirus called MmEPV-TR. This study is the first record of *M. melolontha* entomopoxvirus in Turkey. It is also the second isolate in all over the world. Based on the results of light and electron microscopy studies, the length of spheroids was $5,45 \pm 2,34 \mu\text{m}$, the width of spheroids was $2,89 \pm 1,13 \mu\text{m}$. The presence of virus was also demonstrated by DNA-DNA hybridization assay using fusolin gene specific probe of *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae) entomopoxvirus. The bioassays carried out to determine the infectivity of the MmEPV showed that it is very effective on the second-third instar larvae of *M. melolontha*. The highest insecticidal activity determined on *M. melolontha* larvae was 93,3 % with $7,5 \times 10^6$ spheroids/ml dosage.

Our results showed that Turkish isolate of *M. melolontha* entomopoxvirus will provide a means of obtaining new control opportunities more proper than with conventional techniques of insecticides applications.

Key words: *Melolontha melolontha*, Microbial Control, Entomopoxvirus

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Vaccinia virüs ve entomopoxvirüs gruplarına ait virüs şekilleri.....	21
Şekil 2. Entomopoxvirüsün böcek larvasındaki replikasyonunun şematik görünümü.....	22
Şekil 3. <i>M. melolontha</i> larvalarının görünüşü.....	36
Şekil 4. MmEPV'nin ışık mikroskobu görüntüleri	38
Şekil 5. MmEPV'nin elektron mikroskobu görüntüleri.....	40
Şekil 6. MmEPV DNA'sının slot-blot hibridizasyonu yöntemi ile belirlenmesi.....	41
Şekil 7. MmEPV sferoidin ve fusolin proteinlerinin % 10'luk SDS-PAGE görüntüsü...	42
Şekil 8. Yağ dokusu içinde toplu halde MmEPV sferoidleri.....	43
Şekil 9. MmEPV sferoid boylarının dağılımı.....	44
Şekil 10. MmEPV'nin horizontal enfeksiyonu.....	46

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Türkiye'nin son yıllardaki fındık ihracat miktarları.....	4
Tablo 2. Coleoptera grubu böceklerden izole edilen virüsler.....	13
Tablo 3. Entomopoxvirüslerin sınıflandırılması.....	14
Tablo 4. Yaygın olarak kullanılan çeşitli virüs preparatları ve etkili olduğu konaklar... ..	18
Tablo 5. En yaygın böcek virüsü familyaları ve kaydedildiği konakları.....	19
Tablo 6. Böcek virüslerinin makroskobik araştırılması için kontrol listesi.....	27
Tablo 7. Viral enfeksiyon oranı.....	37
Tablo 8. MmEPV'nin insektisidal etkisi.....	44
Tablo 9. MmEPV'nin farklı sıcaklıklardaki insektisidal etkisi.....	45
Tablo 10. Bazı EPV'lere ait sferoid boyutları	48
Tablo 11. Bazı Coleoptera entomopoxvirüslerinin morfolojik özellikleri.....	49

SEMBOLLER DİZİNİ

CPV	: Sitoplazmik polihedrozis virüs
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EPV	: Entomopoxvirüs
GV	: Gronülozis virüs
IV	: Iridescent virüs
NPV	: Nukleopolihedrovirüs
RNA	: Ribonükleik asit
TEM	: Transmisyon elektron mikroskobu
DDT	: Dikloro difenil trikloro ethan
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Fındık hem önemli bir tarım ürünü hem de tarıma dayalı sanayinin önemli bir ham maddesidir. Fındık, ihrac ürünlerinin en önemlilerinden biri haline gelmiş olup, ülkemize her yıl 600-900 milyon dolar döviz girdisi sağlamaktadır. Özellikle Doğu Karadeniz’de istihdamı sağlayarak sosyal bir işleve katkıda bulunmakta ve ayrıca bölgenin yüksek eğimli arazilerinde toprak işlemeye dayalı tarımsal uygulamaların aksine toprakları da erozyondan koruyarak çevresel katkı sağlamaktadır (Yaşaroğlu, 2000).

Fındık üreten ülkeler arasında üretim ve ihracat bakımından ilk sırada yer almamıza rağmen, birim alandan alınan ürün miktarına göre diğer üretici ülkelerin gerisinde bulunmaktayız (Kılıç, 1994). Ülkemizde verimin düşük olmasının başlıca nedenlerinden biri fındık zararlısı böcekler ile mücadelenin tam ve etkili bir şekilde yapılamamasıdır. Her yıl fındık üretiminde %30-40 kayıp oluşturan bu zararlılar ile mücadele büyük oranda kimyasal ilaçlarla yapılmaktadır. Bununla birlikte, kimyasal insektisitler sadece zararlı böceklere değil, aynı zamanda zararsız ve hatta faydalı böcekler ve diğer organizmalara da zarar vermektedir. Buna rağmen kimyasal insektisitler, ucuz ve çok sayıda farklı böcek için kullanılabilirliklerinden diğer alternatiflerine oranla daha çok tercih edilmektedirler. Bununla birlikte, şu anda tüm dünyada kimyasal ilaçların yerini gelecekte biyolojik mücadele olarak bilinen bir yöntemin alacağı tartışılmaktadır.

Biyolojik mücadele, böceklerin yapmış olduğu zararları en aza indirmek için bu böceklerin doğal düşmanlarını kullanma olarak tanımlanabilir. Doğal düşman terimi, parazitler ve predatörlerle birlikte hastalık oluşturan organizmaları da kapsar. Ancak hastalık yapan organizmaların kullanımı, genellikle “mikrobiyal mücadele” olarak adlandırılır (Peter, 1984). Biyolojik mücadelenin büyük bir avantajı kimyasal mücadele yöntemleriyle bağlantılı birçok problemi ortadan kaldırmasıdır. Bu nedenle biyolojik mücadele, kimyasal mücadele ile karşılaştırıldığında ekolojik dengeyi bozmayan alternatif bir mücadele yöntemidir.

Kimyasal pestisitlerin olumsuz etkileri, predatör ve parazitoidler ile mikrobiyal insektisitler gibi biyolojik olarak güvenilir alternatiflerin araştırılmasına sebep olmuştur. Zira mücadelede zararlı böceklere karşı kullanılan predatör ve parazitoidlerin yanında

mikrobiyal insektisitlerin pek çoğu bakteriler, virüsler, mantarlar, nematodlar ve protozoa gruplarına ait organizmalardır. Bu gruplar içerisinde bulunan bazı organizma veya biyolojik mücadele ajanları, zararlı böceklerin çoğalmalarını engelleyebildiklerinden zirai mücadelede bunlardan istifade edilmektedir. Bunlar arasında, virüsler en çok gelecek vaadeden biyolojik mücadele ajanlarıdır (Cunningham ve Entwistle, 1981; Cunningham, 1988; Payne, 1988).

Virüslerin biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılmasının pek çok avantajı vardır. Bunların başında dar konak spektrumuna sahip olmaları yani doğrudan hedefledikleri organizmalar üzerinde etkili olmaları gelmektedir. Ayrıca insanlarda hastalık oluşturmamaları ve kolay degradasyona uğrayabilmeleri açısından da oldukça önem arz ederler (Demirbağ ve Beldüz, 1997). Virüsler böceklerin tabiattaki doğal düşmanları olup, özellikle baculovirüsler sadece böceklerde hastalık oluşturdıklarından, diğer omurgalılarda enfeksiyon oluşturmadıklarından güvenli biyolojik mücadele materyalleridirler. Ayrıca bu virüsler üzerinde genetik modifikasyonlar yapılarak sadece bir tür zararlı böceği öldüren ajanlar geliştirilebilir. Yine amaca uygun olarak, birden fazla zararlı böcek, rekombinant tekniklerle geliştirilen rekombinant bir virüs ile de öldürülebilir (Martens vd., 1990).

Böcekleri enfekte eden yaygın virüsler *Baculoviridae*, *Reoviridae*, *Entomopoxviridae*, *Picornaviridae*, *Iridoviridae*, *Parvoviridae*, *Ascoviridae*, *Tetraviridae* ve *Polydnviridae* familyalarına aittirler (Evans ve Shapiro, 1997; Miller ve Andrew Ball, 1998).

Zararlı böcekler ile mücadelede yaygın olarak kullanılan kimyasal insektisitlerin çevreye yapmış oldukları kötü etkilerden kurtulmak ve geleceğimizi güvence altına almak için biyolojik mücadeleye yönelim kaçınılmaz olmuştur. Biyolojik mücadelede kullanılan ajanlardan virüsler zararlıların doğal düşmanları olup çoğunlukla sadece o zararlı üzerinde etkiye sahiptirler. Böcek virüslerinin izole edilip geliştirilerek fındık zararlısı böcekler ile mücadelede kullanılması, sürdürülebilir fındık üretiminde kimyasalların kullanımını büyük ölçüde sınırlandırabilecektir.

Tüm dünyada böcek virüslerinin tabiattan izole edilmesine ve etkili bir biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılmasına yönelik çalışmalar hızla ilerlerken, ülkemizde bu konu üzerindeki çalışmalar yok denecek kadar azdır.

Coleoptera takımına ait olan *Agelastica alni* (L.), *Amphimallon solstitiale* (L.), *Anoplus roboris* (Sufr.), *Balaninus nucum* (L.) ve *Melolontha melolontha* (L.) fındık

bahçelerinde büyük ekonomik kayıplara neden olan etkili tarımsal zararlılardır (Tuncer ve Ecevit, 1996). Bu zararlılar fındık aēalarının yapraklarını, meyvelerini ve köklerini yiyerek ekonomik açıdan önemli zararlara sebep olurlar.

Bu nedenlerden dolayı, bu doktora çalışmasında fındık bahçelerinde zararlı olan Coleoptera takımına ait böceklere karşı güvenli bir biyolojik mücadele ajanın geliştirilmesi amacıyla, zararlı populasyon yoēunluklarını kontrol eden virüslerin tespit edilmesi ve bu zararlılar üzerindeki etkilerinin belirlenmesi, saflaştırılması, tanımlanması ve geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

1.2. Fındığın lke Ekonomisindeki Yeri

Bazı yıllar üretimi 250,000 tonu aşan fındık, ülkemizde yaklaşık 500,000 hektar alanda üretilmekte olup, yaklaşık 450,000 ailenin geçimini bu üründen saēladıēı ve ülke ekonomisine yıllık ortalama 650 milyon dolar katkıda bulunduēu bilinmektedir (Kılıç, 1994, Yařaroēlu, 2000).

Türkiye, dünya üzerinde en önemli fındık üreticisi ve ihracatçısı ülke konumundadır. Dünya fındık üretiminin %70'ini, ihracatının da %70-80'ini Türkiye gerçekleştirmektedir.

Tablo 1'de Türkiye'nin son yıllarda gerekleřtirdiēi rekolte ürün miktarı ve ihracat fiyatları verilmiştir. Bu tabloyu incelediēimizde fındığın ülke ekonomisindeki yeri daha iyi anlaşılmaktadır.

Tablo 1. Türkiye'nin son yıllardaki fındık ihracat miktarları

Yıllar	İhracat (Ton-İç)	Gelir (\$)
1990	195,645	550,976,582
1991	167,938	468,707,040
1992	173,213	447,744,213
1993	193,608	567,979,042
1994	186,256	711,684,631
1995	241,357	767,912,815
1996	198,402	613,207,980
1997	202,909	925,651,050
1998	200,344	860,414,576
1999	189,261	708,206,240
2000	177,081	586,892,430
2001	258,124	739,970,130
2002	247,739	615,802,000
2003	255,918	593,690,721
Ortalama	206,271	654,200,246

1.3. Fındık Zararlılarının Ekonomik Önemi

Zararlı böcekler larvaları ziraat ve ormancılıkta büyük kayıplara yol açmaktadır (Payne, 1988). Fındık zararlısı böcekler fındığın meyvesi, taze sürgünü, yaprak, kök ve gövdesi üzerinde çeşitli zararlar oluştururlar. Her yıl fındık üretiminde %30-40 kayıp oluşturan bu zararlılar ile mücadele büyük oranda kimyasal ilaçlarla yapılmaktadır. Bununla birlikte, kimyasal insektisitler sadece zararlı böceklere değil, aynı zamanda zararsız ve hatta faydalı böcekler ve diğer organizmalara da zarar vermektedirler.

Dünyada tarım ilacı üretimi 3 milyon ton civarında, yıllık satış tutarı ise 25-30 milyar dolar arasında değişmektedir. Dünya pestisit pazarı 1998 de 1993'e göre %2.5'lik yıllık büyüme ile 31 milyar dolara ulaşmıştır. Türkiyede ise 1999 sonu itibariyle 2000'e yakın ruhsatlı ilaç olup bunlar içerisinde yer alan teknik madde sayısı 300 civarındadır.

Bunların 16 tanesi ülkemizde üretilmekte olup, diğerleri ithal edilmekte veya hazır ilaç olarak ülkemize girmektedir. Ülkemizde yıllık pestisit satışı 250 milyon dolar civarındadır. Türkiye'ye kıyasla Fransa ve Almanya'da 9, İtalya'da 15, Hollanda'da 35, Yunanistan'da 12, Belçika'da 21, ABD'de 15, İsviçre ve Japonya'da 17 kat daha fazla ilaç tüketilmektedir (Dağ vd., 2000).

Ülkemizde fındık zararlılarına karşı kullanılan kimyasallar ilaçlar diazinon, azinphos metil, malathion, triflumuran, omethoate, carbaryl, endosülfan, methiocarb, promecarb, chlorpyrifos, dioxacarb ve carbosülfan'dır (T. C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, 1995b).

1.4. Patojen Virüslerin Araştırılacağı Fındık Zararlıları

1.4.1. Kızılağaç Yaprak Böceği, *Agelastica alni* (L.) (Coleoptera: Chrysomelidae)

Kızılağaç böceği, parlak mor görünüşlü, mavi renkte ve 7 mm boyundadır. Larvalar ise siyah renkte, az tüylü ve 12 mm boyundadır.

Kışı kuytu, korunaklı yerlerde ve toprakta geçiren erginler, ilkbaharda havalar ısınınca fındık tepe yaprakları üzerinde görülürler. Mayıs ayından sonra kızılağaçların gölgesinde kalan dip yapraklarını tercih ederler. 15-20 gün beslendikten sonra çiftleşen dişiler yumurtlamaya başlarlar. Yumurtlama süresi 1,5 ay kadardır. Bu sürede bir dişi 250-600 yumurtayı yaprak alt yüzüne gruplar halinde bırakır. Kuluçka süresi ortalama 7 gündür. Yaprak alt yüzünde toplu olarak beslenen larvalar, 3 deri değiştirip 25-30 günde olgunlaşırlar. Olgunlaşan larvalar toprağa iner ve hazırladıkları yüksükler içerisinde pupa olurlar. Yaz ortasında bu pupalardan çıkan erginlerin bir kısmı tekrar ikinci döl verirler. Erginler yapraklarda 3-5 mm çapında delikler açarlar. Larvalar ise yaprağın ince damarlarına dokunmaksızın alt yüzünden kemirerek onu iskeletleştirirler. Salgın yıllarında kızılağaç ve fındıklar çok şiddetli zarar görürler (T. C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, 1995a).

1.4.2. Gün Dönümü Böceği, *Amphimallon solstitiale* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae)

Erginler 15-20 mm boyunda, genellikle parlak kırmızımsı kahverengi rengindedir. Ancak bacak ve antenleri daha koyu renktedir. Göğüs ve kanatları yoğun tüylüdür. Yumurtaları kirli beyaz renkte, oval biçimde ve 2-2,5 mm boyundadır. Larvalar karakteristik olarak kıvrık olup karının arka ucu tipik olarak şişkindir. Tam gelişmiş larvanın boyu 2-2,5 cm kadar olur.

İlkbaharda havaların ısınması ile erginlerin çıkışı başlar. En yoğun olarak görüldükleri aylar yaz aylarıdır. İlk ergin çıkışının uçuşlarının görülmesinden 1-2 hafta sonra yumurtlama başlar. Yumurtalar bahçelerde toprağın yapısına bağlı olarak genellikle 5-15 cm derinliğe bırakılır. Yumurtaların açılma süresi ortam şartlarıyla değişmekle beraber 1-2 hafta kadardır. Çıkan larvalar gelişmelerini iki yılda tamamlarlar ve bu süre içinde 3 dönem geçirirler. Larvalar ikinci yıl baharda pupa haline geçerler.

Erginler yaprak ve çiçek üzerinde beslenerek zarar yaparlar. Her ne kadar erginler bitkilerin taze kısımlarını yerse de esas zararı larvalar yapar. Larvalar fındıkların köklerini yiyerek bitkiye zarar verirler. Bunun sonucunda fındık kökleri tahrip edildiğinden bitki tamamen kuruyabilir (Lodos, 1995).

1.4.3. Fındık Yaprak Deleni, *Anoplus roboris* (Sufr.) (Coleoptera: Curculionidae)

Fındık yaprak deleni grimsi siyah renkte, tüylerle kaplı, kısa ve küt hortumlu bir böcektir. Larvaları ise açık sarı renktedir.

Kışı korunaklı yerlerde ve toprakta geçiren erginlerin, ilkbaharda tomurcukların patlama döneminde fındık tomurcuk ve yapraklarında beslenmeye başladıkları görülür. Bir iki hafta beslenen dişiler çiftleşerek yumurtlamaya başlarlar. Nisan başlarına rastlayan bu dönem 1 ay sürer ve bir dişi ortalama 45 yumurta bırakır. Yumurtlama süresi 1,5 ay kadardır. Yumurtalar yaprak alt yüzünde çoğunlukla orta damar olmak üzere, damarlar üzerinde hazırlanan yuvalara bırakılır. Kuluçka süresi ortalama 1 haftadır. Çıkan larvalar yaprak dokusu içinde beslenerek galeriler meydana getirirler. Olgunlaşan larvalar toprağa inerek pupa olurlar. Larvanın 10 günde pupa olduğu, pupa süresinin ise 26 gün olduğu

saptanmıştır. Pupalardan çıkan erginler yaprak alt yüzünde beslenerek kışlağa çekilirler. Ergin ömrü 168 gündür. Yılda bir döl verirler.

İlkbaharda erginler genç yapraklarda çok sayıda küçük delikler açarlar. Yaprak büyüdükçe bu delikler genişler. Yaz ve sonbaharda ise yaprak alt yüzünde çok sık ve küçük delikler açarlar. Ayrıca erginler yumurtalarını damarlar üzerine koyduğundan damarlarda kırılmalara ve gelişme bozukluklarına yol açarlar.

Larvalar ilkbahar döneminde genç yaprakların epidermisleri altında galeriler açarak beslenirler. Yapraklar gelişince bu galeriler genişler ve yırtılmalar meydana gelir. Bu dönemde zarara uğrayan bahçeler kahverengi bir görünüş arz ederler. Zararlı, yaygın olduğu bahçelerde önemli ekonomik kayıplara neden olur. Yapraklarda beslendikleri ve yumurta koydukları için %15-20 zarar meydana getirdikleri tespit edilmiştir (T. C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, 1995a).

