

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***LOBESIA BOTRANA*'NİN BAKTERİYAL FLORASININ VE VİRAL
PATOJENLERİNİN BELİRLENMESİ VE ETKİLİ BİR MİKROBİYAL
MÜCADELE MATERYALİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Lida MOHAMMAD GHOLIZAD

ŞUBAT 2014

TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***LOBESIA BOTRANA*'NİN BAKTERİYAL FLORASININ VE VİRAL
PATOJENLERİNİN BELİRLENMESİ VE ETKİLİ BİR MİKROBİYAL
MÜCADELE MATERYALİNİN ARAŞTIRILMASI**

Lida MOHAMMAD GHOLIZAD

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

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 20. 01. 2014
Tezin Savunma Tarihi :17. 02. 2014**

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Trabzon 2014

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalında

Lida MOHAMMAD GHOLIZAD tarafından hazırlanan

***LOBESIA BOTRANA*'NİN BAKTERİYAL FLORASININ VE VİRAL
PATOJENLERİNİN BELİRLENMESİ VE ETKİLİ BİR MİKROBİYAL
MÜCADELE MATERYALİNİN ARAŞTIRILMASI**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 28/12/2013 gün ve 1539 sayılı kararıyla
oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Mahmut EROĞLU

Üye : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Üye : Prof. Dr. Dilek BALIK

Üye : Doç. Dr. İsmail DEMİR

Üye : Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU

Prof. Dr. Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

"*Lobesia botrana*'nın bakteriyal florasının ve viral patojenlerinin belirlenmesi ve etkili bir mikrobiyal mücadele materyalinin araştırılması" başlıklı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda 'Doktora Tezi' olarak hazırlanmıştır.

Doktora tez konusunu belirleyen, çalışmalarım sırasında karşılaştığım güçlüklerin aşılmasında beni yönlendiren, her türlü desteği ve imkanı sağlayarak değerli bilgilerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın çeşitli aşamalarında tezin değerlendirilmesi ve geliştirilmesinde yardımcı olan değerli jüri üyeleri hocalarıma, her türlü yardımı gördüğüm sayın hocalarım Prof. Dr. Mahmut EROĞLU'na ve Doç. Dr. İsmail DEMİR'e, tezimin her aşamasında desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU'na, arazi çalışmaları, böcek örneklerinin toplanmasında ve istatistik analizlerde yardımcı olan Doktor Ali HAMZEZADEH'ye ve Mikrobiyolog Farzad HEYDARI'ye sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında göstermiş oldukları ilgiden ötürü Prof. Dr. Kazım SEZEN, Yrd. Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU, Biyolog Emine SÖNMEZ ve beni yalnız bırakmayan ve hiçbir zaman benden yardımlarını esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Son olarak, manevi desteklerini daima üzerimde hissettiğim, beni yetiştiren ve bugün olduğum yerde olmamda sonsuz katkıları olan annem, babam ve yoğun çalışma dönemlerimin her anında her konuda yanımda olan tek varlığım, kızım Asal HOJJATI'ye minnet ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Lida MOHAMMAD GHOLIZAD
Trabzon 2014

TEZ BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “*Lobesia botrana*’nın Bakteriyal Florasının ve Viral Patojenlerinin Belirlenmesi ve Etkili Bir Mikrobiyal M¼cadele Materyalinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’ın sorumluluğunda tamamladığımı, örnekleri kendim topladığımı, deneyleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma s¼recinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her t¼rl¼ yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.
20/01/2014

Lida MOHAMMAD GHOLIZAD

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	V
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÖZET	IX
SUMMARY	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER DİZİNİ	XIV
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Üzüm Bitkisinin Özellikleri.....	2
1.2.1. Üzüm'ün Ekonomik Önemi.....	3
1.2.2. Önemli Üzüm Zararlıları ve Etkileri.....	5
1.3. Üzüm Salkım Güvesi; <i>Lobesia botrana</i> (Lep.:Tortricidae).....	11
1.3.1. Üzüm Salkım Güvesi ile Mücadele Teknikleri.....	16
1.4. Biyolojik Mücadele.....	17
1.4.1. Biyolojik Mücadelede Materyalleri	18
1.4.1.1. Parazitoid ve Predatörler.....	18
1.4.1.2. Feromon ve Diğer İşaret Molekülleri	18
1.4.1.3. Bitkisel Insektistler	18
1.4.1.4. Böcek Büyüme Düzenleyicileri	19
1.4.1.5. Mikrobiyal Mücadele Etmenleri	19
1.4.1.5.1. Bakteriler	19
1.4.1.5.2. Funguslar	20
1.4.1.5.3. Nematodlar	21
1.4.1.5.4. Protozoanlar.....	22
1.4.1.5.5. Virüsler.....	22
1.5. Tezin Amacı.....	24
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	25