1.4.4. Fındık Kurdu, *Balaninus nucum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae)

Erginler kül renginde görülür, 6-9 mm boyunda ve hortumludur. Bacaksız olan larvaları beyaz, tombul ve kıvrıktır. İlk erginler baharın başında görülür. Erginlerin çıkışı bahar sonuna doğru oldukça fazlalaşır. Çıkan erginler 16°C'den düşük sıcaklıklarda fazla aktif değildirler. Nisan sonlarında ergin çıkışı tamamlanmış olur. Yumurtlayıncaya kadar uzun bir süre beslenirler. Ancak sıcaklık 20°C'ye erişinceye kadar böcekler uçmadığı için, aynı ocak üzerinde beslenmek zorunda kalırlar. Haziran ayında yumurtlamaya başlarlar. Bir dişi ortalama 42 yumurta bırakır. Yumurta kuluçka süresi 8 gündür. Yumurtadan çıkan larva iç fındık üzerinde bir ay kadar beslenip gelişir. Gelişen larva kabuk üzerinde 1,5-2 mm çapında bir çıkış deliği açarak toprağa iner. Larvalar hazırladıkları yuva içerisinde pupa ve ergin olurlar. Burada 1-3 yıl kaldıktan sonra çıkarlar. Ergin ömrü 3 ay kadardır.

Fındık kurdu, beslenme ve yumurta bırakma yoluyla meyvelerde zararlı olan bir böcektir. Normal iriliğe erişinceye kadar zarar gören meyvelerde kabuk içindeki etli kısım bozularak sarı bir renk alır. Sonradan bu renk kabuk üzerinde de belirir. Meyve beslenmediği için kabukta çöküntüler oluşur. Bu zarar şekline halk arasında "sarı karamuk" denir. Bu zarar meyve olgunlaştıktan sonra meydana gelirse, meyve içi kararır, bu da halk arasında "kara karamuk" olarak bilinir (T. C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, 1995a).

1.4.5. Adi Mayıs Böceği, *Melolontha melolontha* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae)

Erginler 2,5-3 cm boyunda, genellikle kızıl kahverengi görünüştedirler. Göğüs parlak siyah olmasına rağmen üzeri sarı-gri sık tüylerle kaplı bulunduğundan esas rengi belli olmaz. Dişilerin antenleri küçük ve 6 yapraklı, erkeklerinki ise büyük, 7 yapraklı ve yelpaze şeklindedir. Karın parlak siyah, yanlarında üçgen şeklinde 5 adet beyaz leke vardır. Yumurta oval, krem renkte ve 2 mm boyundadır. Larvalar karakteristik olarak karın etrafında kıvrık, tombul ve beyazdır. Üç çift bacağı vardır. Vücudun son halkası çok büyümüş ve şişkin bir hal almıştır. Tam gelişmiş larvanın boyu 4-4,5 cm kadar olur. Pupalar tam şekillendiği zaman koyu kahverengidir.

İlkbaharda havaların ısınması ile erginlerin önce erkekleri sonra dişileri topraktan çıkar. Çıkış 1-3 hafta devam eder. Güneş battıktan sonra uçarak ağaçlar üzerine konar, yaprak ve çiçeklerle beslenirler. Dişiler çiftleştikten sonra yumurtalarını özellikle 2-3 yıl işlenmemiş ve üzeri hafif otlanmış bahçelerde toprağın 15-25 cm derinine, 10-30'luk gruplar halinde koyarlar. Bir dişi ortalama 60 yumurta bırakır. Yumurtaların kuluçka süresi ortalama 30 gündür. Çıkan larvalar iki ay sonra deri değiştirerek 2. dönem larva olurlar. Sonbaharda kışı geçirmek üzere toprağın derinliklerine inerler. Bu derinlik fındıklarda 50 cm kadardır. Bahara kadar devam eden hareketsiz dönemden sonra yaza kadar, oburca beslenerek önemli zarar yaparlar. Daha sonra bir deri daha değiştirip 3. dönem larva haline gelirler. Bu dönemin süresi 1 yıldır ve en önemli zararlarını bu dönemde yaparlar. Kışı toprağın 60 cm kadar derinliğinde geçirirler. Temmuz ayında yüzeyden 15-35 cm derinde bir yuva içinde pupa olurlar. Böylece gelişmeleri 3 yılda tamamlanır.

Çeşitli ülkelerde 60 kadar bitki türünde zarar yaptığı belirlenmiştir. Erginler yaprak ve çiçek üzerinde beslenerek zarar yaparlar. Larvalar ilk dönemlerinde ot kökleriyle beslendiklerinden fındık ve fidanlıklarda fazla zararlı değildirler. Fakat ikinci dönemde larvaların gelişimleri hızlanır ve oburca beslenmeye başlarlar. Fındıkların 1 cm çapına kadar olan köklerini kolayca koparıp saçak köklerden bitkiyi mahrum bırakırlar. Bunun sonucunda fındık dallarında uç kurumalar başlar ve kurumalar ana dallara ilerler. Larvaların 3. dönemdeki zararı 2. dönemdekinden daha fazladır. Bazı bahçelerde %50 dolaylarında zarar yaptığı saptanmıştır. Karadeniz Bölgesi'nin bazı fındık bahçelerinde m²'de 30 kadar larva bulunduğu ve o ocağın kısa zamanda kuruduğu tespit edilmiştir (T. C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, 1995a).

1.5. Zararlı Böceklerle Mücadele Yöntemleri

Zararlılar ile mücadele, çoğu kitle üremesi yapan veya yapma yeteneğinde olan böcek populasyonlarının sayısının artmasını engellemek için gerçekleştirilen mücadele olarak tanımlanabilir. Zararlılar ile mücadele çeşitli şekillerde yapılmaktadır (Çanakçıoğlu, 1971; Peter, 1984).

Doğal Mücadele: İnsanın herhangi bir yardımı olmadan doğal kuvvetlerle böcek populasyonlarının kontrol altında tutulması olayıdır. Çevre direncinin bir sonucu olarak böceklerin önemli bir kısmı ya çoğalmadan ya da çoğaldıktan sonra ölür.

Yasal Mücadele: Yasal yollardan yararlanılarak zararlıların yayılmalarını önlemektir. Örneğin, karantina, ambargo, muayene veya sertifika uygulamak.

Mekanik Mücadele: Böcekleri toplamak, pusuya düşürmek, yem tuzakları kurmak, feromonları kullanmak, tuzak odunları hazırlamak veya gıda değişimi yapmak suretiyle gerçekleştirilir.

Fiziksel Mücadele: Böceklerin yakılması, sıcaktan ve nemden yararlanılarak böceklerin öldürülmesi, elektrik veya radyoaktivite kullanarak böceklerin kısırlaştırılması işlemlerini içerir.

Kültürel Mücadele: Toprak bakımı, işlenmesi ve gübrenmesi, yabancı ot ve artıkların temizlenmesi ve bitki nöbetleşmesi gibi toprakla ilgili yapılması gereken işleri kapsar.

Kimyasal Mücadele: Bilindiği gibi, yüzlerce sentetik organik toz (kuru) veya sulu halde pestisidlerin kullanılması suretiyle yapılan mücadeledir.

Biyolojik ve Biyoteknik Mücadele: Böcek populasyonlarını dolayısıyla böcek zararını azaltmak için canlı organizmalardan (mikroorganizmalar, predatörler, parazitoid böcekler, omurgasızlar, omurgalılar, feromonlar ve genetik kontroller) yararlanılarak yapılan mücadele biyolojik ve biyoteknik mücadele olarak bilinmektedir.

Bu mücadele yöntemlerinden ülkemizde fındık alanlarında en yaygın olarak kullanılanı kimyasal mücadeledir. Kimyasal ilaçlar kullanılırken, bunların bir çok yan etkileri ortaya çıkmaktadır. Birçok yönden bazı canlı grupları ciddi zararlar görmektedirler.

1.5.1. Kimyasal Mücadele ve Etkileri

Zararlı ile mücadelede yaygın olarak kullanılan insektisitler bitkiler, hayvanlar, insanlar ve çevre üzerinde bir çok zararlı etkiler meydana getirmektedirler. İsektisitlerin zararlarını böcekler, insanlar ve çevre üzerine olan etkileri olarak başlıca üç başlık altında toplayabiliriz.

Böcekler Üzerine Etkileri: İsektisitler her ne kadar zararlı böcekleri yok etmek için kullanılsalar da, her zaman zararlı böceklere karşı tam bir etki sağlayamazlar. Çünkü zamanla insektisitlerin ilk tatbik edildikleri zamanki etkili dozlarından daha az etkilenebilen ırklar ortaya çıkmaktadır. Bu olaya böceklerin direnci adı verilmektedir. Böcekler belli başlı insektisit sınıflarının hepsine direnç geliştirmişlerdir. Dolayısıyla bu yeni fertlere karşı kullanılan insektisitler daha çok çevredeki yararlı canlıları ve insanları etkilemektedir (Ecevit, 1988).

Ayrıca insektisitlerin kullanıldığı alanlarda doğal olarak yaşayan tozlaşmayı sağlayan böceklerde yok olduğu için, bu alandaki zirai ürünlerde tozlaşma oranı azalmaktadır. Bunun sonucunda büyük verim düşüklüğü ortaya çıkmaktadır.

İnsanlar Üzerine Etkileri: İsektisitler doğrudan ve dolaylı olarak insan sağlığını etkilemektedirler. Bu etki akut ve kronik zehirlenme olarak iki grup altında toplanabilir. Tehlikeye en çok maruz kalan kişiler ilacı kullanan veya bu işle meşgul olan kişilerdir. Akut zehirlenme, zirai mücadele ilaçlarının fazla miktarda alınmasıyla olan zehirlenme olarak ortaya çıkmaktadır. Fakat, kronik zehirlenme olarak adlandırılan öldürücü dozların çok altındaki dozların kalıntılarında bütün insanlar nasibini almakta ve yavaş yavaş zehirlenmektedirler. İlaç uygulanan alanda kısa bir süre sonra hayvan otlatılırsa, zehir hayvanın bünyesine taşınır. Ayrıca arazideki ilaç hemen ardından yağın bir yağmurla derelere ve oradan da denizlere taşınır. Burada hem hayvanların (koyun, inek v.s.) hem de sularla balıkların yapısına giren kimyasallar beslenme yolu ile insanlara kadar ulaşır. İnsanlar üzerinde en etkili bileşikler, başta arsenik olmak üzere fosfor asidi ester preparatları, DDT ve toxaphen gibi klorlu hidrokarbonlardır.

Çevreye Olan Etkileri: İsektisitler genellikle bitkilerin yaprak ve yeni sürgünlerinde yanma denilen bir takım lekeler ile renk değişimlerinin meydana gelmesine ve kurumalara yol açmaktadırlar. Bazen kullanılan insektisitlerden biri bitkiler üzerinde zararlı olmazken iki preparat aynı anda uygulandığında çok tehlikeli olabilmektedir.

Özellikle dinitro bileşikleri ile yapılan ilaçlamalarda bitkiler çok etkilenmektedirler (Çanakçıoğlu, 1970).

Bazı kirleticilerin hava, su ve toprakta düşük miktarlarda bulunsalar bile, besin zincirlerinin birbirini izleyen halkalarındaki tüketicilerde giderek artan yoğunluklarda bulunması olayına "biyolojik birikim" denir.

Biyolojik birikimin etkilerinin değişik organizmalarda ve durumlarda farklı biçimlerde ortaya çıktığı anlaşılmaktadır. Bu tür maddelerin insan dokularında da biriktiği gözlenmekte, bu da insan sağlığı açısından kuşku yaratmaktadır. Örneğin, yapılan çalışmalarla yüksek poliklorürlü bifenil oranları ile karaciğer kanseri arasında ilişki olduğu tespit edilmiştir (Berkes ve Kışlalıoğlu, 1990).

İnsektisitlerin kullanıldığı çevredeki bal arıları da en fazla etkilenen canlılar arasındadır. Bal arıları bal, arı sütü ve balmumu gibi ürünleri oluşturmalarının yanı sıra bitkilerin tozlaşmasını da sağlamaktadırlar. İnsektisitlerin etkileriyle ölen arılar bu faydalı görevlerini yerine getiremezler. Bunun sonucunda da büyük verim düşüklüğü olmaktadır (Ecevit, 1988).

İnsektisitler kullanıldıkları alandaki bitkilerin çimlenmesi, vejetasyonu ve üremesi üzerinde de olumsuz etkiler yaparlar. Bazen bitkilerin belirli doku kısımlarında, özellikle yaprak ve sürgünlerinde yanma denilen bir takım lekeler ile renk değişmelerinin meydana gelmesine sebep olurlar. Hatta bazen tüm bitkilerin öldüğü görülür.

1.5.2. Biyolojik Mücadele

Biyolojik mücadele, zararlı böceklerin yapmış olduğu zararları en aza indirmek için bu böceklerin doğal düşmanlarını kullanma olarak tanımlanabilir. Doğal düşman terimi, parazitler ve predatörlerle birlikte hastalık oluşturan mikroorganizmaları da kapsamaktadır (Poinar, 1978; Peter, 1984).

Biyolojik mücadelede ilk kayıtlar, M. S. 900-1200 yılları arasında rapor edilmiştir (Liu, 1939). Geçmiş çok eskilere dayanan mücadele de ilk olarak amfibiler, kuşlar ve memeliler kullanılmıştır. Son yıllarda ise bu canlıların yerini özellikle nematodlar, bakteriler ve virüsler almıştır.

Zararlı böceklerle mücadele amacıyla kullanılan organizmalar büyük çeşitlilik gösterir. Bunlar; akarlar, amfibiler, bakteriler, balıklar, funguslar, kuşlar, memeliler, nematodlar, örümcekler, planarialar, protozoalar ve virüslerdir (Peter, 1984).

Kullanılan organizmalara örnek vermek gerekirse, nematodlardan günümüzde halen daha *Neoplectana carpocapsae* nematodu ile *Achromobacter nematophilus* bakterisinden hazırlanan preparat Biotrol adı altında ticari olarak üretilip *Chilo* sp., *Sesamia* sp. (Lepidoptera) ve *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) böceklerine karşı kullanılmaktadır (Çanakçıoğlu, 1971). Akarlardan özellikle *Phytoseiulus persimilis*, Avrupa ülkeleri, ABD ve Rusya'da seralarda kırmızı örümceklere karşı etkili sonuç vermektedir (Sweetman, 1973). Balıklardan *Gambusia affinis* sivrisinek larvalarına karşı, *Bufo marinus*'da şeker kamışı zararlısı *Strategus* sp.'ye karşı kullanılmaktadır. Kuşlardan özellikle sığırcık, leylek, saksağan, ağaçkakan ve isketeden yararlanılmaktadır. Memelilerden kirpi, yarasa, porsuk ve köstebek gibi hayvanlardan faydalanılmaktadır. Bakterilerden özellikle *Bacillus thuringiensis* ve *B. popilliae* kullanılmaktadır. *B. thuringiensis* daha çok zararlı lepidopter larvalarına karşı kullanılmakla birlikte, son yıllarda çeşitli suşlarının farklı böcek grupları üzerinde etkili oldukları bulunmuştur (Aliniazae, 1975; Sezen ve Demirbağ, 1999). Mantarlardan özellikle Boverin ticari adıyla üretilen *Beauveria bassiana*, Lepidopter ve Coleopterlere karşı etkilidir. Virüslerden ticari olarak hazırlanan preparatlar özellikle Lepidopter ve Hymenopterlere karşı uygulanmaktadır. Virüslerin son zamanlarda Coleopterlere de etkili oldukları bulunmuştur (Çanakçıoğlu, 1971; Peter, 1984).

Biyolojik mücadele konusundaki çalışmalar günümüzde büyük bir gelişme göstererek ilerlemektedir. Çalışmalar ağırlıklı olarak böceklerde hastalık yapan mikroorganizmaların izolasyonu ve biyolojik mücadelede kullanımına yönelmiştir.

Hastalık yapan mikroorganizmaların kullanımı, genellikle mikrobiyal mücadele olarak adlandırılmaktadır. Virüsler, bakteriler, protozoalar, mantarlar ve nematodlar mikrobiyal mücadele içindeki temel mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar içinde virüsler en etkili ve güvenli olarak kullanılabilen mikrobiyal ajanlardır.

1.6. Böcek Virüsleri

Birçok virüsün böceklerin hastalanmasına neden olarak böcek salgınlarını kontrol ettikleri bilinmektedir (Steinhaus, 1956). Virüsler birçok böcek takımıyla bağlantılı olmalarına rağmen, büyük bir kısmı Lepidoptera (%83), Hymenoptera (%10) ve Diptera (%4) takımlarında bulunmaktadır. Coleoptera takımından da giderek artan sayıda çeşitli virüsler izole edilmektedir (Tablo 2) (Martignoni ve Iwai, 1986).

Tablo 2. Coleoptera grubu böceklerden izole edilen virüsler

Böcek	Familya	Virüs
<i>Anthonomus grandis</i>	Curculionidae	Baculovirüs, Iridovirüs
<i>Anthrenus museorum</i>	Dermestidae	“
<i>Batocera lineolata</i>	Cerambycidae	“
<i>Dermestes lardarius</i>	Dermestidae	“
<i>Diabrotica undecimpunctata</i>	Chrysomelidae	“
<i>Oryctes rhinoceros</i>	Scarabaeidae	“
<i>Sternochetus mangiferae</i>	Curculionidae	“
<i>Tetropium cinnamopterum</i>	Cerambycidae	“
<i>Adoretus versutus</i>	Scarabaeidae	Entomopoxvirus
<i>Anomala cuprea</i>	“	“
<i>Anoplognathus porosus</i>	“	“
<i>Anoxia villosa</i>	“	“
<i>Antitrogus morbillosus</i>	“	“
<i>Aphodius tasmaniae</i>	“	“
<i>Dasygnathus sp.</i>	“	“
<i>Demodena boranensis</i>	“	“
<i>Dermolepida albohitum</i>	“	“
<i>Figulus sublaevis</i>	Lucanidae	“
<i>Geotrupes sylvaticus</i>	Scarabaeidae	“
<i>Geotrupes stercorosus</i>	“	“
<i>Hoplia sp.</i>	“	“
<i>Ips typographus</i>	Scolytidae	“
<i>Melolontha melolontha</i>	Scarabaeidae	“
<i>Othnonius batesi</i>	“	“
<i>Phyllopertha horticola</i>	“	“
<i>Phyllophaga pleei</i>	“	“
<i>Proagopertha lucidula</i>	“	“
<i>Rhopaea verrauxi</i>	“	“
<i>Allomyrina dichotomus</i>	“	Iridovirüs
<i>Chrysomela vigitipunctata</i>	Chrysomelidae	“
<i>Coccinella septempunctata</i>	Coccinellidae	“
<i>Curculio dentipes</i>	Curculionidae	“
<i>Heteronychus arator</i>	Scarabaeidae	“
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Chrysomelidae	“
<i>Macrodorcus rectus</i>	Lucanidae	“
<i>Macrodorcus rubrofemoratus</i>	“	“
<i>Odontria sp.</i>	Scarabaeidae	“
<i>Opogonia sp.</i>	“	“
<i>Popillia japonica</i>	“	“
<i>Sericesthis pruinosa</i>	“	“
<i>Stenodiyas clavigera</i>	Cerambycidae	“
<i>Tenebrio molitor</i>	Tenebrionidae	“
<i>Trachys avricollis</i>	Buprestidae	“
<i>Coelaenomenodera minuta</i>	Chrysomelidae	“
<i>Costelytra zealandica</i>	Scarabaeidae	“
<i>Cryptorhynchus mangiferae</i>	Curculionidae	“
<i>Gyrinus natator</i>	Gyrinidae	“
<i>Pericoptus truncatus</i>	Scarabaeidae	“
<i>Hypera postica</i>	Curculionidae	“
<i>Epilachna varivestis</i>	Coccinellidae	Reovirüs

Böcek virüsleri viral replikasyon alanları, nükleik asitlerinin ağırlığı, şekil, simetri, hastalık semptomları, kimyasallara duyarlılık ve seroloji gibi birçok kriterler göz önüne alınarak nüklear polihedrozis, granülozis, sitoplazmik polihedrozis, entomopox, iridescent ve densonükleozis virüsler olarak gruplandırılmışlardır. Virüslerin büyük bir kısmı *Baculoviridae*, *Reoviridae*, *Entomopoxviridae*, *Iridoviridae*, *Picornaviridae* ve *Parvoviridae* familyalarına aittir (Evans ve Shapiro, 1997; Miller ve Andrew Ball, 1998).