2.1.	Üzüm Salkım Güvesi Larvalarının Toplanması ve Test Örneklerinin Hazırlanması.....	25
2.2.	Bakteri İzolasyonu, Saf Kültürlerinin Hazırlanması ve Stoklanması	26
2.2.1.	Bakteriyal İzolatların Tanımlanmaları	27
2.2.1.1	İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	27
2.2.1.1.1	Koloni Morfolojilerinin Belirlenmesi	27
2.2.1.1.2.	Gram Boyama.....	27
2.2.1.1.3.	Endospor Boyama	27
2.2.1.1.4.	Hareket Testleri.....	27
2.2.2	Bakteriyal İzolatların Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	28
2.2.2.1.	Büyüme pH Aralıklarının Belirlenmesi	28
2.2.2.2.	NaCl Toleranslarının Belirlenmesi	28
2.2.3.	Bakteriyal İzolatların Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	28
2.2.3.1.	Oksidaz Testi	28
2.2.3.2.	Katalaz Testleri	29
2.2.3.3.	MacConkey Agarda Büyüme Testleri	30
2.2.4.	Bakteriyel İzolatların Biyokimyasal İdentifikasyon Sistemleri	30
2.2.4.1	API Test Kitleri ile Bakteriyel İzolatların Tanımlanması.....	30
2.2.4.2	VITEK-2 Testi	31
2.2.5.	Bakteriyel İzolatların Moleküler Yöntem ile Aydınlatılması	32
2.2.5.1.	Genomik DNA İzolasyonu	32
2.2.5.2.	16S rRNA Genlerinin PCR ile Çoğaltılması ve Dizin Analizi	33
2.2.5.3.	Filogenetik Analiz.....	33
2.3.	<i>Lobesia botrana</i> 'dan Virüslerin Araştırılması	34
2.3.1.	Işık Mikroskobu ile Virüslerin Araştırılması	34
2.3.2.	Direk Dokudan Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Virüs Varlığının Belirlenmesi	34
2.4.	İnsektisidal Aktivite Testleri.....	36
2.4.1.	<i>Lobesia botrana</i> 'dan İzole Edilen Bakteriyel İzolatların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi	36
2.4.2.	Farklı Zararlılardan İzole Edilen <i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatlarının İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi	38

2.4.3.	Farklı Zararlılarından İzole Edilen Fungus İzolatlarının İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi	39
2.4.4	Farklı Zararlılarından İzole Edilen Virüslerin İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi	39
2.4.5	İnsektisidal Aktivite Sonuçlarının İstatistiksel Analizleri	40
3.	BULGULAR.....	41
3.1.	<i>Lobesia botrana</i> 'nın Doğadan Toplanması	41
3.2.	<i>Lobesia botrana</i> Larvalarının Bakteriyal Florası.....	42
3.2.1.	Bakteriyal İzolatların Karakterizasyonu	42
3.2.1.1.	Bakteriyal İzolatların Morfolojik Özellikleri	42
3.2.1.2.	Bakteriyal İzolatların Fizyolojik Özellikleri	43
3.2.1.3.	Bakteriyal İzolatların Biyokimyasal ve Metabolik Özellikleri	44
3.2.1.3.1.	Bakteriyal İzolatların API20E Panel Test Sistemi ile Tespit Edilen Özellikleri	44
3.2.1.3.2.	Bakteriyal İzolatların API 50 CH Panel Test Sistemiyle Tespit Edilen Özellikleri	44
3.2.1.4.	İzolatların Moleküler Özellikleri	51
3.2.1.4.1.	Bakteriyal İzolatların 16S rRNA Gen Dizileri	51
3.2.1.4.2.	Taksonomik Karakterizasyon.....	54
3.3.	<i>Lobesia botrana</i> Larvalarının Virüs Araştırmaları Sonucu	55
3.4.	Mikrobiyal İzolatların <i>Lobesia botrana</i> Üzerindeki İnsektisidal Etkileri.....	56
3.4.1.	<i>Lobesia botrana</i> 'dan İzole Edilen Bakteri İzolatlarının İnsektisidal Etkileri.....	56
3.4.2.	Diğer Zararlılardan İzole Edilen Entomopatojen Bakterilerin <i>Lobesia botrana</i> Larvaları Üzerindeki İnsektisidal Etkileri	57
3.4.3.	Diğer Kaynaklardan Elde Edilen Entomopatojen Fungusların <i>Lobesia botrana</i> Larvaları Üzerindeki İnsektisidal Etkileri	61
3.4.4.	Bazı Entomopatojen Virüslerin <i>Lobesia botrana</i> Larvaları Üzerindeki İnsektisidal Etkileri	66
4.	TARTIŞMA	69
5.	SONUÇLAR.....	78
6.	ÖNERİLER.....	80
7.	KAYNAKLAR	81

8.	EKLER.....	89
	ÖZGEÇMİŞ	

Doktora Tezi

ÖZET

**LOBESIA BOTRANA’NIN BAKTERİYAL FLORASININ VE VİRAL PATOJENLERİNİN
BELİRLENMESİ VE ETKİLİ BİR MİKROBİYAL MÜCADELE MATERYALİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Lida MOHAMMAD GHOLIZAD

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ
2014, 88 Sayfa, 9 Ek Sayfa

Üzüm salkım güvesi *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae) üzüm bağlarının ana zararlısı olan böceklerden biridir. Bu çalışmanın amacı *L. botrana*’nın kültüre edilebilir bakteriyal florasını ve virüs patojenlerini belirlemek ve çeşitli entomopatojenlerin bu böcek üzerinde insektisidal etkilerini test ederek bu zararlı için daha güvenilir ve etkili bir mikrobiyal mücadele etmeni keşfetmektir. Toplanan böceklerden kültür edilebilir bakteriler izole edildi ve virüs taraması gerçekleştirildi. Bu bakteriler ve çeşitli entomopatojenlerin (2 adet *Bacillus thuringiensis*, 12 adet fungus ve 4 adet virus) insektisidal aktiviteleri larvalar üzerinde test edildi. *L. botrana*’nın bakteriyal florası *Enterococcus faecalis* (Lb4), *Klebsiella pneumonia* (Lb6), *Enterobacter ludwigii* (Lb12, Lb17), *Rhodococcus erythropolis* (Lb13), *Enterobacter aerogenes* (Lb15) ve *Serratia marcescens* (Lb21) olarak belirlendi. Yapılan virüs araştırmaları sonucunda zararlıda bir *Chilo iridescent virus* (CIV) enfeksiyonuna rastlanıldı. On günlük insektisidal testler sonunda, Lb21 kodlu izolatın larvalar üzerinde en yüksek öldürücü etkiye (%93, P=0.000) sahip olduğu belirlendi. Test edilen diğer patojenlerden *B. thuringiensis* (MnD, %100), *Metarhizium anisoplia* (Gg-12, %93) ve CIV (%90) ve *L. botrana* larvaları üzerinde en yüksek öldürücü etki gösterdi. Bu bulgular neticesinde, *S. marcescens* (Lb21), *B. thuringiensis* (MnD), *M. anisopliae* (Gg-12) ve *Chilo iridescent virus* (CIV)’ün *L. botrana*’ya karşı güvenli ve etkili bir mikrobiyal mücadele etmeni geliştirme potansiyelinde oldukları belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Lobesia botrana*; *Serratia marcescens*, *Bacillus thuringiensis*; *Metarhizium anisopliae*; *Iridovirus*; mikrobiyal mücadele.

PhD. Thesis

SUMMARY

DETERMINATION OF BACTERIAL FLORA AND VIRAL PATHOGENS OF *LOBESIA BOTRANA* AND INVESTIGATION OF AN EFFICIENT MICROBIAL CONTROL AGENTS

Lida MOHAMMAD GHOLIZAD

Karadeniz Technical University
Faculty of Science
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ
2014, 88 Pages, 9 Appendix

The european grapevine moth, *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae) is one of the most harmful insect pests of grape species in many countries. The purpose of this study was to determine the culturable bacterial flora and viral pathogens, and to test the insecticidal activity of different entomopathogens in order to find a safer and more effective microbial control agent against *L. botrana*. The bacterial flora of the pest insect was determined. The insecticidal effects of the bacterial isolates and other entomopathogens (2 *Bacillus thuringiensis*, 12 fungus ve 4 virus) on third and fourth instars larvae were studied. The bacterial flora of *L. botrana* was determined as *Enterococcus faecalis* (Lb4), *Klebsiella pneumoniae* (Lb6), *Enterobacter ludwigii* (Lb12, Lb17), *Rhodococcus erythropolis* (Lb13), *Enterobacter aerogenes* (Lb15) and *Serratia marcescens* (Lb21). Also in this study a *Chilo iridescent virus* (CIV) infection was detected. Results showed that the Lb21 isolate has the highest mortality (93%, P=0.000) on larvae within 10 days of inoculation. Insecticidal tests showed that one strain of *B. thuringiensis* (MnD, 100%), *Metarhizium anisopliae* (Gg-12, 93%) and CIV (90%) had the highest insecticidal effect on the larvae of *L. botrana*. The findings indicate that *S. marcescens*, *B. thuringiensis* (MnD), *M. anisopliae* (Gg-12) and *Chilo iridescent virus* (CIV) are suitable candidates to develop as a safe and effective microbial control agent against *L. botrana*.

Key Words: *Lobesia botrana*; *Serratia marcescens*; *Bacillus thuringiensis*; *Metarhizium anisopliae*; *Iridovirus*; microbial control

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Filoksera'nın yaprak formu	6
Şekil 2. Bağ maymuncuğu ergini.....	7
Şekil 3. Bağ maymuncuğu zararı.....	8
Şekil 4. Bağ yaprak uyuzu	9
Şekil 5. Unlu bit ergin ve nimfi	10
Şekil 6. Üzüm salkım güvesinin farklı hayat evreleri.....	12
Şekil 7. Üzüm salkım güvesi larvaları.....	12
Şekil 8. Üzüm salkım güvesinin kış kokonu	12
Şekil 9. Üzüm salkım güvesi (<i>Lobesia botrana</i>)'nin hayat döngüsü.....	13
Şekil 10. Üzüm çiçeğinde üzüm salkım güvesi larvasının ağları	14
Şekil 11. Üzüm salkım güvesinin olgun üzüm tanelerinde oluşturduğu zarar şekli.....	15
Şekil 12. Üzüm salkım güvesinin dünyada yayılışı.....	15
Şekil 13. Üzüm salkım güvesi larvalarının toplaması	25
Şekil 14. Bakteri içeren homojenatın seri seyreltmesi ve yayma ekim	25
Şekil 15. İnsektisidal aktivite testi için hazırlanan deney düzeneği	38
Şekil 16. <i>Lobesia botrana</i> larvalarının oluşturdukları zararlar.....	41
Şekil 17. Bakteriyal izolatların API 20E test sistemi sonuçları.....	44
Şekil 18. Bakteriyal izolatların API 50CHB test sistemi sonuçları	45
Şekil 19. <i>Lobesia botrana</i> 'dan elde edilen bakteriyel izolatların PCR ile çoğaltılan 16S rRNA gen dizileri	52
Şekil 20. Bakteriyal izolatların filogenetik analizi	54
Şekil 21. <i>Lobesia botrana</i> 'da doku PCR sonucu	55
Şekil 22. PCR ile çoğaltılan <i>mcp</i> geni	56