Entomopoxviridae: Entomopoxvirüs virionları oval şekilli 150-470 nm uzunluğunda ve 165-300 nm genişliğindedir. Virüsler büyük, doğrusal, çift zincir, yaklaşık 225 kilo bazlık bir genoma sahiptirler (Arif, 1995). Entomopoxvirüsler virüs morfolojisi, konak türü ve genom hacmi bakımından ayrılan üç cinsle temsil edilirler. Cins A Coleoptera grubu virüsleri, Cins B Lepidoptera ve Orthoptera grubu virüsleri, Cins C ise Diptera grubu virüsleri içermektedir. Tablo 3 entomopoxvirüs A, B ve C cinslerine ait izole edilen virüsleri göstermektedir (King vd., 1998).

Tablo 3. Entomopoxvirüslerin sınıflandırılması

Cins	Virüs
Entomopoxvirüs A ^a	<i>Melolontha melolontha</i> EPV ^b
	<i>Othnonius batsei</i> EPV
	<i>Ips typographus</i> EPV
	<i>Adoretus versutus</i> EPV
Entomopoxvirüs B	<i>Amsacta moorei</i> EPV ^{b,c}
	<i>Choristoneura biennis</i> EPV ^c
	<i>Locusta migratoria</i> EPV ^d
	<i>Melanoplus sanguinipes</i> EPV ^d
	<i>Pseudaletia separata</i> EPV ^c
	<i>Helicoverpa armigera</i> EPV ^c
	<i>Cataloipus fuscoeruleipes</i> EPV ^d
	<i>Arphia conspirsa</i> EPV ^d
	<i>Phoetaliotes nebrascensis</i> EPV ^d
	<i>Euxoa auxiliaris</i> EPV ^c
Entomopoxvirüs C ^c	<i>Chironomus luridis</i> EPV ^b
	<i>Chironomus attenuatus</i> EPV
	<i>Culex pipiens</i> EPV
	<i>Camtochiromonus tentans</i> EPV
	<i>Aedes aegypti</i> EPV

^a Coleopteran konak, ^b Cinsine ait tip üye, ^c Lepidopteran konak,
^d Orthopteran konak, ^e Dipteran konak

Entomopoxvirüs ile enfekte olmuş bir hücrede ilk göze çarpan yapı, sitoplazmada büyük oval şekilli, 5-20 µm boyunda "sferoid" adı verilen protein matriks içinde olgun virüslerin gömülü oluşudur. Ayrıca cins A ve bazı Lepidoptera grubu üyelerinde "spindil" olarak adlandırılan ikinci bir protein yapı gözlenmektedir. Spindiller 1-15 µm boyunda, enfekte olan hücrenin sitoplazmalarında serbest veya sferoidler içinde bulunabilirler (Arif, 1995). Entomopoxvirüsler konak böceğin yağ dokusu hücrelerinde, bazen de hemositlerde çoğalırlar (Lipa, 1975).

Baculoviridae: Nüklear polihedrozis virüsler (NPV) en iyi bilinen baculovirüsler olup, tanımlanmış böcek virüslerinin %41'ini teşkil etmektedirler (Ignoffo, 1974). Baculovirüsler, 25 x 250 nm büyüklükte olup 90-200 kilo baz çifti (kbp), yuvarlak-kapalı, çift zincir, süper sarmal DNA ihtiva ederler (Arif, 1986; Demirbağ ve Beldüz, 1997). Virüs DNA'sı hücre zarı benzeri ve karmaşık bir yapıya sahip olan bir zarf tarafından çevrili nükleokapsid içerisine paketlenmiştir (Fraser, 1987). Hücre içi virüsler, polihedra veya granula olarak isimlendirilen protein özellikli inklüzyon yapılar içerisine gömülürler (Bilimoria, 1991).

Baculoviridae familyası inklüzyon yapıların şekline göre iki cinse ayrılır. Nüklear polihedrozis virüs ve granulozis virüs. Nüklear polihedrozis virüsü, 1-18 nükleokapsidin bir zarf içerisine gömülmesiyle oluşur. Daha sonra bu zarfa sahip virüsler polihedrin (28 kDa) denilen tek bir proteinden oluşmuş polihedral inklüzyon yapılar (PIB) içerisine gömülürler. AcNPV'ye ait PIB'lerin büyüklükleri 0,5-15 µm arasındadır. Konak hücre çekirdeğinde çoğalan baculovirüslerin bir kısmı hücre zarından zarf kazanarak hücre dışı virüsleri, diğer bir kısmı ise çekirdek içerisinde zarf kazanarak hücre içi virüsleri oluştururlar. NPV orijinine bakmaksızın bütün böcek hücrelerini enfekte eder ve ölümlerine neden olur (Coppel ve Martins, 1977; Volkman vd., 1995).

Granulozis virüsler de zararlı böceklerin kontrolünde büyük bir öneme sahiptir. Konağın yağ dokusu, trakeal veya epidermal hücrelerinin sitoplazmasında yada çekirdeğinde gelişen bu virüsler 200 x 400 nm boyutlarında, oval şekilli, inklüzyon yapıları içinde genelde tek nadiren de çift olarak bulunurlar.

Reoviridae: Biyolojik mücadelede pratik kullanım açısından önemli üçüncü grup olarak kabul edilen sitoplazmik polihedrozis virüsler konak böcekte sadece orta bağırsak epitel hücrelerinin sitoplazmalarında gelişirler (Burges ve Hussey, 1971). Çift zincir RNA içeren 60 nm çapındaki küresel virionlar, 0,5-15 µm çapındaki polihedral inklüzyon yapıları içinde tek olarak bulunurlar (Cunningham, 1988).

Iridoviridae: Zarfsız iridescent virüsler (IV)'in ilk çoğalma alanları konak böceğin yağ dokusu hücrelerinin sitoplazmasıdır. Enfekte ettikleri konak böceğin kuru ağırlığının %25'ni teşkil edecek kadar çok çoğalabilirler (Smith ve Bosch, 1967). Canlı böcek içinde kendiliğinden kristalleşen virüsler karakteristik bir parlaklık oluştururlar. Ölü böcek iridescent (mavi-yeşil) renkte görünür. Bununla birlikte bazı virüsler turuncu-kahverengi renkleri de oluşturabilirler. En az 32 tip iridovirüs hacim ve serolojik ilişkilerine dayanılarak tanımlanmıştır (Van Regenmortel vd., 2000).

Picornaviridae: Tek zincir RNA virüslerinden olan bu grup 22-30 nm çapında küresel virüs partiküllerine sahiptir. Bu familyanın en iyi tanımlanmış üç üyesi cırcır böceği virüsü, drosophila C ve gonometta virüsüdür. En temel ayırt edici özellikleri aside karşı dayanıklılığı ile bütünleştirilmiş üç büyük ve iki küçük polipeptidlerin varlığıdır (Evans ve Shapiro, 1997).

Nodaviridae: Nodavirüs virionları yaklaşık 29 nm çapında olup tek zincir RNA içerirler. İki RNA segmentine sahiptirler. Nodavirüsler morfolojik olarak pikorna virüsleri andırırlar. Bu yüzden elektron mikroskobu ile ayrılmaları zordur (Evans ve Shapiro, 1997).

Ascoviridae: Zarfsız çift zincir DNA virüsleri olan bu grup enfekte edilmiş hücre çekirdeği bozulduğunda oluşturulan virion ile dolu vesiküllere dayanılarak isimlendirilmektedir. Virionlar kompleks bir yapı ile geniş bir hacime sahiptir (130 x 400 nm). Bunlar sadece Lepidoptera'nın Noctuidae familyasından izole edilmiştir. Patolojileri geniş olarak araştırılmamıştır (Evans ve Shapiro, 1997).

Parvoviridae: Bu familya 19-24 nm boyutlarındaki virionlar içine paketlenmiş tek zincir DNA virüslerinden oluşur. Tipik cinsi densovirüs olup densonukleozis virüs (DNV)'e genel ismini verir. Virion morfolojisine ve enfeksiyon semptomlarına dayanılarak bu familya Tip 1 (şiddetli enfeksiyon, bağırsak dışındaki tüm dokuların enfeksiyonu ile hızlı ölüm) ve Tip 2 (kronik enfeksiyon ve sadece bağırsağın enfeksiyonu ile nispeten yavaş ölüm) olmak üzere ikiye ayrılır (Evans ve Shapiro, 1997).

Birnaviridae: Bu familya Diptera'da *Drosophila melanogaster*'den izole edilmiş olan drosophila X virüsü ile simgelenir. Virionlar 7 x 62 nm ebatlarında olup ikosahedral şekillidir. Çift zincir RNA'ya sahip zarfsız virüslerdir (Evans ve Shapiro, 1997).

Caliciviridae: İlk olarak portakal kurdu *Amyelois transitella*'dan izole edilmiştir. Tek zincir RNA içerirler. Virionlar calicivirüslerin tipik özelliği olan karakteristik küp'e

benzer bir morfolojiye sahiptir. Partiküller 28 nm çapındadır. Biyolojisi hakkında çok az şey bilinmektedir (Evans ve Shapiro, 1997).

Polydnviridae: Bu familyanın üyeleri parazitik Hymenoptera'nın vücut sıvısında geniş oranda çoğalırlar. Familyanın temel özelliği ismine de yansıdığı gibi, polydispersed süper helikal çift zincir DNA varlığıdır. Oval virüs partiküller 150 x 350 nm büyüklüğündedir (Evans ve Shapiro, 1997).

Rhabdoviridae: Tek zincir RNA virüsü olan bu familyanın en iyi çalışılmış üyesi *Drosophila sigma* virüsüdür. Bu virüs çubuk şekilli 75 x 200 nm ebatlarında virüs partiküllerine sahiptir (Evans ve Shapiro, 1997).

Tetraviridae: Tetraviridae familyası 35-38 nm çaplarındaki tek zincir RNA içeren ikosahedral virionlara sahiptir. En iyi tanımlanmış olanı *Nudaurelia* β virüsüdür. Bu virüs *Nudaurelia cytherea capensis* (Lepidoptera, Saturniidae)'den izole edilmiştir (Evans ve Shapiro, 1997).

Diğer Zarfsız Virüsler: Diğer tek zincir familyaları Togaviridae (60-65 nm çapında virionlara sahip), Flaviviridae (35-45 nm çapında) ve Bunyaviridae (90-100 nm çapında)'dır (Evans ve Shapiro, 1997).

1.7. Mikrobiyal Mücadelede Virüslerin Kullanımı

En az 13 farklı böcek takımından izole edilmiş 1000 türden daha fazla sayıda böcek virüsü vardır (Martignoni ve Iwai, 1986). Virüs hastalıkları hakkındaki ilk bilgiler 1889 yılında Avrupa'da *Lymantria monacha* L. (Lepidoptera: Lymantriidae) Wipfel hastalığının bulunması üzerine yapılan çalışmalarla başlamıştır. Daha sonra 1907'de, aynı tip bir hastalık Amerika Birleşik Devletleri'nin New England eyaletinde *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae) popülasyonu üzerinde tespit edilmiştir. Ölen larvaların solgun bir görünümde olması nedeniyle buna "solgun hastalığı" adı verilmiştir.

Daha çok Lepidoptera ve Hymenoptera grupları üzerinde etkili olan virüslerin Coleoptera grubu üzerinde de etkili olduğu bulunmuştur. Bunlardan Baculoviridae familyası üyeleri sadece böceklerde enfeksiyon oluşturmalarından dolayı, omurgalılar ve diğer gruplarda enfeksiyon oluşturanlara oranla daha avantajlıdır (Lipa, 1975). İlk kayıtlı viral insektisit *Helicoverpa (Heliothis) zea* nukleokapsid polihedrosiz virüsüdür (HzSNPV) (Ignoffo, 1973). AcMnPV gibi nukleopolihedrosiz virüsler genetik olarak değiştirilerek yaklaşık öldürme hızları %20-40 oranında arttırılmıştır (Hammock vd., 1993). Bazı böcek

virüsleri bitkiler ve orman zararlılarına karşı mücadelede kullanılmaktadır. Tablo 4'de kullanılan çeşitli virüs preparatları ve konakları yer almaktadır (Weeden vd., 2003). Üretilen tüm virüslerin teşhisi, aktivitesi, memelilere karşı zehir etkisi ve patojenitesi araştırılmaktadır.

Tablo 4. Yaygın olarak kullanılan virüs preparatları ve etkili olduğu konaklar

Ticari adı	Kullanılan virüsler	Hedef zararlılar	Zarar gören ürünler
Cyd-X	<i>Cydia pomonella</i> granülozis virüs	<i>Cydia pomonella</i>	Elma, armut, ceviz ve erik
Mamestrin	<i>Mamestra brassicae</i> nuklear polyhedrozis virüs	<i>Heliothis armigera</i> , <i>Mamestra brassicae</i> , <i>Plutella xylostella</i> , <i>Phthorimaea operculella</i>	Lahana, domates ve pamuk
Spodopterin	<i>Spodoptera littoralis</i> nuklear polyhedrozis virüs	<i>Spodoptera littoralis</i>	Pamuk, mısır ve domates
Gemstar LC, Biotrol, Elcar	<i>Helicoverpa zea</i> nuklear polyhedrozis virüs	<i>Helicoverpa zea</i> , <i>Heliothis virescens</i>	Pamuk ve sebzeler
Spod-X	<i>Spodoptera exigua</i> nuklear polyhedrozis virüs	<i>Spodoptera exigua</i>	Sebzeler ve pamuk
Gusano Biological Pesticide	<i>Autographa californica</i> nuklear polyhedrozis virüs	<i>Autographa californica</i>	Yonca ve diğer tahıllar
TM Biocontrol	<i>Orgyia psuedotsugata</i> nuklear polyhedrozis virüs	<i>Orgyia psuedotsugata</i>	Orman habitati ve kereste
Gypchek	<i>Lymantria dispar</i> nuklear polyhedrozis virüs	<i>Lymantria dispar</i>	Orman habitati, kereste ve çeşitli meyveler

Virüslerin zararlı böceklerle mücadelede kullanılması, Amerika Birleşik Devletleri'nde 1976 yılına kadar denemeler şeklinde olmuştur. Sonra Çevre Koruma Dairesi *Orgyia pseudotsugata* (McDunn) (Lepidoptera, Lymantriidae) larvalarına karşı baculovirus cinsinin bir nukleopolihedrovirüs (NPV)'ünü kullanma iznini aldı. Böylece bu virüs hakkındaki uygulama yöntemleri, çevre ve insan sağlığının korunması, kalıntı miktarı gibi hususlar üzerinde yoğun çalışmalar başlamıştır. Entomopoxvirüslere ait ilk coleopter virüsü, *Melanoplus sanguinipes* EPV, MsEPV, için 1988 yılında alan çalışmaları yapılabilmesi amacıyla deneysel kullanım izni alınmıştır. 1988-1990 yılları arasında insan ve çeşitli hayvanlar üzerinde yapılan enfekte çalışmalarında herhangi bir enfeksiyona rastlanılmadı. MsEPV, alan uygulamalarında nişasta granülleri içinde uygulandı (McGuire vd., 1991).

Günümüzde yaklaşık 500 böcek türünden 450'den fazla virüs tanımlanarak sınıflandırılmıştır. Virüsler birçok böcek takımlarıyla bağlantılıdır. Bununla birlikte büyük bir kısmı Lepidoptera (%83), Hymenoptera (%10) ve Diptera (%4) takımlarında bulunmaktadır (Ignoffo, 1974).

Böcek virüsleri çoğalma alanları, nükleik asitlerinin ağırlığı, şekil, simetri, hastalık belirtileri, kimyasallara duyarlılık ve seroloji gibi birçok kriterler göz önüne alınarak altı grupta toplanmıştır. Bunlar nukleopolihedrozis, granülozis, sitoplazmik polihedrozis, entomopox ve iridescent virüsleridir. Tüm böcek virüsü familyaları ve kaydedildiği konaklar Tablo 5'de gösterilmektedir (Evans ve Shapiro, 1997).

Tablo 5. En yaygın böcek virüsü familyaları ve kaydedildiği konakları

Virüs familyası	Kaydedildiği konak takımları	Genel konak safhası
Baculoviridae: NPV ve GV	Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Neuroptera, Siphonaptera, Thysanura, Trchoptera	Larva, bazen pupa ve ergin
Reoviridae: CPV	Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera	Larva, pupa ve ergin
Entomopoxviridae: EPV	Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, Orthoptera	Larva, pupa ve ergin
Iridoviridae: IV	Hemen hemen tüm böcek ordoları	Larva

1.8. Böcek Virüslerinin Zirai Mücadelede Kullanım Avantajları

Virüsler, etkili, güvenli ve seçici biyolojik mücadele ajanlarıdır. Kimyasal insektisitlerin aksine faydalı organizmalara ve çevreye zarar vermezler. Parazit ve predatörler virüsleri farklı bölgelere taşıyarak enfeksiyonun farklı populasyonlara ulaşmasını sağlarlar. Farklı bölgelerdeki böcek larvaları virüslere karşı aynı hassasiyete sahiptirler. Düşük dozla enfekte olmuş dişi böcekler virüsleri yumurtalar vasıtasıyla gelecek generasyona taşırlar. Genel olarak virüsler bağırsakta çoğaldığı için viral enfeksiyon, toplu haldeki larval populasyon içinde hızlıca yayılabilir. Ayrıca; ağaçların üst dallarında enfekte olmuş larva ölümlerinin parçalanmasıyla dağılan virüsler, alt dallardaki diğer kolonileri kolaylıkla enfekte edebilmektedirler. Virüs uygulaması, larvaların yapacağı zararın önlenmesi ve pupa safhasından önce ikincil enfeksiyonun gelişimi ve virüsün populasyon içinde dağılmasında gerekli zamanın sağlanması için larvalar yumurtadan çıkar çıkmaz yapılmalıdır. Uygun zamanda uygulanan virüs süspansiyonu ekonomik kaybı en aza indirir.