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. En çok üzüm üreten ülkeler	4
Tablo 2. Önemli üzüm zararlıları, etkileri ve mücadele yöntemleri	5
Tablo 3. Virüs taraması için kullanılan primerlerin özellikleri	35
Tablo 4. İnsektisidal aktivite testlerinde kullanılan entomopatojenler ve referansları	37
Tablo 5. <i>Lobesia botrana</i> larvalarından elde edilen bakteriyal izolatların morfolojik özellikleri.....	43
Tablo 6. <i>Lobesia botrana</i> larvalarından elde edilen bakteriyal izolatların fizyolojik özellikleri	44
Tablo 7. İzolatların API20E panel test sistemi ile belirlenen özellikleri	46
Tablo 8. İzolatların API50CH panel test sistemi ile belirlenen özellikleri	47
Tablo 9. Gram olumlu sporsuz izolatların VITEK-2 test sonuçları.....	49
Tablo 10. Gram olumsuz izolatların VITEK-2 sonuçları	50
Tablo 11. <i>Lobesia botrana</i> 'dan elde edilmiş bakteriyel izolatların 16S rRNA gen dizinlerine göre gen bankasındaki diğer bakteriler ile benzerlikleri	52
Tablo 12. Bakterilerin <i>L. botrana</i> üzerindeki insektisidal etkileri.....	57
Tablo 13. <i>L. Botrana</i> 'dan izole edilen bakterilerin <i>L. botrana</i> üzerindeki insektisidal etkilerinin çift karşılaştırması.....	59
Tablo 14. Bakterilerden etkilenen <i>L. botrana</i> larvaları'nın 10 günlük çalışma dönemindeki canlılıkları	60
Tablo 15. Fungusların <i>L. botrana</i> üzerindeki insektisidal etkileri.....	62
Tablo 16. Fungusların <i>L. botrana</i> üzerindeki insektisidal etkilerinin çift karşılaştırması.....	63
Tablo 17. Fungusların etkilenen <i>L. botrana</i> larvaları'nın 10 günlük çalışma dönemindeki canlılıkları	64
Tablo 18. Virüslerin <i>L. botrana</i> üzerindeki insektisidal etkileri.....	66

Tablo 19. Virüslerin <i>L. botrana</i> üzerindeki insektisidal etkilerinin çift karşılaştırması.....	67
Tablo 20. Virüslerden etkilenen <i>L. botrana</i> larvaları'nın 10 günlük çalışma dönemindeki canlılıkları	67

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

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

SOR : Sorbitol

TDA : Triptofan deaminaz

URE : Üre

VP : Voges proskauer

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Böcekler, eklem bacaklılar (Arthropoda) şubesinin Insecta sınıfına ait omurgasız organizmalar olup en kalabalık hayvan grubunu oluştururlar. Bir milyondan fazla olan tür sayılarıyla dünyadaki en fazla ve en çeşitli türe sahip canlılardır. Dünyanın hemen her yerinde bulunur ve bazen çok yoğun popülasyonlarda görülebilirler. Toplam tür sayısının 2.000.000 olduğu kabul edilmektedir. Tür, cins, familya gibi taksonomik kategoriler bakımından sayıları 6-10 milyon arası bir rakama (Chapman, 2006) ulaşır ve dünyadaki hayvanların %90 kadarını oluştururlar (Erwin, Terry L., 1982).

İnsanlar tarafından evcilleştirilen bal arısı ve ipek böceği gibi türleri bulunduğu gibi, bazı türleri de dünyanın çeşitli yerlerinde özellikle de Meksika'da doğrudan besin olarak kullanılmaktadır. Tanımlanmış böcek türleri içerisinde insanlara ve bitkilere zararlı olan böcek türü sayısı yaklaşık 8.000 civarındadır (Gullan ve Martin, 2009).

Türkiye'de yetiştirilen kültür bitkilerinde ekonomik olarak zarara neden olan toplam 506 hastalık etmeni, zararlı ve yabancı ot bulunmaktadır. Bunlarla gerekli mücadele çalışmaları yapılmadığında ürün kaybı ortalama %35 dolaylarında olmaktadır. Bu kaybın kültür bitkisine, zararının tür ve yoğunluğuna bağlı olarak bazen %100'lere ulaşabilmesi mümkündür. Bitkisel üretimde ekonomik yönden oldukça büyük rakamlara ulaşan bu kayıpların önlenmesi için bitki koruma çalışmalarına yeterli önemi vermek gerekmektedir. Söz konusu çalışmaların insan sağlığı, agroekosistem, çevre ve biyolojik dengenin korunarak sürdürülebilir tarımsal üretim tekniklerine uygun yapılması zorunluluk haline gelmiştir (URL1).

Tarımsal ürünlerin korunması için kullanılan pestisit, insektisit, fungusit ve herbisitlerin uzun veya kısa vadede çevreye ve diğer canlılara verdiği zararlar uzun zamandan beri tartışma konusudur. Fakat mantar, böcek, bakteri, virus ve diğer canlılar tarafından meydana getirilen hastalıklar da önemli ürün kaybına sebep olmaktadır. Pestisitlerin kullanımı her ne kadar ürün miktarını artırsa da bu kimyasal maddelerin kalıntılarında bitkilerden insanlara kadar doğada her yerde rastlanması mümkündür (Smith, 1996).

Tarım ve Köy işleri Bakanlığının belirlediği strateji Türkiye’de yıllık olarak kullanılan pestisit miktarının azaltılmasını ve kullanılan miktarın da doğru kullanımını öngörmektedir. Bunu sağlamak için, kimyasal mücadeleye alternatif olan biyolojik mücadele, biyoteknik yöntemler, dayanıklı çeşitler, kültürel tedbirler, mekanik ve fiziksel mücadele metotlarına ve Entegre Mücadele Programlarının yaygınlaştırılmasına öncelik verilmektedir. Hastalık, zararlı ve yabancı otların mücadelesinde kullanılan bitki koruma ürünlerinin yanlış kullanılması, bitkilerde fitotoksisite, etkisizlik, tarımsal ürünlerde kalıntı ve iç ve dış pazarlarda problemlerin yaşanmasına sebep olabilmektedir (URL1).