1.9. Böceklerde Virüslerin Araştırılması

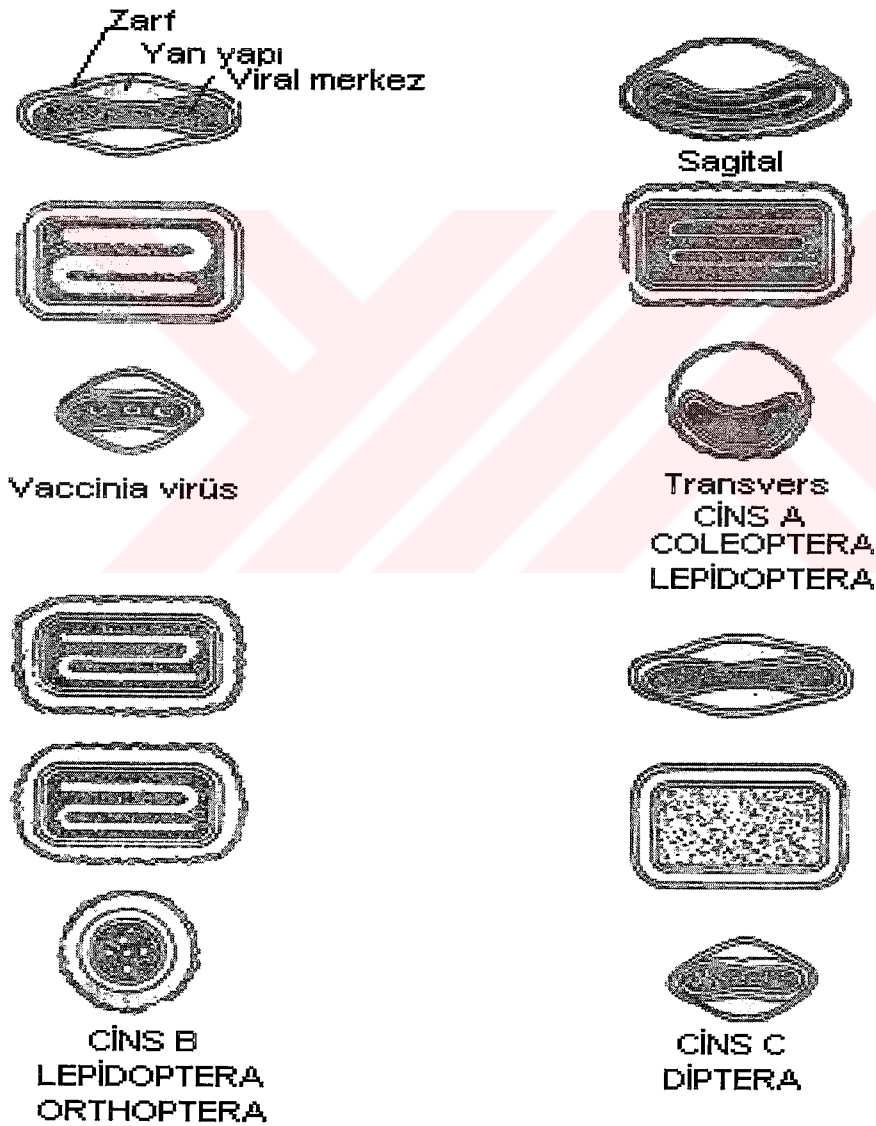
Böceklerde patojen virüslerin varlığı öncelikle makroskobik incelemelerle belirlenir. Bu inceleme sonucunda durumundan şüphelenilen numunelerden doku preparatları hazırlanarak mikroskobik incelemeler yapılır (Keddie ve Erlandson, 1995; Evans ve Shapiro, 1997). Mikroskobik olarak tespit edilen virüs, DNA-DNA hibridizasyon yöntemi kullanılarak moleküler olarak da tespit edilebilir (Ward vd., 1987; Christian, 1992).

1.10. Entomopoxvirüslerin Sınıflandırılması, Yapısı ve Biyolojisi

Entomopoxvirüsler (EPVs) ilk olarak Vago (1963) tarafından böcek virüslerinin yeni bir grubu olarak keşfedilmelerinden sonra, çok sayıda EPV izolatu dört böcek takımından (Coleoptera, Diptera, Lepidoptera ve Orthoptera) izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Arif ve Kurstak, 1991). Poxviridae familyası böcek poxvirüslerini içeren Entomopoxvirinae ve omurgalı poxvirüslerini içeren Chordopoxvirinae olmak üzere 2 alt familyaya sahiptir. Entomopoxvirinae virüs morfolojisi, konak türü ve genom hacmi

bakımından 3 cins ayrılır. Cins A Coleoptera grubu virüsleri, cins B Lepidoptera ve Orthoptera grubu virüsleri ve cins C ise Diptera grubu virüslerini içermektedir.

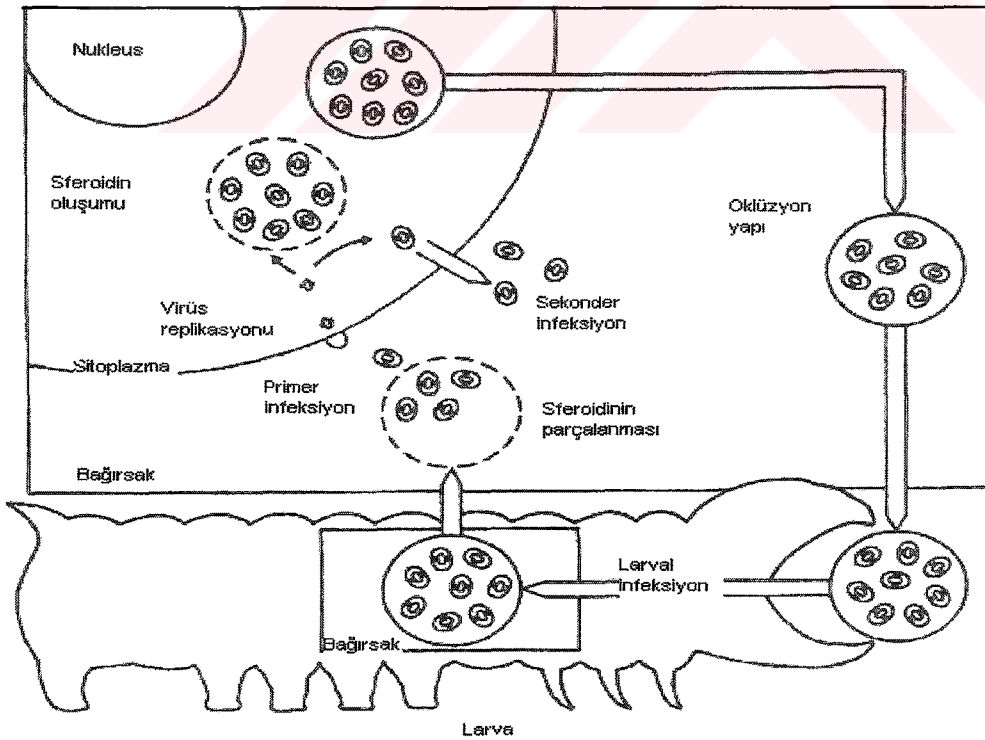
Entomopoxvirüs virionları morfolojik olarak omurgalı poxvirüslerine benzerlik gösterir. Virionlar oval şekilli, 150-470 nm uzunluğunda ve 165-300 nm genişliğindedir. DNA genomu virionun merkezinde bulunur. A cinsi virüsler unilateral konkav bir merkez şekline, B cinsi iki lateral yapı ile çevrili silindirik bir merkez şekline ve C cinsi ise bikonkav bir merkez şekline sahiptir. Şekil 1 entomopoxvirüs A, B ve C cinslerine ait virüs şekillerini göstermektedir.



Şekil 1. Vaccinia virüs ve entomopoxvirüs gruplarına ait virüs şekilleri (Arif ve Kurtsak, 1991).

Virüs ile enfekte olmuş bir hücrenin sahip olduğu en önemli özellik, sferoidleri meydana getiren bir protein yapı içine olgun virionların gömülü oluşudur. Ağız yolu ile enfekte olan bir larvanın yüksek pH değerine sahip bağırsağında, sferoidin proteini parçalanarak virionlar açığa çıkarlar. Açığa çıkan virionlar, bağırsak hücrelerinin membranlarından geçerek sitoplazmada primer infeksiyonu meydana getirirler. Sitoplazmadaki virüs replikasyonunu takiben bir kısım virion, sferoid içine gömülmeden membrandan tekrar dışarı çıkarak diğer dokularda enfeksiyon oluştururlar. Diğerleri ise sitoplazmada sferoidin proteininden meydana gelen sferoid içine gömülürler (Şekil 2) (Evans ve Shapiro, 1997). EPV virionlarının protein yapısı SDS-PAGE ile aydınlatılmış ve bir virionun 12-250 kDa arasında değişen ağırlıklarda yaklaşık 40 yapısal proteine sahip olduğu belirlenmiştir.

Sferoidler: EPV'lerin en önemli karakteristik yapısı enfekte olmuş hücrelerin sitoplazmalarında büyük oval şekilli sferoidlerin oluşumudur. Bu yapılar 5-20 µm boyunda ve orijinal olarak "sferule" olarak adlandırılır. Ultra yapısal çalışmalar sferoidlerin parakristal bir ağ içine gömülü virüsleri içeren elektronca yoğun yapılar olduğunu göstermiştir.



Şekil 2. Entomopoxvirüsün böcek larvasındaki replikasyonunun şematik görünümü

Sferoidin Geni (sph): Sferoidin oklüzyon yapılarının veya sferoidlerin asıl proteini olan sferoidin proteinini kodlar. Protein yaklaşık 100-115 kDa'luk bir moleküler ağırlığa sahiptir. İlk sferoidin geni *Amsacta mooeri* EPV'den belirlenmiş, klonlanmış ve dizin analizi yapılmıştır (Hall ve Moyer, 1991). *Melolontha melolontha* EPV (MmEPV) sferoidin (*sph*) geninin de dizin analizi yapılmış ve klonlanmıştır (Sanz vd., 1994). Sferoidini kodlayan bölge diğer kısımlardan daha yoğun bir G+C oranına sahiptir (%29). Baculovirüslerdeki polihedrin geni gibi EPV sferoidin geni de yüksek oranda korunmuş bir bölgedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla, *sph* geni üzerine yapılan delesyon çalışmaları ile bu genin virüsün in vitro replikasyonunda herhangi bir etkiye sahip olmadığını göstermiştir.

Spindillar: Cins A ve bazı Lepidoptera grubu EPV'ler ile enfekte olmuş hücrelerin sitoplazmalarında ikinci bir protein yapı olarak bulunurlar. Fakat bu yapılar şu ana kadar hiçbir Orthoptera veya Diptera konakta gözlenmemiştir. Spindillar 1-15 µm boyunda, enfekte olmuş hücrelerin sitoplazmalarında veya bir sferoid içinde virüs partikülleriyle beraber görülebilirler. Bu yapılar sferoidlerden çok farklıdır. Spindillar bilateral simetriye sahiptirler, bu özellik onları kolayca sferoidlerden ayırmayı sağlar. Sferoidlerden diğer bir önemli farkı ise spindilların virionlara sahip olmamasıdır. Spindilların büyük polipeptid bileşeni fusolin proteinidir.

Fusolin Geni (fus): Coleoptera ve bazı Lepidoptera böceklerini enfekte eden çoğu EPV'ler spindil şekilli bir protein sentezlerler. İlk fusolin geni (*fus*) *Amsacta mooeri* EPV'den belirlenmiş, klonlanmış ve sekans edilmiştir (Hall ve Moyer, 1993). Daha sonra *Heliothis armigera* EPV ve MmEPV'den de karakterize edilmiştir. Olgun bir protein poliakriamid jelde yaklaşık 50 kDa'luk bir ağırlık gösterir. *fus* geni baculovirüs glikoprotein 37 (*gp37*) ile %41-42'lik bir sıra homolojisine sahiptir.

1.11. Entomopoxvirüslerin Biyoteknolojik Önemi

EPV'lerin mikrobiyal mücadele ajanı olarak geliştirilmesi hem çok sayıdaki böcek takımından izole edilmelerinden hem de baculovirüslerin kullanımını tamamlaması açısından çok büyük bir potansiyele sahiptir. Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera ve Diptera gibi dünyanın en önemli tarımsal zararlılarını içeren bu takımlardan izole edilmeleri, son yıllarda artan *in vitro* ve *in vivo* çalışmaları ve moleküler biyolojileri üzerine devam eden çalışmalar bu virüsleri çok önemli kılmaktadır. Çekirgeler, ağustos böcekleri ve sivrisinekler gibi en önemli zararlıların mikrobiyal kontrolü bu ordolardan yeni EPV'lerin izole edilip tanımlanmasına bağlıdır (King vd., 1998).

Entomopoxvirüsler son yıllarda Orthoptera grubu böceklerden olan çekirgelerden de izole edilmişlerdir. Bugüne kadar baculovirüslerin izole edilmediği bu grup böcekler için entomopoxvirüslerin gelecekte potansiyel bir kontrol ajanı olabileceği düşünülmektedir. Özellikle bir tür çekirge *Locusta migratoria*'dan izole edilen entomopoxvirüs çok önemlidir, çünkü bu çekirge Afrika ve Asya'da çok büyük ekonomik zarara sebep olmaktadır. Virüsle enfekte olmuş böcekler, larval büyümede ve gelişme oranında önemli seviyede bir azalma gösterirler. Birçok sivrisinek türü de EPV enfeksiyonuna karşı oldukça duyarlıdır. Henry ve Jutila (1966) tarafından izole edilen *Melanoplus sanguinipes* EPV'nin aynı cinse dahil bir çok türü enfekte ettiği bulunmuştur (Oma ve Henry, 1986). Özellikle son yıllarda birçok izolat çeşitli zararlılar için potansiyel biyolojik mücadele ajanı olarak önerilmektedir. Örneğin; kabuk böceği (*Ips typographus*) (Wegensteiner ve Weiser, 1995), bir tür çekirge (*Melanoplus sanguinipes*) (Levin vd., 1993) ve kakao zararlısı (*Adoretus versutus*)'dır (Beaudoin vd., 1994b).

Özellikle son yıllarda entomopoxvirüsler biyoteknolojik çalışmalarda ekspresyon vektör sistemi olarak kullanılmaya da başlandı. Bu çalışmalarda interlökinler, sitokinler, büyüme faktörleri, interferonlar, enzimler ve yapısal proteinleri kodlayan genler büyük DNA fragmentlerini yapısına alabilen poxvirüs vektörlerine klonlanıp ekspresyonu yapılabilmektedir. Bir çalışmada kanser gen tedavisinde kullanılan interlökin-2 geni (IL-2) vaccinia virüs ekspresyon vektörüne klonlanıp (pMJ601) büyük miktarda ekspresyonu sağlanmıştır (Hengjun vd., 2001).

1.12. Tezin Amacı

Bu doktora çalışmasında Coleoptera takımına ait olan ve önemli fındık zararlıları olarak kabul edilen kızılağaç yaprak böceği, *Agelastica alni* (L.), gün dönümü böceği, *Amphimallon solstitiale* (L.), fındık yaprak deleni, *Anoplus roboris* (Suf.), fındık kurdu, *Balaninus nucum* (L.) ve adi mayıs böceği, *Melolontha melolontha* (L.) ile mücadelede kimyasalların kullanımını azaltacak, ekonomik, çevreye daha duyarlı ve daha etkili viral kontrol ajanlarını geliştirmek amacıyla bu zararlılarda doğal olarak hastalık oluşturan virüslerin tespiti, izolasyonu, mikroskopik metotlar ve moleküler teknikler ile tanımlanması ve tanımlanan viral patojenlerin biyolojik mücadele ajanı olarak geliştirilmesi amaçlanmıştır.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

Çalışılan en önemli materyaller, viral enfeksiyonların araştırılacağı Coleoptera üyesi fındık zararlısı böceklerdir. Bu nedenle her böceğin salgın yaptığı dönemlerde toplanıp kısa sürede laboratuara getirilmesine büyük özen gösterildi. Toplanan böceklerde herhangi bir virüs varlığı önce makroskobik sonra ışık ve elektron mikroskobu kullanarak mikroskobik olarak araştırıldı. Tespit edilen virüsün morfolojik, biyokimyasal ve moleküler özellikleri belirlendi. Ayrıca virüsün izole edildiği böcek ve çalışılan diğer fındık zararlısı böcekler üzerindeki enfeksiyon özellikleri araştırıldı.

2.1. Böceklerin Toplanması

Arazi çalışmaları sırasında, bulunan ve enfeksiyonlu olduğundan şüphelenilen larvalar tek tek steril pensler ile tüplere aktarıldı. İstenmeyen kontaminasyonu önlemek amacıyla steril malzemeler kullanıldı. Larvaların toplanması süresince konak, toplanan bölge ve toplama tarihinin yazılmasına dikkat edildi. Toplama işlemi bittiğinde numuneler zaman kaybetmeden laboratuara getirildi.

Agelastica alni Larvalarının Toplanması: Larvalar Trabzon ve çevresindeki fındık bahçeleri ve kızıl ağaçların mevcut olduğu alanlardan 2000 yılından başlamak üzere takip eden sezonlarda toplandı. Çalışmalar sırasında larvaların yanı sıra toplanan yumurtalar da laboratuara getirilerek laboratuvar şartlarında inkübe edildi ve yumurtalardan çıkan çok sayıda larva da ayrıca kullanıldı. Toplam olarak 1633 larva toplandı.

Amphimallon solstitiale Larvalarının Toplanması: *A. solstitiale* larvaları 2001-2002 yılları bahar ayları boyunca Trabzon ve çevresindeki fındık bahçelerinden toplandı. Araştırma süresince toplam 381 larva incelendi.

Anoplus roboris Erginlerinin Toplanması: Erginlerinin toplama işlemi 2001-2002 bahar ayları içinde yapıldı. Toplama süresince 127 ergin böcek toplandı. Bu zararlıda larvalar gözle çok zor fark edilecek kadar küçük olduklarından toplanmadı.

Balaninus nucum Larvalarının Toplanması: Bu zararlının larvaları, 2001 Haziran ayıyla birlikte Trabzon ve çevresindeki fındık bahçelerinden ve harmanlardan fındık tanelerinin kırılması sonucu iki sezonda toplam 691 adet larva toplandı.

Melolontha melolontha Larvalarının Toplanması: Bu canlı, biyolojisi gereği 3 yılı toprak altında geçirdiği için; larva toplama işleminde özellikle yoğun zarar yaptığı Mart ayında başlanıldı ve bu işleme Haziran ayına kadar devam edildi. Bu sürenin dışında da özellikle kış aylarında toprak kazılarak uyusuk haldeki larvalardan da toplandı. Çalışma süresi boyunca 1260 larva toplandı.

2.2. Böceklerin Makroskopik İncelenmesi

Sağlıklı böceklere ait biyolojik evre, biyolojik evrenin süresi, vücut hacmi, davranış, görünüm gibi kriterler makroskopik incelemede hastalık tipinin belirlenmesinde büyük kolaylıklar sağlarlar. Bundan dolayı Tablo 6'da özetlenen kriterler sağlıklı ve hastalıklı böceklerde karşılaştırılarak temelde hangi tip hastalık olduğu tanımlanmaya çalışıldı (Evans ve Shapiro, 1997).

Tablo 6. Böcek virüslerinin makroskopik araştırılması için kontrol listesi

Kriter	Kayıt	Dikkat edilecek temel noktalar
Örneğin biyolojik evresi	Larval evre ideal biyolojik evredir.	Bir çok enfeksiyon larval safhada gerçekleşir. Fakat pupa, ergin ve nadir olarak yumurta safhası da dikkate alınmalıdır.
Hacim	Vücut uzunluğu, ağırlığı ve baş kapsül genişliğine dikkat edilir.	Bu, eşit ölçülere sahip sağlıklı bireye oranla anormallikleri belirler.
Biyolojik evrelerin süresi	Normal gelişimle kıyaslı olarak biyolojik evrelerin sürelerine dikkat edilir.	Bazı virüs grupları, özellikle CPV'ler ve EPV'ler uzun gelişim süresine teşvik ederler.
Davranış	Genel hareket, beslenme aktivitesine dikkat edilir.	Normal sağlıklı bireyin davranışı hakkında iyi bir bilgi varsa, geçerli bir özellik olabilir.
Görünüm	Vücut rengine veya herhangi bir organına özellikle bağırsak, yağ dokusuna dikkat edilir.	Konak canlılardaki virüslerin kütle halindeki gelişimi, deri rengini değiştirmeden önce iç organlarda genel renklerin değişimine neden olur.