Bilindiği gibi bitkiler başta olmak üzere hayvan ve insanlara değişik yollarla zarar veren organizmalara karşı kullanılan ilaçlar, insan ve hayvan sağlığının tehdit edilmesi, gıda maddelerinde kalıntıların oluşması, doğal düşmanların ve yaban hayatın öldürülmesiyle doğal dengenin bozulması, ana zararlı olmayan bazı potansiyel zararlıların ana zararlı durumuna geçmesi, kültür bitkilerinde fitotoksitete neden olması, sık ve gereksiz ilaçlamalarla mücadele masrafının artması ve hava-su-toprak kirlenmesi gibi birçok olumsuzlukları ortaya çıkarmaktadır. Bu olumsuzlukları gidermek veya en aza indirmek için de kimyasal savaşıma alternatif çağdaş, çevre dostu yöntemlere geçilmekte ve bunların da en başında “Biyolojik Mücadele” gelmektedir (URL2).

1.2. Üzüm Bitkisinin Özellikleri

Üzüm (*Vitis vinifera* L.) asmağiller (Vitaceae) familyasının *Vitis* cinsine ait sarılgan bir bitki olup, yeryüzünde kültürü yapılan en eski meyve türlerinden biridir (URL3). Sistematığı şu şekildedir;

Alem	: Plantea
Bölüm	: Magnoliophyta
Sınıf	: Magnoliopsida
Takım	: Vitales
Familya	: Vitaceae
Cins	: <i>Vitis</i>

Üzüm, 3.000'den fazla renk ve tadıyla taze ve kuru olarak yiyebileceğimiz en yaygın ve sevilen meyvelerden biridir. Üzümün; anti-oksidan, anti-aging, kan yapımına yardımcı ve kanserden koruyucu etkileri bilinmektedir. Siyah üzüm kabuğunda bulunan 'resveratrol' maddesi, anti-kanserojen ve anti-oksidan olma özelliklerini taşımakta ve beyin hücrelerini korumaktadır. Üzümün çekirdeğindeki diğer bir madde olan 'Quersetin' ise, kan yapımına yardımcı olmaktadır. Bu yolla damarların sağlığını da olumlu yönde etkilemektedir (URL4).

Üzümün güçlü özelliği, E vitamininden 50, C vitamininden ise 30 kat daha fazladır. Üzüm sırasında, su (%70-80), karbonhidratlar (%15-25), organik asitler (%0.3-1.5), tanenler (%0.01-0.10), azotlu bileşikler (%0.03-0.17) ve mineral bileşikler (%0.3-0.5) bulunmaktadır (URL4).

1.2.1. Üzümün Ekonomik Önemi

Türkiye ve İran, iklim koşulları bakımından bağcılık için dünyanın en uygun yetiştirme bölgelerine sahip olan ve köklü bir bağcılık kültürü bulunan ülkelerdir (Tablo 1). Türkiye asmanın gen merkezi olmasının yanı sıra son derece eski ve köklü bir bağcılık kültürüne de sahiptir. Anadolu'da bağcılık kültürünün tarihi oldukça eskidir. Yapılan arkeolojik kazılardan Anadolu'da bağcılık kültürünün M.Ö. 3500 yılına kadar dayandığı saptanmıştır. Türkiye'nin değişik yörelerinden arkeolojik kazılardan çıkarılan tarihi eserlerde üzümle ilgili şekil ve kabartmaların yer alması, o yörede bağcılık kültürünün yaygın olduğuna işaret eden en önemli göstergelerdir. Gerçekten Türkiye'de her bölgede yapılan kazılarda bağcılıkla ilgili tarih öncesi devirlere ait önemli eserler bulunmuştur.

Arkeolojik buluntulardan Anadolu'da Hititler zamanında asma ve şarabın büyük önem taşıdığı, M.Ö. 1800-1550 yıllarında bağcılığın çok gelişmiş olduğu, dini merasimlerde ve sosyal yaşantıda üzüm ve şarabın tanrılara adak olarak sunulduğu kaydedilmektedir. Hititler, bağ ve bahçelerini korumak için bugünkü anlayışa uygun tarım yasalarını da uygulamışlardır. Yozgat Alişar'da elde edilen kazılardan M.Ö. 1800-1600 yıllarına ait üzüm salkımı şeklinde şarap ve içki kabı bulunmuştur. Bütün bunlara ek olarak Çorum Alacahöyük'de kral mezarlarından M.Ö. 2300 yıllarına ait altın şarap bardağı ile şarap testisi bulunmuştur. Ege ve Marmara bölgelerinde bağcılığın geliştiği yörelerde (Lapseki, Çanakkale, Bergama, Aliğa ve

Dikili, Bozcaada, Çeşme, Karaburun ve Seferihisar) basılan paralar üzerinde üzüm, şarap kabına ve Amfora yer verilmiş olması bağıcılığa ve şaraba verilen önemi göstermektedir (URL5).

Diğer meyvelerle kıyaslandığında en fazla çeşide sahip olan türlerden biri olan üzümün 15.000'in üzerinde çeşidi olduğu tahmin edilmektedir. Anavatanı Anadolu olan çeşitler 1.200'ün üzerindedir. Bu çeşitlerden oluşturulmuş Milli Koleksiyon Bağı Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü'nde bulunmaktadır. Bunların 50-60 kadarının ekonomik üretimi yapılmaktadır (URL3).

Bağ ve şarap halkın geçiminde ve ticaretle daima önemli bir rol oynamıştır. Elde edilen üzümler çoğunlukla kuru ve yaş olarak tüketilmektedir. Bir kısmı da pekmez, bulamaç, pestil ve lokum şeklinde değerlendirilmektedir.

Türkiye bağ alanı varlığı bakımından 590.000 hektar bağ alanı ile dünyada önde gelen 10 ülke arasında İspanya, İtalya ve Fransa'nın ardından dördüncü, üzüm üretimi bakımından ise İtalya, İspanya, Fransa, ABD ve Çin'in ardından üç milyon 650.000 ton ile altıncı sırada yer almaktadır (Castellucci, 2004; Özdemir ve ark., 2006). İranda ise 306.000 hektar bağ alanı ile ve üzüm üretimi bakımından ise Türkiye'in ardından üç milyon ton ile dünyada yedinci sırada yer almaktadır (URL6, URL7).

Tablo 1. En çok üzüm üretimi yapılan ülkeler ve üretilen üzüm miktarı

Ülke	Üretim (Ton)
İtalya	8,519,418
Çin Halk Cumhuriyeti	6,787,081
Amerika Birleşik Devletleri	6,384,090
Fransa	6,044,900
İspanya	5,995,300
Türkiye	3,612,781
İran	3,000,000
Arjantin	2,900,000
Şili	2,350,000
Hindistan	1,667,700
Toplam	67,221,000

1.2.2. Önemli Üzüm Zararlıları ve Etkileri

Bazı böcekler, kültür bitkilerinde, bitkilerin kök, gövde, yaprak, meyve, sap gibi kısımları ile beslenerek bitkilere zarar verir. Bitkisel ürünlerle doğrudan beslenerek de önemli ürün kayıplarına neden olurlar. Böceklerin büyük bir çoğunluğu yaşayışı gereği insanın gıdasına ortak olur. İnsanlar, ekip diktiklerini değil, hastalık ve zararlılardan arta kalan mahsülü elde etmekte ve bunun bir kısmını da depolarda yine zararlılara kaptırmaktadır. Dünyada üretilen meyve, sebze, tahıl, yaş veya kuru her türlü gıda maddelerinin her yıl yaklaşık %15-20'si böceklerden zarar görmekte ve kullanılmaz hale gelmektedir. Bu zararların ekonomik karşılığı da yılda yaklaşık olarak 7-10 milyar dolar civarındadır (Demirbağ, 2008). Diğer bitkilerde olduğu gibi üzüm zararlıları da üzümde ürün ve kalite kayıplarına neden olmaktadır ve mücadele yapılmadığı durumda, kaybın artması söz konusu olmaktadır. Üzüm bitki ve meyvelerine zarar veren çeşitli böcekler Tablo 2'de verilmektedir. *Lobesia botrana* bu zararlılar arasından en dikkat çeken ciddi üzüm zararlısıdır.

Tablo 2. Önemli üzüm zararlıları, etkileri ve mücadele yöntemleri

Zararlı	Zarar formu	Mücadele yöntemleri
Filoksera (<i>Viteus vitifolii</i>)	Kök ve yaprak	Kültürel önlem, kontrol amaçlı karantina
Bağ maymuncuğu (<i>Otiorrhynchus</i> sp.)	Gözler, filizler ve yapraklar	Kültürel önlem, kimyasal mücadele
Bağ yaprak uyuzu (<i>Eriophyes vitis</i>)	Yapraklar	Kültürel ve kimyasal mücadele
Unlu bit (<i>Planococcus citri</i> , <i>P. ficus</i>)	Salgıladığı yapışkan madde, bitki ve meyve	Kültürel ve kimyasal mücadelede, doğal düşmanlar
Üzüm salkım güvesi (<i>Lobesia botrana</i>)	Tomurcuk, çiçek, koruk ve olgun taneler	Kültürel, biyoteknik kimyasal ve biyolojik mücadele,

Filoksera (*Viteus vitifolii*): Karantina zararlısı olduğu için ülkeye giriş çıkışları denetim altında tutulur. Kök ve yaprakta zarara neden olan iki formu mevcuttur. Kök filokserası yerli asmaların köklerinde, yaprak filokserası ise Amerikan asmalarının yapraklarında zarar yapar. Kök filokserası oval veya armut şeklinde, sarımsı yeşil esmer, kırmızı kahverengine kadar

değişen renklerdedir. Sirtında koyu renkli lekeler vardır. Ağız uzun bir emici hortum şeklindedir. Vücut uzunluğu 0.5-1.3 mm'dir. Kök filokserasının köklerde beslendiği yerlerde emilme sonucu meydana gelen şişkinlikler görülür. Bu şişkinliklerin çürüyüp dağılması ve bu şeklin devamlı tekrarı köklerin görev yapamaz hale gelmesine sebep olur.

Yaprak filokserası ise 1.5-1.7 mm vücut uzunluğunda olup, sarı renkli ve sırt kısmı lekesizdir. Emici hortumu daha kısadır. Yaprak filokserası yeni açılan tomurcuklara girerek taze tomurcuk ve yaprakları emer. Emilme noktalarında yaprak dokusu alt yüze doğru çıkıntılar yapar ve şişkinlikler gelişir (Şekil 1).

Filoksera ile bulaşık olan bağlarda zamanla sürgünlerde genel bir durgunluk, omcada zayıflık, yapraklarda küçülmeler, sararmalar görülür. Boğum araları daralır. Çubuklarodunlaşmadıklarından kışın soğuktan etkilenirler. Ayrıca, salkımlarda tanelerin seyrekleştiği, normal şekerleme ve renklenmenin olmadığı görülür. Omcalar birkaç yıl içinde ağır bir durgunluk göstererek kururlar. Bu tip omcalar bağın içinde kümeler halindedir. Bulaşık yerlerde bu zararlıya dayanıklı Amerikan asma anaçlarının kullanılması önerilmektedir (URL9).