2.3. Hastalıklı ve Ölü Böceklerin Ayrılması

Larvalar ve erginler toplandığı konak bitki, yer ve tarih yazılarak laboratuara getirildi. Arazide yapılan toplama işleminde steril pensler ve özel tüpler kullanıldı ve laboratuvar ortamında yaşayabilecekleri doğal ortamlar hazırlandı (Burges ve Hussey, 1971). Ölü yada hastalık varlığından şüphelenilenler makroskobik olarak ayrıldıktan sonra mikroskobik incelemeleri yapıldı. Parafin dolu bir kap içinde ölü yada hastalık varlığından şüphelenilen larvaların kesim işlemleri yapılarak; hemolenf, malpigi tüpçükleri, yağ dokusu, bağırsak gibi organlar mikroskop altında incelenerek virüs enfeksiyonu olup olmadığı araştırıldı (Lipa, 1975).

2.4. Böceklerde Virüslerin Araştırılması

Böceklerde patojen virüslerin varlığı çeşitli yöntemlerle tespit edildi. Bu yöntemler, mikroskobik yöntemler (ışık ve elektron mikroskobu) (Keddie ve Erlandson, 1995; Evans ve Shapiro, 1997) ve DNA-DNA hibridizasyon yöntemidir (Christian, 1992; Ward vd., 1987).

2.4.1. Işık Mikroskobu ile Virüs Varlığının Tespiti

Herhangi bir virüs enfeksiyonu olabileceğinden şüphelenilen larvaların dokularından yayma preparatlar hazırlanarak virüslerin oluşturmuş olduğu inklüzyon yapılarının varlığı araştırıldı. Inklüzyon yapılarının varlığının güvenilir bir teşhisini yapmak için hücre sitoplazması veya çekirdeğini araştırmak gerekir. Bunun için en iyi metot trake sıvısının, hemositlerin, yağ dokusunun ve bağırsağın faz-kontrast mikroskobunda incelenmesi metodudur (Deacon, 1983). Enfekte edilmiş çekirdekler önemli bir şekilde genişler ve yağ dokusundaki hücre bölünmesi artar (Lipa, 1975).

Işık mikroskobu için mevcut olan bir çok boyama yöntemi arasından başlıca iki metot, virüs teşhisinde özellikle de inklüzyon yapıları oluşturan virüslerin teşhisinde yaygın olarak kullanıldı. Buffalo Black 12B ve Giemsa boyama metotları kompleks yöntemlerin kullanılmasına gerek kalmadan kolaylıkla uygulanabilen yöntemlerdir (Evans ve Shapiro, 1997).

2.4.1.1. Giemsa ile Sferoidlerin Boyanması

Giemsa boyası (J. T. Baker, Kat. No: 3856), nüklear ve sitoplazmik hücresel ayrıntıları net olarak ayırabilen bir boyadır. Bu yüzden değişik virüs gruplarının replikasyon alanlarının teşhisinde yardımcı olur. Açık havada kurutulmuş preparat metanol içinde 2 dk bekletilerek fikse edildi. Akan musluk suyunda 10 sn çalkalandı ve 0,02 M fosfat tamponu (pH 6,9) içindeki %10'luk Giemsa boyasında 45 dk boyandı. Tekrar 10 sn musluk suyu ile çalkalandı. Preparatın çok kırmızı görüldüğü durumlarda 0,02 M tampon içine daldırarak kırmızı renk kayboluncaya kadar bekletildi. Daha sonra tekrar musluk suyunda çalkalandıktan sonra preparat açık havada kurutuldu ve immersiyon yağı kullanılarak mikroskop (Olympus BH-2) altında incelendi (Evans ve Shapiro, 1997).

2.4.1.2. Buffalo Black 12B ile Sferoidlerin Boyanması

Hazırlanan preparat açık havada kurutuldu. Buffalo Black (Merck, Kat. No: 44291.2X) solüsyonu 40-45 °C'ye kadar bir ısıtıcı üzerinde boya kabında ısıtıldı. Preparat, buffalo black solüsyonu içine daldırarak 5 dk bekletildikten sonra 10 sn musluk suyu altında yıkandı. Kurutulduktan sonra inklüzyon yapılarını belirlemek için immersiyon yağı kullanılarak mikroskop (Olympus BH-2) altında incelendi (Evans ve Shapiro, 1997).

2.4.2. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile Virüs Varlığının Tespiti

Entomopoxviridae familyası üyelerinde farklı sayıdaki virionlar, sferoid adı verilen ve sferoidin proteininden meydana gelmiş bir yapı içine gömülürler. Ayrıca Coleoptera takımı üyelerinin tümünde ve bazı Lepidoptera takımı üyelerinde ikinci bir protein yapı olan spindil da bulunur. Sferoid, spindil ve sferoid içine gömülü olan virionların morfolojik özelliklerini tespit etmek amacıyla TEM mikroskobu çalışmaları yapıldı. Bu amaçla enfekte olmuş larval doku %4'lük glutaraldehitte, 5 saat oda sıcaklığında fikse edildi. Kakodilat tamponu ile yıkandıktan sonra, %1'lik OsO₄'de 2 saat ikinci bir fiksasyona tabii tutuldu. %30'dan başlayan etanol serilerinden geçirilerek dehidrasyon yapıldı. Dehidrasyondan sonra numune epoxy resine gömülerek kesitler alındı ve bu kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandı (Keddie ve Erlandson, 1995; Radek ve Fabel, 2000). Kesitler Philips JM 208 marka elektron mikroskobunda incelendi.

2.4.3. DNA-DNA Hibridizasyon Yöntemi ile Virüs Varlığının Tespiti

Mikroskopik olarak tespit edilen virüs moleküler olarak da DNA-DNA hibridizasyon yöntemiyle tespit edildi (Ward vd., 1987; Christian, 1992).

2.4.3.1. MmEPV Sferoid İzolasyonu ve Saflaştırılması

Küçük larval dokular 0,1 M Tris pH 7 ve %0,01 SDS içinde iyice homojenize edildi. Homojenat dondurulup ve tekrar çözüldükten sonra cam pamuğundan geçirilerek kaba filtrasyon yapıldı. Sferoidler 1,000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Pellet steril suda çözüldü. Süspansiyon %45-60'lık sukroz gradientinde 25,000 rpm'de 30 dk santrifüj yapıldı (Beckman Optima LE-80K Ultrasantrifüj SW). Sferoid bandı alınıp su ile seyreltikten sonra santrifüj edildi ve oluşan pellet yeniden steril suda süspansiyon edildi (Hernandez-Crespo vd., 2000).

2.4.3.2. MmEPV DNA'sının İzolasyonu

Saf sferoidler 0,2 M sodyum thioglikolat ve 0,2 M sodyum karbonat, pH 10,9 tamponunda çözüldüler (yaklaşık 30 dk). Eşit hacimde 1 M Tris pH 7 ilave edildi. Virüs süspansiyonu proteinaz K (500 µg/ml) ve %2 sarkosil ile 45 °C'de gece boyu muamele edildi. Sonra, sırasıyla NaCl ve CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) ilave edildikten sonra (son konsantrasyonları 0,5 M ve %0,015) 60 °C'de 1 saat inkübe edildi. Viral DNA iki kez fenol, bir kez fenol:kloroform, bir kez kloroform ile ekstrakte edildi. Son süpernatant alındı ve 0,3 M sodyum asetat pH 5,2 ve iki hacim etanol (soğuk, %96) ilave edildikten sonra, -20 °C gece boyu inkübe edildi. Sonra 13,000 rpm'de 15 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant döküldü ve pellete 500 µl %96 soğuk etanol ilave edildi ve 13,000 rpm'de 3 dk santrifüjden sonra süpernatant tekrar döküldü. Pellete 500 µl %70'lik soğuk etanol ilave edildi ve 13,000 rpm'de 3 dk santrifüjden sonra pellet kurutulup yaklaşık 100 µl TE tamponunda çözüldü (Hernandez-Crespo vd., 2000).

2.4.3.3. Virüs İçin zel DNA Probu Hazırlanması

Choristoneura fumiferana (Clemens) (Lepidoptera: Tortricidae) EPV (CfEPV) *fus* genini içeren plazmid (bluescript *fus*#5) hücrelerden (*Escherichia coli* Dh5 α) DNA İzolasyon Kit'i kullanılarak izole edildi (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega, Kat. No: A 1330). Plazmid *EcoRI* ile kesildikten sonra, istenilen fragment jelden kesilip çıkarıldı. Daha sonra fragmenti içeren jel parçası cam pamuğundan 13,000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek DNA'nın serbest kalması sağlandı.

İşaretleme için, 1 μ g CfEPV *fus* geni 10 dk kaynayan su içinde bekletildi. Hemen buz üzerine alınıp karıştırıldıktan sonra 4 μ l Dig-High Prime (Vial 1)'den ilave edilip santrifüjlendi. 37°C'de 16 saat işaretlenmesinden sonra 65°C'de 10 dk bekletilerek reaksiyon durduruldu. Kullanılncaya kadar -20'de muhafaza edildi (Demirbağ, 1993).

2.4.3.4. Slot-Blot Hibridizasyonu

MmEPV'ye ait DNA'dan 10 μ g nitrosetuloz membrana emdirildi. Pozitif kontrol olarak CfEPV DNA'sı, negatif kontrol olarak da enfekte olmamış, sağlıklı böcek homojenatından membrana uygulandı. Oda sıcaklığında 30 dk kurutulduktan sonra, numuneler 2 saatliğine 80°C'ye ayarlanmış etüvde bekletilerek membrana bağlandı.

Prehibridizasyon ncesi, hibridizasyon tamponu kaynayan su banyosunda 10 dk bekletildi ve ardından hemen buz üzerine alındı. Tampon buz üzerinde biraz soğutulduktan sonra (42°C gibi) membranın üzerine döküldü ve 42°C'ye ayarlanmış hibridizasyon fırınında sabaha kadar bekletildi. Ertesi sabah yeni bir tampon alındı ve 5 ml işaretlenmiş probdan ilave edilerek kaynayan su banyosunda 10 dk bekletildi. Ardından hemen buz üzerine alındı.

Membranın zerindeki prehibridizasyon tamponu döküldü ve yerine prob ihtiva eden hibridizasyon tamponu boşaltılıp bir gün boyunca 42°C'de inkübe edildi. Ertesi sabah Őiřenin içerisindeki hibridizasyon tamponu alınıp bir tüpe aktarıldı ve -20°C'de muhafaza edildi. Membran 2 x SSC, %1'lik SDS içerisinde oda sıcaklığında 2 defa 5'er dakika sallayıcı üzerinde yıkandı. Ardından membran tekrar 2 x SSC, %1'lik SDS içerisinde 65°C'de 2 defa 15'er dakika sallayıcı üzerinde yıkandı. Daha sonra membran 20 ml maleik asit tamponunda 5 dk sallayıcı üzerinde yıkandı. 70 ml bloklama

solusyonunda 30 dk sallayıcı üzerinde bekletildi. 20 ml bloklama solusyonuna 4 ml DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Kat. No: 1 745 832)'deki vial 4'den ilave edildi. (1:5000 oranında). Membran bunun içerisinde 30 dk sallayıcı üzerinde bekletildi. 2 defa 15'er dakika yıkama solusyonunda (50'şer ml) yıkandı. 10 ml taze hazırlanmış renk solusyonunda, üzeri kapalı olarak karanlıkta bekletildi (10-15 dakika içerisinde renk oluşmaya başlar). Oluşan rengin koyuluğuna göre 2 saat sonra membran bu solusyon içerisinde alındı ve fotoğraflandı (Demirbağ, 1993).

2.5. Tespit Edilen Virüsün (MmEPV) Özelliklerinin Belirlenmesi

Mikroskopik ve moleküler olarak tespit edilen virüse ait yapı (sferoid ve spindil) ve enfeksiyon özellikleri (histopatoloji, insektisidal etki, enfeksiyonun optimum sıcaklığı, konak hassasiyeti, horizontal enfeksiyon) yapılan SDS-PAGE analizi ve çeşitli enfeksiyon testleriyle belirlendi.

2.5.1. MmEPV'nin SDS-PAGE Analizi

MmEPV sferoid ve spindilleri 0,2 M sodyum tioglikolat, 0,2 M sodyum karbonat, pH 10,9 tamponunda çözüldü (yaklaşık 1/2 saat). Çözünmemiş sferoidler ve virionlar 16,000 g'de 30 dk santrifüjle elimine edildi (Hernandez-Crespo, vd. 2000). Çözünmüş proteinleri içeren süpernatant %10'luk SDS-PAGE'e tabi tutuldu (Laemmli, 1970). Elektroforez 20 mA'de yapıldıktan sonra jel gümüş boyama prosedürüne göre boyandı.

Gümüş Boyama Prosedürü: Elektroforezden çıkarılan jel %50'lik metanol içinde 1 saat düşük hızda sallandı. Metanolden alınan jel, yeni hazırlanmış 100 ml gümüş nitrat solusyonunda 15 dk boyandı. 5 dk ddH₂O ile yıkandıktan sonra jel solusyon II'de (2,5 ml %1'lik sitrik asit, 0,25 ml %37'lik formaldehit, 500 ml'ye ddH₂O ile tamamlandı) bantlar görülünceye kadar bekletildi (yaklaşık 10 dk). Bu süre sonunda jel fiksatif solusyonu (solusyon III; 200 ml %50 metanol, 48 ml %12 asetik asit, 400 ml ddH₂O) içinde fikse edildi ve uygun bir zamanda görüntülendi.

Boya iki solusyon halinde hazırlandı.

A solusyonu: 0,8 gr gümüş nitrat 4 ml ddH₂O'da çözüldü.

B solusyonu: 21 ml %0,36'lık NaOH ile 1,4 ml şişeden yeni alınmış amonyak karıştırıldı.

A solusyonu karışmakta olan B solusyonuna yavaş yavaş (damla, damla) ilave edildi ve hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

2.5.2. MmEPV'nin Histopatolojisi

Larvaların kesimi süresince MmEPV'nin hangi dokuları enfekte ettiği araştırıldı. Bu amaçla kesimi yapılan larvaların farklı dokuları (trake, hemosit, yağ, bağırsak) fizyolojik su içinde, mikroskop altında incelendi ve enfeksiyonun hangi dokularda gerçekleştiği belirlendi. Dokularda mevcut olan MmEPV enfeksiyonu boyama yapılmaksızın bol miktarda sferoid varlığıyla belirlendi.

2.5.3. MmEPV'nin Morfolojik Özellikleri

Elde edilen viral ajana ait sferoid ve spindil yapıları ışık mikroskobu ve elektron mikroskobu altında incelendi. Mikroskop çalışmalarında rastgele olarak seçilen 50 adet EPV'nin boyutları mikrometrik oküler seti kullanılarak ölçüldü ve sferoidlerin boy ve genişlik değerleri, spindil boy değeri, sferoidlerin içerdiği virion sayısı ve virionların boy ve genişlik değerleri tespit edildi.

2.5.4. MmEPV'nin İnsektisidal Etkisinin Belirlenmesi

MmEPV'ye ait sferoidlerin farklı konsantrasyonlarının *M. melolontha* larvaları üzerindeki insektisidal etkileri araştırıldı. Hemositometre kullanılarak sferoid konsantrasyonu 7.5×10^6 , 4×10^4 ve 1×10^2 olarak ayarlandı. İkinci-üçüncü instar *M. melolontha* larvaları farklı konsantrasyonda sferoid bulaştırılmış besinler ile beslendiler. Kontrol grupları ise virüs ile muamele edilmemiş besinler ile beslendi. Ölen böceklerin kayıtları günlük olarak tutuldu. Ölüm oranları Abbott formülü ile hesaplandı (Abbott, 1925). Bu deneyler farklı zamanlarda üç kez tekrarlandı. Her bir konsantrasyon için toplam 30 adet larva kullanıldı.

(1) *Abbott formülü* :

(Test grubundaki ölüm yüzdesi - Kontrol grubundaki ölüm yüzdesi)

100 X

(%100 - Kontrol grubundaki ölüm yüzdesi)

2.5.5. MmEPV Enfeksiyonunun Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi

Farklı virüslerin, böcekleri farklı sıcaklıklarda enfekte ettikleri tespit edilmiştir. Virüslerin böceklerde gelişimi sıcaklığa bağlıdır. Yüksek sıcaklık hastalığın düşük sıcaklıklardakinden daha hızlı gelişmesini sağlar (Krieg, 1968). Bu nedenle MmEPV'nin optimum enfeksiyon sıcaklığını belirlemek için, $7,5 \times 10^6$ sferoid/ml virüs konsantrasyonu ikinci-üçüncü instar larvalara uygulandı. Bu gruplar 20°C, 22°C, 25°C, 28°C ve 30°C'de beslenerek enfeksiyonun gerçekleşmesi sağlandı. Her sıcaklıkta gerçekleşen ölümler günlük olarak kaydedilerek deney sonucunda oranlar Abbott formülü ile hesaplandı (Abbott, 1925). Bu deneyler farklı zamanlarda üç kez tekrarlandı. Her bir sıcaklık için toplam 30 adet larva kullanıldı.

2.5.6. MmEPV'nin Konak Hassasiyetinin Belirlenmesi

Virüsler dar bir konak hassasiyetine sahiptirler. Bu nedenle tespit edilen bir virüsün konak hassasiyeti oldukça önem kazanmaktadır. MmEPV virüsünün konak hassasiyetini belirlemek için tez kapsamında bulunan diğer fındık zararlıları olan *Agelastica alni* (L.) (Coleoptera: Chrysomelidae), *Amphimallon solstitiale* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae), *Anoplus roboris* (Sufr.) (Coleoptera: Curculionidae) ve *Balaninus nucum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) kullanıldı. Testlerde 7.5×10^6 sferoid/ml oranında MmEPV kullanıldı. Larva ve ergin böcekler MmEPV'ye ait sferoidler ile bulaştırılmış besin ile beslendi. Kontrol grupları ise virüs ile muamele edilmemiş besinler ile beslendi. Ölen böceklerin kayıtları günlük olarak tutuldu. Ölüm oranları Abbott formülü ile hesaplandı (Abbott, 1925). Bu deneyler farklı zamanlarda üç kez tekrarlandı. Her bir böcek grubu için toplam 30 adet kullanıldı.

2.5.7. MmEPV'nin Horizontal Enfeksiyonunun Belirlenmesi

Virüslerin taşınması ve popülasyon içindeki diğer bireylere ulaşarak onlarda enfeksiyon oluşturmaları, bu virüslerin biyolojik mücadelede kullanımını açısından büyük önem arz etmektedir. MmEPV'nin horizontal enfeksiyonunu belirlemek için üç deney grubu oluşturuldu. Birinci grupta 30 *M. melolontha* larvası MmEPV ile enfekte edildi. Bu grup pozitif kontrol olarak kullanıldı. İkinci grupta önce 30 adet larva MmEPV ile muamele edilmiş besinler ile 7 gün beslendikten sonra bu gruba 30 adet sağlıklı *M. melolontha* larvası eklendi ve oluşan yeni grup virüs içermeyen besinler ile 14 gün daha beslendi. Üçüncü grupta ise sağlıklı 30 adet *M. melolontha* larvası virüs ile muamele edilmemiş besinler ile beslendi. Bu grup negatif kontrol olarak kullanıldı.

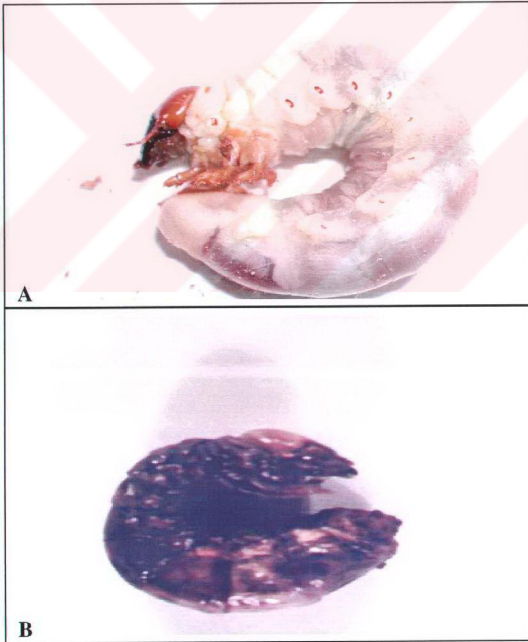
2.6. Çeşitli Entomopoxvirüslerin İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

Temin edilen çeşitli virüslerin Coleopter grubu fındık zararlıları üzerinde herhangi bir enfeksiyon oluşturup oluşturmadığı araştırıldı. Bu bağlamda *Geotrupes sylvaticus* (Panzer) (Coleoptera: Scarabaeidae) ve *Ips typographus* (L.) (Coleoptera: Scolytidae)'a ait EPV'ler 7.5×10^6 sferoid/ml oranında ikinci ve üçüncü instar *A. alni*, *A. solstitiale*, *A. roboris*, *B. nucum* ve *M. melolontha* larvaları ve erginleri üzerinde test edildi. Larva ve ergin böcekler entomopoxvirüs sferoidleri bulaştırılmış besin ile beslendi. Kontrol grupları ise virüs ile muamele edilmemiş besinler ile beslendi. Kayıtlar günlük olarak tutuldu. Bu deneyler farklı zamanlarda üç kez tekrarlandı. Her bir böcek grubu için toplam 30 adet böcek kullanıldı.

3. BULGULAR

3.1. Viral Enfeksiyon Gösteren Larvaların Belirlenmesi

Virüs varlığı ilk olarak enfekte olmuş larvaların doğrudan incelenmesiyle tespit edildi. Arazi çalışmalarında bazı larvaların uyuşuk bir halde oldukları ve davranışlarının anormal olduğu gözlemlendi. Daha sonra laboratuara getirilen larvaların beslenmeye son verdikleri bir müddet sonra öldükleri ve ölen larvaların vücutlarının sıvı hale geçtiği gözlemlendi. Ayrıca arazi şartlarında vücut rengi kararmış ve üzerinde öbek öbek beyaz lekelerin olduğu ölü larvalar tespit edildi. Şekil 3 A ve B enfekte olmamış ve MmEPV ile enfekte olmuş *Melolontha melolontha* larvalarının görüntülerini göstermektedir.



Şekil 3. *M. melolontha* larvalarının görüntüsü. A: Normal *M. melolontha* larvası; B: MmEPV ile enfekte olmuş *M. melolontha* larvası

3.2. Işık Mikroskobu ile MmEPV'nin İncelenmesi

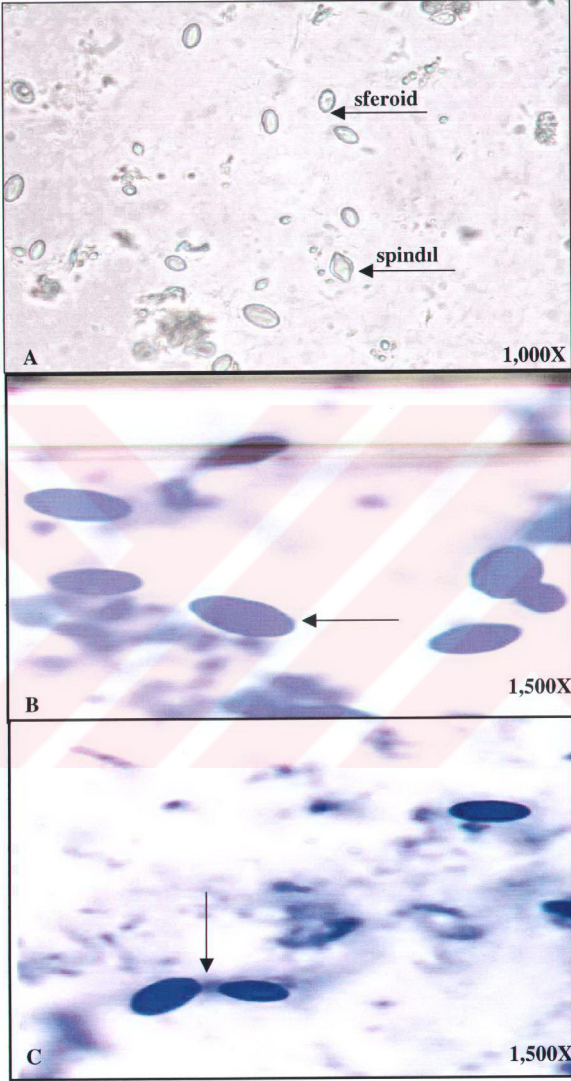
Makroskobik inceleme aşamasından sonra viral enfeksiyon ışık mikroskobu kullanılarak belirlendi. Işık mikroskobu çalışmaları direkt dokunun incelenmesi ve farklı boyama metodları ile virus inklüzyon yapılarının boyanarak belirlenmesi şeklinde olmak üzere iki şekilde gerçekleştirildi. Yapılan çalışmalar sonucunda, 2000-2003 yılları arasında tez kapsamında çalışılan Coleoptera üyesi 5 fındık zararlısından *Agelastica alni*, *Amphimallon solstitiale*, *Anoplus roboris* ve *Balaninus nucum*'da herhangi bir enfeksiyon gözlenmezken, *Melolontha melolontha* larvalarında düşük oranda bir viral enfeksiyon belirlendi (Tablo 7).

Tablo 7. Viral enfeksiyon oranı

Toplanan larva	İncelenen larva sayısı	Enfeksiyon gösteren larva sayısı	Enfeksiyon oranı (%)
<i>Agelastica alni</i>	1633	0	0
<i>Amphimallon solstitiale</i>	381	0	0
<i>Anoplus roboris</i>	127	0	0
<i>Balaninus nucum</i>	691	0	0
<i>Melolontha melolontha</i>	1260	11	0,87

Işık mikroskobu için mevcut olan bir çok boyama yöntemi arasından başlıca iki metot virüs teşhisinde, özellikle de inklüzyon yapıları oluşturan virüslerin teşhisine yardımcı olmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Buffalo Black 12B ve Giemsa boyası fiksasyon ve kompleks yöntemlerin kullanılmasına gerek kalmadan kolaylıkla uygulanabilirler.

Herhangi bir virüs enfeksiyonu olabileceğinden şüphelenilen larvaların dokularından yayma preparatlar hazırlanarak virüslerin oluşturmuş olduğu inklüzyon yapılarının varlığı araştırıldı. Boyama metodları ile yapılan incelemelerde *Melolontha melolontha* larvalarında EPV enfeksiyonu olduğu tespit edildi. Hazırlanan preparatlar ile MmEPV'nin oluşturmuş olduğu sferoidler belirlendi ve morfolojik özellikleri çalışıldı (Şekil 4).



Şekil 4. MmEPV'nin ışık mikroskobu görüntüleri.

A: Boyanmamış MmEPV sferoid ve spindilleri (1,000X);

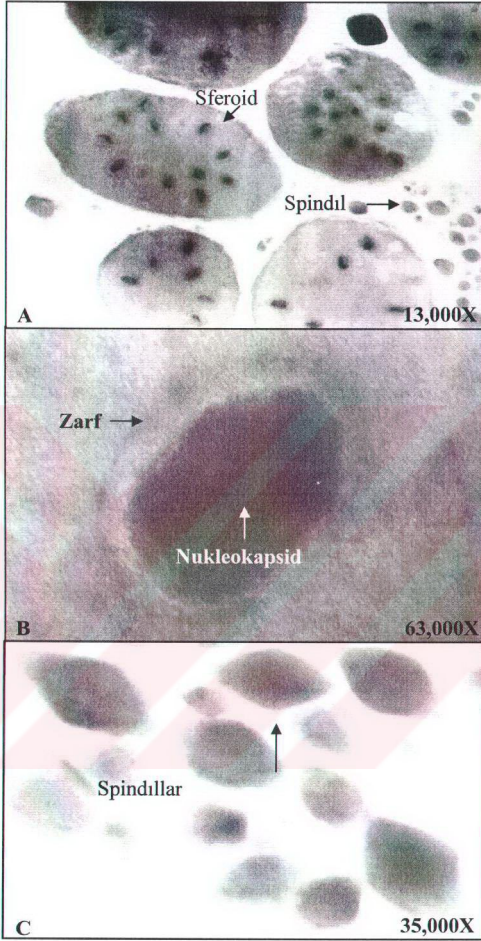
B: Giemsa ile boyanmış MmEPV sferoidleri (1,500X);

C: Buffalo Black 12B ile boyanmış MmEPV sferoidleri (1,500X)

M. melonantha'da enfeksiyon gösteren viral ajanın inklüzyon yapılarını belirlemek için yapılan boyama metodlarından Giemsa metodunda, sferoidler mavi renk alırken, Buffalo Black 12B ile siyah renkli yapılar olarak tespit edildiler.

3.3. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile MmEPV'nin İncelenmesi

TEM mikroskobu ile yapılan çalışmalarda MmEPV'ye ait sferoidlerin 6-18 adet viriona sahip olduğu (Şekil 5A) ve virionların uzunluğunun 450 ± 20 nm genişliğinin ise 250 ± 10 nm olduğu tespit edildi (Şekil 5B). Sferoidlerin ortalama olarak 16 (n=50) tane virion içerdikleri gözlemlendi. Sferoid boyunun $1,9-11,4$ μm arasında, ortalamasının ise $5,45\pm 2,323$ μm olduğu, eninin ise $1,14-5,7$ μm , ortalamasının ise $2,894\pm 1,130$ μm olduğu belirlendi. Virionların oval şekilli ve Coleptera entomopoxvirüslerine özel bir şekil olan unilaterale konkav merkeze sahip oldukları tespit edildi (Şekil 5B). Ayrıca literatürde viriona sahip olmadıkları belirtilen spindil yapıları da fotoğraflandı ve boylarının ortalama $1,071\pm 1,186$ μm olduğu belirlendi (Şekil 5C). En küçük spindil boyu $0,22$ μm , en büyük spindil boyu ise $4,4$ μm olarak belirlendi.

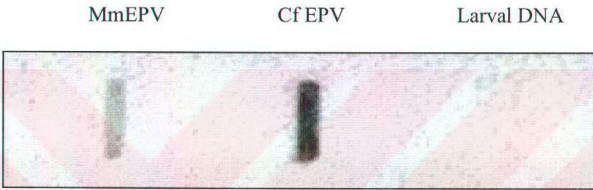


Şekil 5. MmEPV'nin elektron mikroskobu görüntüleri.

- A: MmEPV sferoid ve spindillerin total görünüşü (13,000X);
- B: MmEPV virionunun ayrıntılı görünüşü (63,000X);
- C: MmEPV spindillerinin görünüşü (35,000X)

3.4. Slot-Blot Hibridizasyonu

Tespit edilen virüsün Entomopoxviridae familyasından bir virüs olduğunu kanıtlamak için Entomopoxviridae familyasından *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae) EPV (CfEPV)'den elde edilmiş proplar kullanılarak yapılan hibridizasyon sonucunda, CfEPV (pozitif kontrol) DNA'sının ve MmEPV DNA'sının emdirildiği gözlerde bağlanma olurken sağlıklı böcek homojenatında (negatif kontrol) hiçbir bağlanma olmadığı gözlemlendi (Şekil 6).



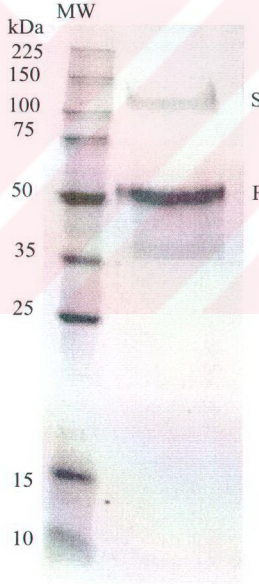
Şekil 6. MmEPV DNA'sının slot-blot hibridizasyonu yöntemi ile belirlenmesi. MmEPV: Enfekte olmuş *M. melolontha* larvalarından izole edilmiş DNA; CfEPV: CfEPV *fus* geni DNA'sı (Pozitif Kontrol); Larval DNA: Enfekte olmamış *M. melolontha* larvalarından izole edilmiş DNA (Negatif Kontrol)

3.5. MmEPV'nin Özellikleri

Tespit edilen MmEPV'ye ait inklüzyon yapı proteinleri, morfolojik özellikler ve enfeksiyon özellikleri yapılan çalışmalar ile belirlendi.

3.5.1. Viral Proteinlerin SDS-PAGE Analizi

MmEPV'ye ait sferoidleri oluşturan sferoidin proteini ve spindilları oluşturan fusolin proteini %10'luk poliakrilamid jel kullanılarak SDS-PAGE'de görüntüledi. Literatür ile de uygun olarak sferoidin proteininin 110 kDa, fusolin proteinin ise 50 kDa ağırlığında olduğu tespit edildi (Şekil 7).



Şekil 7. MmEPV sferoidin ve fusolin proteinlerinin %10'luk SDS-PAGE görüntüsü. MW: Moleküler Markır; S: Sferoidin; F: Fusolin

3.5.2. MmEPV'nin Histopatolojisi

MmEPV'nin hangi dokularda enfeksiyon oluşturduğu sorusuna cevap bulmak için yapılan doku diseksiyonu çalışmalarında trake, hemosit, yağ ve bağırsak dokuları incelendi. Şekil 8, MmEPV'nin yağ dokusu içindeki enfeksiyonunu göstermektedir.

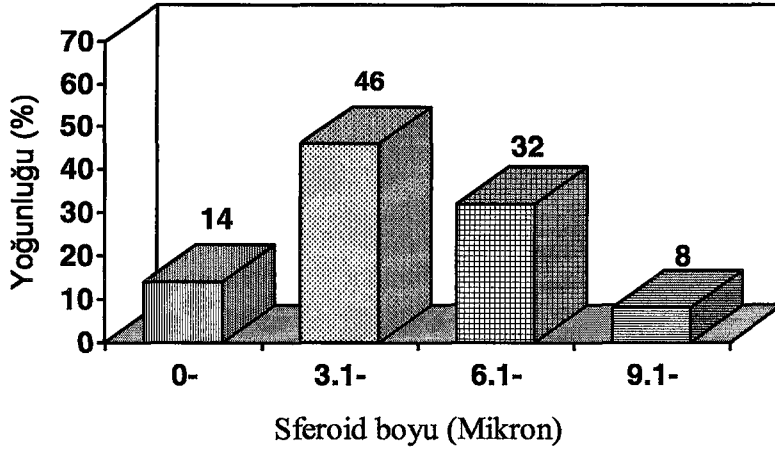


Şekil 8. Yağ dokusu içinde toplu halde MmEPV sferoidleri (300X)

3.5.3. MmEPV'nin Morfolojik Özellikleri

Virtüse ait sferoid ve spindil yapılarının dış morfolojilerinin belirlenmesi için yapılan çalışmalar sonucunda sferoidlerin oval şekilli, spindillerin ise bipiramidal şekilli oldukları belirlendi.

Ölçümler sonucunda MmEPV'lere ait sferoidlerin 1,14–5,7 μm genişliğinde, 1,9–11,4 μm uzunluğunda, ortalamalarının ise $2,894 \pm 1,130$ μm genişliğinde, $5,45 \pm 2,323$ μm uzunluğunda olduğu belirlendi ($n= 50$). Sferoidlerin boyunun %46'sının 3,1-6 μm aralığında yoğunlaştığı tespit edildi (Şekil 9).



Şekil 9. MmEPV sferoid boylarının dağılımı

3.5.4. MmEPV'nin İnsektisidal Etkisi

MmEPV'nin enfeksiyon yeteneğini belirlemek için farklı konsantrasyonlardaki virus süspansiyonları ikinci-üçüncü instar *Melolontha melolontha* larvalarına uygulandı. $7,5 \times 10^6$ sferoid/ml konsantrasyon larvalar üzerinde % 93,3'lük bir ölüm oranı sağladı. Larval ölüm en erken 7. günde başlarken, 15. günde bitti.

MmEPV'ye ait sferoidlerin farklı konsantrasyonlarının *M. melolontha* larvaları üzerindeki insektisidal etkileri Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8. MmEPV'nin insektisidal etkisi

MmEPV konsantrasyonu (sferoid/ml)	İnsektisidal etki (%)
$7,5 \times 10^6$	93,3
$1,5 \times 10^4$	80
1×10^2	36,6

3.5.5. MmEPV Enfeksiyonunun Optimum Sıcaklığı

MmEPV'nin en yüksek enfeksiyon gösterdiği optimum sıcaklığı belirlemek için $7,5 \times 10^6$ sferoid/ml virüs konsantrasyonu ikinci-üçüncü instar *M. melolontha* larvaları üzerinde uygulandı. Larvaların 20°C, 22°C, 25°C, 28°C ve 30°C'de beslenerek enfeksiyonun gerçekleşmesi sağlandı (Tablo 9). En yüksek enfeksiyon değeri 25°C'de tespit edildi. Gerek doğa gerekse laboratuvar şartlarında enfekte olmuş larvalar arasında yapılan gözlemlerde enfeksiyonlu larvaların vücutlarında sıvılaşmanın en hızlı 25-28° C arasında olduğu gözlemlendi.