Şekil 1. Filoksera'nın yaprak formu (URL9).

Filoksera ile mücadelede kültürel önlemler olarak Amerikan asma anacı üzerine aşılı çeşitlerin kullanılması ve Filokseralı bölgelerden anaç ve kalem gibi üretim materyallerinin alınmaması tavsiye edilmektedir. Bu zararlı ile kimyasal mücadele yoktur. Koruma amaçlı olarak üretimde kullanılacak materyaller fümige edilebilir. Filokseranın kontrolü ancak karantina önlemleri ve dayanıklı asma anaçlarının kullanılmasıyla mümkündür. Bu nedenle filokseraya dayanıklı anaçların üzerine yerli çeşitlerin aşılmasıyla oluşmuş fidanlarla bağ tesis etmek, filokseradan korunmak için tek yöntemdir.

Bağ maymuncuğu (*Otiorrhynchus* sp.): Maymuncuklar genellikle siyah veya koyu kahverenkli 5-15 mm boyunda böceklerdir. Vücutlarının üzeri yaldızla kaplı veya çizgilidir. Ağız parçaları kısa ve geniş hortum şeklindedir (Şekil 2). Yurdumuzda bölgelere göre zaman zaman yoğun olarak bulunmakla beraber daha ziyade kumsal ve taban yerlerde tesis edilmiş olan bağlarda her yıl ve yer yer görülürler.



Şekil 2. Bağ maymuncuğu ergini (URL9).

Maymuncuk erginleri ilkbaharda gözler uyanmağa başladığı zaman kışladıkları yerden çıkarak kabarmakta olan gözleri, genç aşıları, filizleri daha sonralarıda yaprakları yemek suretiyle zarar yaparlar (Şekil 3). Yoğunlukları fazla olduğunda gözlerin uç kısmından başlayarak taban kısmına kadar tamamen yediklerinden, zarar yaptığı omcalar yeşeremezler. Böyle bir bağa uzaktan bakıldığında don vurmuş bir bağ gibi görünür. Maymuncuklar

gözlerden başka olgun yapraklarla da beslenirler. Yaprakların kenarlarını yarım yuvarlak şekiller meydana getirecek şekilde, damar aralarını genişçe, muntazam sadece yaprak damarları kalacak şekilde yemek suretiyle de zararlı olurlar. Larvalar omcaların kökleri ile beslenirler. Yoğun larva hücumuna uğrayan omcalar kurur veya cılız kalıp verimden düşer. Özellikle yeni kurulmuş bağlardaki zararları önemlidir.

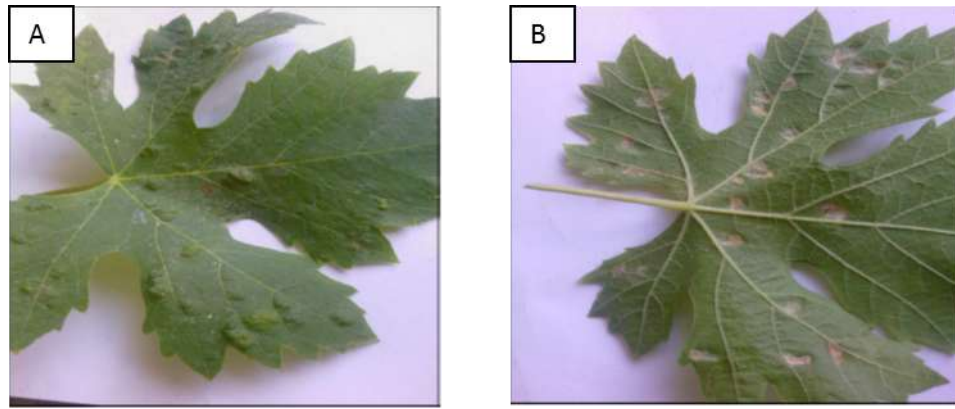


Şekil 3. Bağ maymuncuğu zararı (URL9).

Maymuncuklar kışı ergin halde toprakta, omca kabukları altında, yere düşmüş yapraklar altında geçirirler. İlkbaharda gözler uyanmaya başlarken omcalara tırmanarak kabaran gözleri, daha sonraları yeni çıkan yaprakları yiyerek beslenirler. Gündüzleri omcaların dibinde, toprakta, omcanın yarık ve çatlaklarında, kabuk altında gizlenirler. Geceleri faaliyete geçerler. Yumurtalarını omcaların dibine veya toprak içerisine bırakırlar. 15-20 gün sonra yumurtalardan çıkan larvalar bitki kökleri ile beslenerek gelişirler. Toprak içerisinde yaptıkları odacıklarda pupa olurlar. Pupa dönemleri genel olarak 20-35 gün devam eder. Çıkan erginler asma yapraklarında beslenirler. Yılda 1-1,5 döl verirler. Bitkiyi tamamen kurutarak veya zayıflatarak zarar verir. Mücadelesi için bağın içinde ve çevresinde zararlının kışlayabileceği barınak yerlerinin yok edilmesi ve, bağın otlu bırakılmaması tavsiye edilmektedir. Ayrıca zararlının omcaya yerden sürünerek tırmanması dolayısıyla, omcaların dallarına yapışkan bir macunun çepeçevre sürülmesi halinde, gelen erginler yakalanır ve bunlar kısa aralıklarla yapılan kontrollerde yok edilebilirler. Zararın yoğun olduğu zamanlarda (25 omcada/10 zarar)

kimyasal ilaçlarla mücadele yapılmalıdır. İlaçlamalarda Alphacypermethrin, Carbaryl, Lambda Cyhalothrin ve Parathion methyl etki maddeli ilaçlar tercih edilmelidir.