Tablo 9. MmEPV'nin farklı sıcaklıklardaki insektisidal etkisi

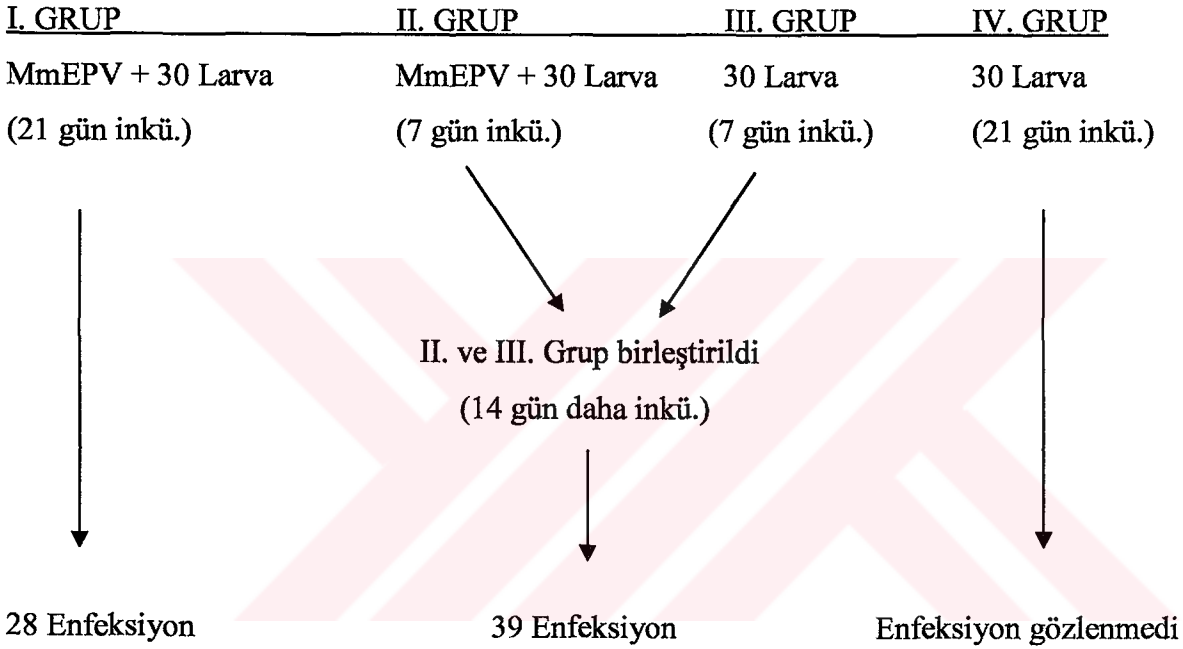
Sıcaklık	Insektisidal etki (%)
20°C	73,3
22°C	76,6
25°C	93,3
28°C	86,6
30°C	83,3

3.5.6. MmEPV'nin Konak Hassasiyeti

MmEPV virüsünün konak hassasiyetini belirlemek için *Agelastica alni* (L.) (Coleoptera: Chrysomelidae) larvaları, *Amphimallon solstitiale* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae) larvaları, *Anoplus roboris* (Sufr.) (Coleoptera: Curculionidae) erginleri ve *Balaninus nucum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) larvaları üzerinde insektisidal etkiler araştırıldı. Yapılan çalışmalar neticesinde MmEPV'nin *M. melolontha*'dan başka test edilen diğer fındık zararlısı böcekler üzerinde herhangi bir insektisidal etki oluşturmadığı belirlendi.

3.5.7. MmEPV'nin Horizontal Enfeksiyonu

Horizontal enfeksiyonu belirlemek için yapılan çalışmalar aynı populasyon içindeki larvalar arasında enfeksiyonun yayılma oranının %28,2 olduğunu gösterdi (Şekil 10). Şekilden de görüldüğü gibi MmEPV ile enfekte olmuş deney grubuna 7 gün sonra ilave edilen 30 sağlıklı larvadadan pozitif kontrol grubuna göre 11 tane daha fazlasında viral enfeksiyon tespit edildi.



Şekil 10. MmEPV'nin horizontal enfeksiyonu

3.6. Çeşitli Entomopoxvirüslerin İnsektisidal Etkileri

Temin edilen çeşitli virüslerin Coleoptera grubu fındık zararlıları üzerinde herhangi bir enfeksiyon oluşturup oluşturmadığı araştırıldı. Bu bağlamda *Geotrupes sylvaticus* (Panzer) (Coleoptera: Scarabaeidae) ve *Ips typographus* (L.) (Coleoptera: Scolytidae)'a ait EPV'ler $7,5 \times 10^6$ sferoid/ml oranında ikinci ve üçüncü instar *A. alni*, *A. solstitiale*, *A. roboris*, *B. nucum* ve *M. melolontha*, larvaları ve erginleri üzerinde test edildi. Farklı zamanlarda üç kez tekrarlanarak yapılan deneyler sonucunda bu iki entomopoxvirüsün (GsEPV ve ItEPV) test edilen böcekler üzerinde herhangi bir enfeksiyonuna rastlanmadı.

4. TARTIŞMA

Bu doktora tezi kapsamında 4 yıl (2000-2003) süren arazi çalışmaları sırasında araştırılan, Coleoptera takımına ait önemli fındık zararlılarından *Agelastica alni*, *Amphimallon solstitiale*, *Anoplus roboris*, *Balaninus nucum* ve *Melolontha melolontha*'da hastalık oluşturan viral patojenler ve bunların biyolojik mücadeledeki kullanım potansiyelleri araştırıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda bu beş fındık zararlısından sadece *Melolontha melolontha* larvalarında Entomopoxviridae familyasına ait bir virüs tespit edildi.

Virüs varlığı ilk olarak enfekte olmuş böcek dokularının doğrudan incelenmesiyle tespit edildi. Arazi çalışmalarında bazı larvaların uyuşuk bir halde oldukları ve davranışlarının anormal olduğu gözlemlendi. Daha sonra laboratuara getirilen larvaların beslenmeye son verdikleri bir müddet sonra öldükleri ve ölen larvaların vücutlarının sıvı hale geçtiği gözlemlendi. Ayrıca arazi şartlarında vücut rengi kararmış ve üzerinde öbek öbek beyaz lekelerin olduğu ölü larvalar tespit edildi. Bu dış semptomlar bunun tipik bir viral hastalık olduğunu göstermektedir (Coppel ve Martins, 1977).

Enfeksiyon varlığından şüphelenilen dokuların mikroskop altında sağlıklı dokular ile karşılaştırılmasında, ayrıntının kaybolması, sitoplazmada sık materyalin görülmesi ve sitoplazmada yoğun gruplaşmış oval şekillerin olması gibi farklı özellikler tespit edildi. Bu özellikler enfeksiyonu ve virojenik gelişimi gösterir (Evans ve Shapiro, 1997). Bu oval yapıların viral ajanların oluşturmuş olduğu inklüzyon yapıları olup olmadığını araştırmak için çeşitli boyama metotları uygulandı. Uygulanan boyama metoduna göre inklüzyon yapılar ya hiç boyanmazlar, yada kullanılan boyanın rengini alırlar. *M. melolontha*'da enfeksiyon gösteren viral ajanın inklüzyon yapılarını belirlemek için yapılan boyama metotlarından Giemsa metodunda, sferoidler mavi renk alırken, Buffalo Black 12B ile siyah renkli yapılar olarak tespit edildiler. Dolayısıyla bu sonuçlar bu inklüzyon yapılarının Entomopoxviridae familyasına ait viral inklüzyon yapıları olduğunu göstermektedir (Evans ve Shapiro, 1997).

Böcek virüslerinin teşhisi ve karakterizasyonunda sadece morfolojik özelliklerin kullanılması yanında viral ajana ait inklüzyon yapıların ve virionların iç yapılarının aydınlatılması da önemlidir. Bu amaçla yapılan elektron mikroskobu (TEM) çalışmaları tespit edilen virüsün inklüzyon yapılarının ve virion şekillerinin Coleoptera grubu

böceklerde rastlanan EPV'lerin temel karakteristik özelliği olan oval şekilli olduklarını gösterdi.

Entomopoxviridae familyası virüsler uzunluğu 5-20 μm arasında değişen ölçülerde sferoidal inklüzyon yapılarına sahiptirler (Amargier vd., 1964; Arif, 1995). Her bir konağa has virüs tipi kendine özgü sferoid ve virion ölçülerine sahiptir. TEM çalışmaları kapsamında EPV'nin oluşturmuş olduğu sferoidlerden rastgele seçilen 50 tanesinin ölçülmesi sonucunda tespit edilen virüse ait sferoid boyunun 1,9–11,4 μm arasında, ortalamasının ise $5,45 \pm 2,323$ μm olduğu, eninin ise 1,14–5,7 μm , ortalamasının ise $2,894 \pm 1,130$ μm olduğu belirlendi.

MmEPV'ye ait ölçüler literatürde belirtilen diğer EPV'ler ile karşılaştırıldı (Tablo 10). Bu çalışmada tespit edilen MmEPV'nin literatürdeki diğer EPV'lere ait sferoid boyutları ile yapılan karşılaştırmasında, özellikle Vago (1963) tarafından Fransız izolatu olarak literatüre kazandırılan MmEPV'ye ait ölçülerden önemli derecede farklı olduğu görülmektedir. Bu izolatının maksimum sferoid boyu 11,4 μm iken Fransız izolatının maksimum sferoid boyunun 24 μm olduğu görülmektedir.

Tablo 10. Bazı EPV'lere ait sferoid boyutları

Konak	Sferoid Boyu	Kaynak
<i>Adoretus versutus</i>	12 x 20 μm	Beaudoin vd., 1994a
<i>Anomala cuprea</i>	5 x 8 μm	Katagiri vd., 1975
<i>Figulus sublaevis</i>	1 - 5 μm	Vago vd., 1968
<i>Geotrupes sylvaticus</i>	3,5 - 11 μm	Lipa ve Bartkowski, 1972
<i>Melolontha melolontha</i>	10 - 24 μm	Vago, 1963
<i>Melolontha melolontha</i>	5,7 x 11,4 μm	Bu çalışma
<i>Phyllopertha horticola</i>	6 - 25 μm	Vago vd., 1969

İncelemelerde sferoidlerin 6-18 arasında viriona sahip olduğu ve virionların 450 ± 20 nm uzunluğunda, 250 ± 10 nm genişliğinde olduğu tespit edildi. Fransız izolatında ise sferoidlerin 110-120 adet viriona sahip olduğu bilinmektedir (Vago, 1963; Bergoin vd., 1971). Virionların oval şekilli ve Colepteran entomopoxvirüslerine özel bir şekil olan unilateral konkav merkeze sahip oldukları belirlendi. Tablo 11'de bazı Coleopteran

EPV'lerinin morfolojik özellikleri sunulmuştur (Arif ve Kurstak, 1991). Tablo 11'den de anlaşılacağı gibi MmEPV izolatu Coleoptera EPV'lerine özel olan oval şekilli ve unilateral konkav merkez şekilli virionlara sahiptir. Ayrıca bilindiği üzere Coleoptera ve bazı Lepidoptera konaklar ikinci bir protein yapısı olan spindilleri de içermektedirler. Bu çalışmada literatürde viriona sahip olmadıkları belirtilen spindil yapıları da fotoğraflandı ve boylarının ortalama $1,071 \pm 1,186 \mu\text{m}$ olduğu tespit edildi. En küçük spindil boyu $0,22 \mu\text{m}$, en büyük spindil boyu ise $4,4 \mu\text{m}$ olarak belirlendi.

Tablo 11. Bazı Coleoptera entomopoxvirüslerinin morfolojik özellikleri

Konak	Virüs ölçüleri (nm)	Inklüzyon yapı (μm)	Virüs şekli	Merkez şekli	spindil
<i>Melolontha melolontha</i> ¹	450 x 250	10 - 24	oval	unilateral konkav	mevcut
<i>Melolontha melolontha</i> ²	450 x 250	5,7 x 11.4	oval	unilateral konkav	mevcut
<i>Othnonius batesi</i>	470 x 265	5 - 10	oval	unilateral konkav	mevcut
<i>Demodena boranensis</i>	420 x 230	8 - 11	oval	unilateral konkav	mevcut
<i>Geotrupes sylvaticus</i>	366 - 416 x 255 - 286	3,5 - 11	oval	unilateral konkav	mevcut
<i>Dermolepida alborhirtum</i>	420 - 450 x 220 - 240	3 - 5	oval	unilateral konkav	mevcut değil
<i>Aphodius tasmaniae</i>	380 - 430 x 250 - 300	5 - 12	oval	unilateral konkav	mevcut
<i>Anomala cuprea</i>	440 x 250	5 x 8	oval	unilateral konkav	mevcut
<i>Phyllopertha horticola</i>	400 x 240	6 - 25	oval	unilateral konkav	mevcut
<i>Figulus sublaevis</i>	330 x 290	1 - 5	oval	unilateral konkav	mevcut

¹ Hurpin ve Vago, 1963; Bergoin vd., 1968

² Bu çalışma

İzole edilen virüsün sferoid boyutlarının ve her bir sferoidin içerdiği virion sayısının farklı olması *Melolontha melolontha* entomopoxvirüsün (MmEPV)'nün yeni bir izolatu olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlardan dolayı bu virüs izolatu hem yeni bir izolat hem de Türkiye'den belirlenen ilk EPV olması nedeniyle MmEPV'nin Türk izolatu ve dünyada Fransız izolatının dışında belirlenen ikinci MmEPV izolatu olarak tanımlanmıştır.

Morfolojik ve elektron mikroskobu çalışmaları ile tespit edilen viral ajanın entomopoxviridae familyasına ait bir böcek virüsü olduğunu moleküler teknikler ile de ispatlamak için DNA-DNA hibridizasyon tekniği kullanıldı. *Choristoneura fumiferana* (Clemens) (Lepidoptera: Tortricidae) entomopoxvirüsüne (CfEPV) ait fusolin genine özel prob ile yapılan hibridizasyon çalışmalarında, tespit edilen virüsten elde edilen DNA CfEPV *fus* gen probu ile hibridize oldu. DNA hibridizasyon metodunun etkili olduğu Ward vd., (1987) tarafından da belirtilmiştir. Bu hibridizasyon sonuçları tespit edilen virüsün bir EPV olduğunu moleküler olarakta göstermekte ve önceki morfolojik çalışmalarda elde edilen sonuçları desteklemektedir.

Böcek virüslerinin taşınımında yağmurun önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (Mohamed vd., 1982). Ayrıca enfekte olmuş larva ölümlerinin parçalanmasıyla dağılan sferoidler enfeksiyonun diğer bireylere ulaşmasını sağlarlar. Virüsler konak generasyonları arasında yada yıllarca toprakta enfeksiyon özelliklerini koruyabilirler (Olofson, 1988).

MmEPV'nin enfeksiyon yeteneğini belirlemek için yapılan çalışmalar sonucunda $7,5 \times 10^6$ sferoid/ml konsantrasyonundaki MmEPV'nin *M. melolontha* larvaları üzerinde %93.3'lük bir ölüm oranına sahip olduğu tespit edildi. Tespit edilen bu enfeksiyon değeri MmEPV'nin *M. melolontha* zararlısı için çok verimli bir şekilde biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılabileceğini gösterdi.

MmEPV'nin optimum enfeksiyon sıcaklığını belirlemek için yapılan çalışmalar sonucunda MmEPV'nin optimum enfeksiyon sıcaklığı 25°C olarak tespit edildi. Gerek doğal populasyon içinde gerekse deneysel olarak enfekte olmuş larvalar arasında yapılan gözlemlerde enfekte olmuş larvalarda vücut sıvılaşmasının en hızlı 25-28° C arasında olduğu gözlemlendi. Viral ajanların larvalarda gelişimi sıcaklığa bağlıdır. Yüksek sıcaklık hastalığın düşük sıcaklıklardakinden daha hızlı gelişmesini sağlar (Krieg, 1955; 1968). Bununla birlikte düşük sıcaklıklarda larvalar gelişimlerini tamamlamak için normalden daha fazla zamana ihtiyaç duyarlar.

MmEPV'nin konak hassasiyetini belirlemek için yapılan çalışmalarda, MmEPV'nin test edilen *Agelastica alni* (L.) (Coleoptera: Chrysomelidae) larvaları, *Amphimallon solstitiale* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae) larvaları, *Anoplus roboris* (Sufr.) (Coleoptera: Curculionidae) erginleri ve *Balaninus nucum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) larvalarından hiçbiri üzerinde enfeksiyon göstermediği belirlendi. Bu sonuçlar MmEPV'nin konak hassasiyetinin çok dar olduğunu göstermektedir. Bir virüse ait konak hassasiyetinin dar olması her ne kadar istenilen bir durum olsada bazı durumlarda birden

fazla istenilen konak üzerinde enfeksiyon oluşturan virüsler rekombinant tekniklerle üretilebilirler.

MmEPV'nin horizontal enfeksiyonunun belirlemek için yapılan çalışmalarda da bu enfeksiyonun önemli derecede populasyon içinde viral enfeksiyonun yayılmasında rol oynadığını göstermektedir. Şekil 10'dan anlaşıldığı gibi laboratuvar şartlarında yapılan çalışmalarda horizontal enfeksiyon ile populasyon içindeki viral enfeksiyonun %28,2 daha fazla arttığı görülmektedir. Bu sonuç horizontal enfeksiyonun MmEPV'nin biyolojik mücadelede kullanılmasında büyük rol oynayacağını göstermektedir. Ayrıca parazitoid ve predatörler virüsleri farklı bölgelerdeki populasyonlara taşıyarak enfeksiyonun yayılmasını sağlarlar (Greathead, 1976).

MmEPV'nin enfeksiyon çalışmaları dışında Coleoptera takımından *Geotrupes sylvaticus* (Panzer) (Coleoptera: Scarabaeidae) ve *Ips typographus* (L.) (Coleoptera: Scolytidae)'a ait EPV'lerin çalışılan 5 fındık zararlısı üzerinde herhangi bir enfeksiyon özelliğine sahip olup olmadığı araştırıldı. GsEPV ve ItEPV'nin ($7,5 \times 10^6$ sferoid/ml) test edilen *A. alni*, *A. solstitiale*, *A. roboris*, *B. nuceum* ve *M. melolontha* larvaları ve erginleri üzerinde enfeksiyonuna rastlanılmadı. Bu da bize entomopoxvirüslerin konak hassasiyetlerinin gerçekten çok dar olduğunu bir kez daha gösterdi. Ayrıca bu çalışmada tespit edilen MmEPV'nin *M. melolontha*'nın biyolojik kontrolü için ne kadar önemli olduğunu ortaya sermektedir.

Coleopteran entomopoxvirüslerin karakteristik yapıları olan sferoid ve spindilleri oluşturan sferoidin ve fusolin proteinlerinin literatürle uyum içinde moleküler ağırlıklarının sırasıyla 110 kDa ve 50 kDa oldukları tespit edildi ve SDS-PAGE'de görüntülendi. Bu çalışmadaki sonuçlar Sanz vd. (1994) ve Gauthier vd. (1995)'nin sonuçlarını destekler nitelikte olup, *M. melolontha* entomopoxvirüsün Fransız izolatının sferoidin proteininin 110-115 kDa, fusolin proteininin ise 50 kDa olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada tespit edilen MmEPV'nin etkili, seçici ve güvenli bir biyolojik kontrol ajanı olduğu düşünülmektedir.

Tüm dünyada özellikle son yıllarda zararlı böcekler ile mücadelede virüslerin kullanımına yönelik çalışmalar hızla ilerlerken ve günümüzde virüslere ait birçok ticari preparat üretilip piyasaya sunulurken, ülkemizde zararlı böcekler ile biyolojik mücadelede virüslerin kullanımına yönelik çalışmalar yok denecek kadar azdır. Literatüre bakıldığında bu çalışma ülkemizde böcek virüsleri üzerine yapılan en temel iki çalışmadan biridir. Dolayısıyla bu çalışmanın ülkemizde hem bu zararlıya karşı hem de diğer zararlılara karşı

viral kontrol ajanlarının seçimi, geliştirilmesi ve kullanımını teşvik edeceğini, biyolojik mücadele açısından büyük öneme sahip yeni böcek virüslerinin tespitine yönelik çalışmalara örnek olacağı ve ivme kazandıracığı düşünmektedir.



5. SONUÇLAR

Bu doktora tezi süresince elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

1. Beş önemli Coleoptera grubu fındık zararlısıyla mücadelede kullanılmak üzere onların doğal düşmanı olan virüsler araştırıldı ve sadece *Melolontha melolontha* (L.)'da bir viral enfeksiyon tespit edildi.
2. Tespit edilen virüsün morfolojik, mikroskopik ve moleküler çalışmalar sonucunda Entomopoxviridae familyasından bir virüs (EPV) olduğu tespit edildi ve MmEPV-TR olarak adlandırıldı.
3. Tespit edilen MmEPV'nin Türkiye için birinci, dünya için Fransız izolatından sonra ikinci MmEPV izolatı olduğu belirlendi.
4. Yapılan çalışmalar sonucunda $7,5 \times 10^6$ sferoid/ml konsantrasyonundaki MmEPV'nin *M. melolontha* larvaları üzerinde 15 gün içinde %93,3'lük bir ölüm oranına sahip olduğu tespit edildi.
5. MmEPV için optimum enfeksiyon sıcaklığı 25°C olarak tespit edildi.
6. MmEPV'nin konak hassasiyetinin çok sınırlı olduğu bulundu. MmEPV'nin test edilen *Agelastica alni* (L.) (Coleoptera: Chrysomelidae) larvaları, *Amphimallon solstitiale* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae) larvaları, *Anoplus roboris* (Sufr.) (Coleoptera: Curculionidae) erginleri ve *Balaninus nucum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) larvalarından hiçbiri üzerinde enfeksiyon göstermediği belirlendi.
7. MmEPV'nin populasyon içinde % 28,2'lik bir oranda yayıldığı tespit edildi.
8. *Geotrupes sylvaticus* (Panzer) (Coleoptera: Scarabaeidae) ve *Ips typographus* (L.) (Coleoptera: Scolytidae)'a ait EPV'lerin ($7,5 \times 10^6$ sferoid/ml) test edilen *A. alni*, *A. solstitiale*, *A. roboris*, *B. nucum* ve *M. melolontha* larvaları ve erginleri üzerinde enfeksiyonuna rastlanılmadı.
9. Sferoidleri oluşturan sferoidin proteininin 110 kDa, spindilleri oluşturan fusolin proteininin ise 50 kDa ağırlığında olduğu tespit edildi.
10. Bu çalışma ile Türkiye için çok yeni olan bu alanda bir böcek virüsü tespit edilerek tanımlandı.
11. Bu sonuçlar ile MmEPV'nin *M. melolontha*'nın mücadelesinde etkili bir şekilde kullanılabileceği ortaya konuldu.

6. ÖNERİLER

Dünyanın birçok yerinde olduğu gibi ülkemizde de tarımsal zararlılar ile mücadele bazı istisnalar hariç büyük oranda kimyasal ilaçlar kullanılarak yapılmaktadır. Kimyasalların insanlar ve çevremiz üzerindeki kötü etkileri hepimizce çok iyi bilinmektedir. Son yıllarda büyük araştırmalara konu olan biyolojik mücadele kimyasal mücadele yöntemleriyle bağlantılı birçok problemi ortadan kaldırmaktadır. Bundan dolayı biyolojik mücadele, kimyasal mücadele ile karşılaştırıldığında ekolojik dengeyi bozmayan alternatif bir mücadele yöntemidir. Bu bağlamda bu tez sonucunda tespit edilip, morfolojik ve moleküler olarak tanımlanan MmEPV'nin önemli bir fındık zararlısı olan *M. melolontha* ile mücadelede kimyasallara alternatif olarak kullanılmalıdır. Bu amaçla bu virüsün kitle üretimi gerçekleştirmeli ve ticari şekli sunulmalıdır. Böylece hem bu zararlıyla mücadelede kullanılan kimyasalların çevreye yapmış olduğu olumsuz etkiler ortadan kalkacak hem de ekonomik açıdan daha düşük maliyet gerektirecektir. Bu virüsün isteğe bağlı olarak konak hassasiyeti ve etki oranı rekombinant teknikler kullanılarak geliştirilebilir. Bu çalışma ülkemizde bu alanda yapılan temel çalışma olması nedeniyle, bu alanda çalışacak diğer araştırmacılar için örnek alınacak bir çalışma olacaktır. Bu tezde sunulan bilgiler kullanılarak diğer tarımsal zararlılar ile mücadelede yeni viral ajanların tespiti mümkün olabilir.

7. KAYNAKLAR

- Abbott, W. S., 1925. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. J. Econ. Entomol. 18, 265-267.
- Aliniazae, M. T., 1975. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* against *Archips roranus* (Lepidoptera: Tortricidae), Canadian Entomologists, 106, 4, 393-398.
- Amargier, A., Vago, C. ve Maydanier, G., 1964. Etude Histopathologique de l'Evolution de la Virose a Fuseaux Chez le Coleoptera *Melolontha melolontha*, Mikroskopie, 19, 309.
- Arif, B. M., 1986. The Structure of Viral Genome, In: The Molecular Biology of Baculoviruses, Doerfler, W. and Bohm, P. (Eds.), Springer, Berlin, 21.
- Arif, B. M., 1995. Recent Advances in the Molecular Biology of Entomopoxviruses, J. General Virology, 76, 1-13.
- Arif, B. M. ve Kurstak, E., 1991. Viruses of Invertebrates, New York, USA, Marcel Dekker, Inc., 179.
- Beaudoin, L. Robert, P. ve Lal, S. N., 1994a. An Entomopoxvirus Observed in *Adoretus versutus* Harold (Coleoptera; Scarabaeidae; Rutelinae) in Fiji, Int. J. Pest Management, 40, 1, 66-68.
- Beaudoin, L. Robert, P., Lal, S. N. ve Decazy, B., 1994b. *Adoretus versutus* Control Using Entomopoxvirus in Fiji, Plantation Recherche Dev., 1(2): 50.
- Bergoin, M., Devauchelle, G., Duthoit, J. L. ve Vago, C., 1968. Etude au Microscope Electronique des Inclusions de la Virose a Fuseaux des Coleopteres, C. R. Acad. Sci., 266, 2126.
- Bergoin, M., Devauchelle, G. ve Vago, C., 1971. Electron Microscopy Study of *Melolontha* Poxvirus: The Fine Structure of Occluded Virions, Virology, 43, 453-467.
- Berkes, F. ve Kışlalıoğlu, M., 1990. Ekoloji ve Çevre Bilimleri, Remzi Kitabevi, İstanbul.
- Bilimoria, S. L., 1991. The Biology of Nuclear Polyhedrosis Viruses, In: Viruses of Invertebrates, Kurtsak, E. (Ed.), Marcel Dekker, New York, 1-72.
- Burges, H., D. ve Hussey, N. W., 1971. Microbial Control of Insects and Mites, Academic Press, London, New York.
- Christian, P. D., 1992. A Simple Vacuum Dot-Blot Hybridisation Assay for the Detection of Drosophila A ve C Viruses in Single Drosophila, J. Virological Methods, 38, 153-164.

- Coppel, H. C. ve Martins, J. W., 1977. Biological Insect Pest Suppression, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York.
- Cunningham, J. C., 1988. Baculoviruses-Their Status Compared to *Bacillus thuringiensis* as Microbial Insecticides, Outlook on Agriculture.
- Cunningham, J. T. ve Entwistle, P. F., 1981. Control of Sawflies by Baculovirus, Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980, London, Academic Press, 379-407.
- Çanakçıoğlu, H., 1970. Orman Ağaçlarına Arız Olan Bazı Aphidlere Karşı Yapılan Kimyasal Mücadele Denemeleri ve Neticeleri, İstanbul Üniv., Orman Fak. Dergisi, Seri A, 20, 94-114.
- Çanakçıoğlu, H., 1971. Zararlı Böceklerle Savaş, İstanbul Üniv., Orman Fak. Yayınları, İstanbul.
- Dağ, S. S., Aykaç, V. T., Gündüz, A., Kantarcı, M. ve Şişman, N., 2000. Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi, Ankara, 38, cilt no: 2, 933.
- Deacon, J., 1983. Microbial Control of Plant Pests & Diseases. Published by Van Nostrand Reinhold (UK) Co. Ltd. Molly Millars Lane, Wokingham, Berkshire, England.
- Demirbağ, Z., 1993. Comparative Replication of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus in Abortive and Productive Infections of Insect Cell Lines, PhD Thesis, Texas Tech University, Texas, USA.
- Demirbağ, Z. ve Beldüz, A. O., 1997. Baculovirüs'ün Biyolojik Mücadeledeki Önemi, Kükem Dergisi, 20, 1, 49-58.
- Ecevit, O., 1988. Zirai Mücadele İlaçları ve Çevreye Olan Etkileri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları, Samsun.
- Evans, H. ve Shapiro, M., 1997. Viruses, In: Manual of Techniques in Insect Pathology, Lawrence, A. L. (Ed.), Academic Press, London, 17-53.
- Fraser, M. J., 1987. Ultrastructural Observations of Virion Maturation in *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Infected *Spodoptera frugiperda* Cell Cultures, J. Ultrastruc. Mol. Struct. Res., 95, 189-195.
- Gauthier, L., Cousserans, F., Veyrunes, J. C. ve Bergoin, M., 1995. The *Melolontha melolontha* Entomopoxvirus (MmEPV) Fusolin is Related to Fusolins of Lepidopteran EPVs and to the 37 K Baculovirus Glycoprotein, Virology, 208, 427-436.
- Greathead, D. J., 1976. A Review of Biological Control in Western and Southern Europe, Slough, Commonwealth Agricultural Bureaux Farnham Royal, 182.

- Hall, R. L. ve Moyer, R. W., 1991. Identification, Cloning, and Sequencing of a Fragment of *Amsacta moorei* Entomopoxvirus DNA Containing the Spheroidin Gene and Three Vaccinia Virus-Related Open Reading Frames, Journal of Virology, 65, 6516-6527.
- Hall, R. L. ve Moyer, R. W., 1993. Identification of an *Amsacta* Spheroidin-Like Protein Within the Occlusion Bodies of *Choristoneura fumiferana* Entomopoxviruses, Virology, 192, 179-187.
- Hammock, B. D., McCutchen, B. F., Beetham, J., Choudary, P. V., Fowler, E., Ichinose, R., Ward, V. K., Vickers, J. M., Bonning, B. C., Harsman, L. G., Grant, D., Uematsu, T. ve Maeda, S., 1993. Development of Recombinant Viral Insecticides by Expression of an Insect-Specific Toxin and Insect-Specific Enzyme in Nuclear Polyhedrosis Viruses, Arch. Insect Biochem. Physiol., 22, 315-344.
- Hengjun, G., Hongyin, Z., Weiqi, G., Yi, L., Weiping, R. ve Shudong, X., 2001. Construction and Identification of the Eukaryotic Expression Vector of Vaccinia Virus Expressing Human İnterleukin-2, Chinese J. Digestive Diseases, 2, 129-132.
- Henry, J. E. ve Jutila, J. W., 1966. The Isolation of a Polyhedrosis Virus from a Grasshopper, J. Invertebr. Pathol., 8, 417-418.
- Hernandez-Crespo, P., Veyrunes, J. C., Cousserans, F. ve Bergoin, M., 2000. The Spheroidin of an Entomopoxvirus Isolated from the Grasshopper *Anacridium aegyptium* (AaEPV) Shows Low Homology with Spheroidins from Lepidopteran or Coleopteran EPVs, Virus Research, 203-213.
- Hurpin, B. ve Vago, C., 1963. Une Maladie a Inclusions Cytoplasmiques Fusiformes Chez le Coleoptere *Melolontha melolontha* (L.), Rev. Pathol. Veg. Entomol. Agric., 42, 115.
- Ignoffo, C. M., 1973. Development of a Viral Insecticide: Concept to Commercialization, Exp. Parasitol., 33, 380-406.
- Ignoffo, C. M., 1974. Microbial Control of Insects: Viral Pathogens, In: Proceedings of the Summer Institute on Biological Control of Plants Insects and Diseases. Maxwell, F. G., Harris, F. A. (Eds.), Jackson: Univ. Mississippi, 541-557.
- Katagiri, K., Kushida, T., Kasuga, S. ve Ohaba, M., 1975. An Entomopoxvirus Disease of the Cupreous Chafer, *Anomala cuprea* (Hope), Jpn. J. Appl. Zool., 19, 243.
- Keddie, A. ve Erlanson, M., 1995. Characterization of a Nuclear Polyhedrosis Virus from the Forest Tent Caterpillar, *Malacosoma disstria*, J. Invertebr. Pathol., 65, 43-47.
- Kılıç, O., 1994. Fındıkta Dönüm Noktası. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı Dergisi, Tarım ve Köy, Sayı: 97, 38-40.

- King, L. A., Wilkinson, N., Miller, D. P. ve Marlow, S. A., 1998. Entomopoxvirus Chapter 1, In: *The Insect Viruses*, Miller, L. K. and Andrew Ball, L. (Eds.), Plenum Publishing Corporation, New York, 1-25.
- Krieg, A., 1955. Untersuchungen über die Polyedrose von *Neodiprion sertifer* (Geoffr.), Arch. Ges. Virusforsch., 6, 163-174.
- Krieg, A., 1968. Grundlagen der Insektenpathologie, Wissenschaftliche Forschungsberichte, Steinkopf Verlag, Darmstadt, 304.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature (London), 227, 680-685.
- Levin, D. B., Adachi, D., Williams, L. L. ve Myles, T. G., 1993. Host Specificity and Molecular Characterization of the Entomopoxvirus of the Lesser Migratory Grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*, J. Invertebr. Pathol., 62, 241-247.
- Lipa, J. J., 1975. An Outline of Insect Pathology, Warsaw, Poland.
- Lipa, J. J. ve Bartkowski, J., 1972. A Newly Discovered Poxlike Virus Disease of Dung Beetle, *Geotrupes silvaticus*, J. Invertebr. Pathol., 20, 218.
- Liu, G., 1939. Some Extracts from the History of Entomology in China, Psyche, 46, 23-28.
- Lodos, N., 1995. Türkiye Entomolojisi IV, E. Ü. Ziraat Fakültesi Ofset Atelyesi, Bornova, İzmir.
- Martens, J. W. M., Gonee, G., Zuidema, D., van Lent, J. W. M., Visser, B. ve Vlak, J. M., 1990. Insecticidal Activity of a Bacterial Crystal Protein Expressed by Recombinant Baculovirus in Insect Cells, Appl. Environ. Microbiol., 56, 2764-2770.
- Martignoni, M. E. ve Iwai, P. J., 1986. A Catalogue of Viral Diseases of Insects, Mites, and Ticks. USDA Forest Service, Pacific Northwest Research Station, Portland, OR, General Technical Report PNW-195, 4th Ed., 51.
- McGuire, M. R., Streett, D. A. ve Shasha, B. S., 1991. Evaluation of Starch-Encapsulation for Formulation of Grasshopper (Orthoptera: Acrididae) Entomopoxviruses, J. Econ. Entomol., 84, 1652-1656.
- Miller, L. K. ve Andrew Ball, L., 1998. *The Insect Viruses*, Plenum Publishing Corporation, New York.
- Mohamed, M. A., Coppel, H. C. ve Podgwaite, J. D., 1982. Persistence in Soil and on Foliage of Nucleopolyhedrosis Virus of the European Pine Sawfly, *Neodiprion sertifer* (Hymenoptera: iprionidae), Environ. Entomol., 11, 5, 1116-1118.
- Olofson, E., 1988. Environmental Persistence of the European Pine Sawfly in Relation to Epizootics in Swedish Scots Pine Forests, J. Invertebr. Pathol., 52, 119-129.

- Oma, E. A. ve Henry, J. E., 1986. Host Relationships of Entomopox-Viruses Isolated from Grasshoppers. In: Grasshopper Symposium Proceedings, March 1986, Bismarck, ND. Fargo, ND: North Dakota Extension Service, North Dakota State University, 48-49.
- Payne, C. A., 1988. Pathogens for the Control of Insects: Where Next? Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B 318, 225-248.
- Peter, G., 1984. Plant Pests and Their Control, Fenemore, London.
- Poinar, G. O., 1978. Identification of the Groups of Insect Pathogens, Plenum Press, New York.
- Radek, R. ve Fabel, P., 2000. A New Entomopoxvirus from a Cockroach: Light and Electron Microscopy, J. Invertebr. Pathol., 75,19-27.
- Sanz, P., Veyrunes, J. C., Cousserans, F. ve Bergoin, M., 1994. Cloning and Sequencing Gene, the Occlusion Body Major Polypeptide of the *Melolontha melolontha* Entomopoxvirus (MmEPV), Virology, 202, 449-457.
- Sezen, K. ve Demirbağ, Z., 1999. Isolation and Insecticidal Activity of Some Bacteria From The Hazelnut Beetle (*Balaninus nucum* L.), Appl. Entomol. Zool., 34, 85-89.
- Smith, R. F. ve Bosch, R., 1967. Integrated Control. In: Pest Control; Biological, Physical and Selected Chemical Methods, Kilgore, W. W. and Douth, R. L. (Eds.), Academic Press, New York-London, 295-34.
- Steinhaus, E. A., 1956. Microbial Control: The Emergence of an Idea, J. Agriculture Sci., 26, 107-160.
- Sweetman, H. L., 1973. The Principles of Biological Control, WM. C. Brown Company, Dubuque, Iowa, XI.
- T. C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, 1995a. Zirai Mücadele Teknik Talimatları, Cilt-3, Ankara.
- T. C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, 1995b. Zirai Mücadele Teknik Talimatları, Cilt-4, Ankara.
- Tuncer, C. ve Ecevit, O., 1996. Fındık Zararlıları ile Mücadelede Entegre Model Tasarımı. Fındık ve Diğer Sert Kabuklu Meyveler Sempozyumu, 10-11 Ocak 1996 Samsun, Bildiri Kitabı, 40-54.
- Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M. ve Bishop, D. H. L., 2000. Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, San Diego.
- Vago, C., 1963. A New Type of Insect Virus, J. Insect Pathol., 6, 275-276.

- Vago, C., Monsarrat, P., Duthoit, J. L., Amargier, A., Meynadier, G. ve Van-Waerebeke, D., 1968. A New Spindle Virosis Observed in the Stag Beetle Coleoptera of Madagascar Lepidoptera *Scarabeidea figulus*, C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. 266, 1621.
- Vago, C., Robert, P., Amargier, A. ve Duthoit, J. L., 1969. Nouvelle Virose a Spheroides et a Fuseaux Observee Chez le Coleoptere *Phyllopertha horticola* L., Mikroskopie, 25, 378.
- Volkman, L. E., Blissard, G. W., Friesen, P., Keddie, B. A., Possee, R. ve Theilmann, D. A. 1995. Family *Baculoviridae*. In: Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. and Summers, M. D. (Eds.), Vienna & New York: Springer-Verlag. pp. 104-113.
- Ward, V. K., Fleming, S. B. ve Kalkmakoff, J., 1987. Comparison of a DNA-DNA Dot-Blot Hybridisation Assay with Light Microscopy and Radioimmuno Assay for the Detection of a Nuclear Polyhedrosis Virus, J. Virological Methods, 15, 65-73.
- Weeden, C. R., Shelton, A. M., Li, Y. ve Hoffmann, M. P., 2003. Biological Control, A Guide to Natural Enemies in North America, (<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/baculoviruses.html>), 27.05.2003.
- Wegensteiner, R. ve Weiser, J., 1995. A New Entomopoxvirus in The Bark Beetle *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae), J. Invertebr. Pathol., 65, 203-205.
- Yaşaroğlu, B., 2000. Her Yöntüyle Fındık, Kişisel Bilgi, Fiskobirlik Genel Müdürlüğü, Giresun.

ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Trabzon'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Trabzon'da tamamladıktan sonra 1990-1991 öğretim yılında K.T.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Lisans öğrenimine başladı. 1994 yılında bu bölümden biyolog ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl hem Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine hem de Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevliliğine başladı. 1998 yılında yüksek lisans eğitimini tamamlayarak, aynı yıl doktora eğitimine başladı. Halen K.T.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmalarına devam etmektedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.