Bağ yaprak uyuzu (*Eriophyes vitis*): Gözle görülemeyecek kadar küçük bir akar türüdür. Kışı ergin halde korunaklı yerlerde geçirir. Yaprak altlarında özsu emmek suretiyle zarar verirler. Emgi yerlerinde gri renkli küf tabakaları görülür (Şekil 4). Yaprak üst yüzeyinde bu emgi yerlerine denk gelen kısımlarda kabarcıklar oluşur. Zarar sonucunda bitki özümlemeyi tam yapamaz ve ekonomik kayıplara sebebiyet verir.



Şekil 4. Bağ yaprak uyuzu. A) yaprak üst yüzeyi, B) yaprak alt yüzeyi (URL 9)

Bu zararlı ile kültürel mücadele için toprağın işlenmesi, yabancı ot temizliği, budama gibi yöntemler tavsiye edilmektedir. Kimyasal mücadele olarakta belirtilerin görüldüğü dönemlerde ilaçlama yapılır. İlaçlamalarda kükürtlü preparatlar ve endosülfan kullanılır.

Unlu bit (*Planococcus citri*, *P. ficus*): Üzeri un görünümünde olup beyaz renkte görülür. Ergini pembemsi renkte ve üzeri koyu, balmumu gibi bir tabakayla kaplıdır (Şekil 5). Yavaş hareket eden emici böceklerdendir. Ergin dişi oval ve yassı biçimde olup, 3-5 mm uzunluğunda, 2-2.5 mm genişliğindedir. Vücut etrafında 18 adet mum çıkıntısı olup, bunlar kısa ve küt yapıdadır. Abdomenin sonunda bulunan bir çift çıkıntı, diğerlerinden biraz uzuncadır. Erkek sarı veya kırmızımsı kahve renklidir. Bacak ve antenleri açık renkli olup, kanatları şeffaf ve parlaktır.

Koloni halinde kabuklardaki çatlaklarda, kıvrılmış olan yapraklarda, salkımların içinde ve toprakta köklerin üzerinde yaşar. Esas zararı salgıladığı yapışkan bir maddeden

kaynaklanır. Bunlar salkımların görünüşünü bozar, tozların yapışmasına neden olur ve üzümlerin kalitesi düşer. Salkımlarda çürümeler meydana gelir. Salkımları asmanın yaşlı kısımlarına yakın gelişen çeşitlere daha çok zarar verir. Ayrıca erkenci çeşitlerde üzümler yazın yeni yavrular çıkmadan önce olgunlaştığından, geç olgunlaşan çeşitlere göre daha az etkilenirler.



Şekil 5. Unlu bit ergin ve nimfi (URL9).

Bitkinin özsuğunu emerek omcanın zayıflamasına, üründen düşmesine ve sonunda kurumasına neden olur. Çok su tutan taban arazide ve gölgelik yerlerde bağ tesis edilmemelidir. Zorunlu kalındığı takdirde omcalar seyrek dikilmeli ve sürgünler yükseltilmelidir. Bulaşma görülen bağlarda omcaların yaprakları seyreltilmeli, salkımların havalanması temin edilmelidir. Ayrıca kışın budama yapılırken kabuklar soyulup yakılarak zararlı yoğunluğunun azalması sağlanmalıdır.

Unlu bite karşı kültürel mücadelede çok su tutan taban arazilerde bağ kurulması, .seyrek dikim yapılması ve asmalarda iyi bir havalandırmanın oluşturulması tavsiye edilmektedir.

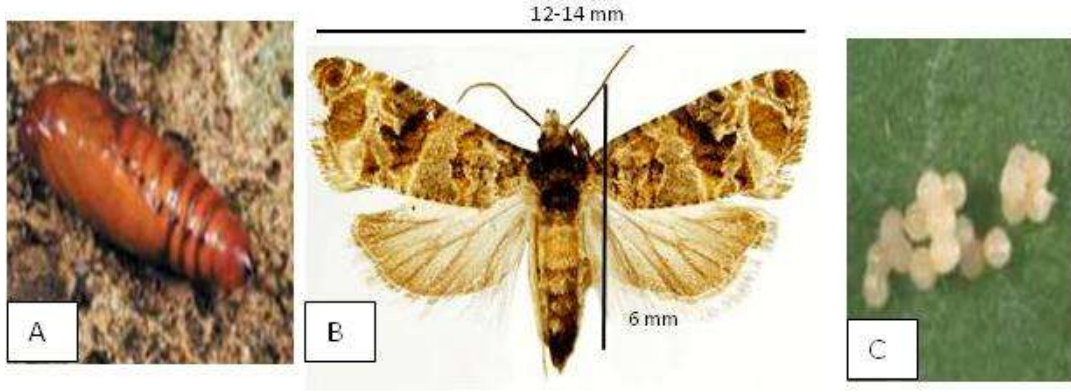
Unlu bite karşı doğal düşmanları vasıtasıyla da biyolojik mücadele yapılabilir. Karıncalar unlu bitleri doğal düşmanlarına karşı korur, bu nedenle öncelikle varsa karıncaların

kontrolü sağlanmalıdır. Ayrıca doğal düşmanlarına zarar vermemek için yalnız böceğin görüldüğü asmalar ilaçlanmalıdır. Eğer kimyasal mücadele gerekiyorsa, doğal düşmanlara yan etkisi en az olan bitki koruma ürünleri tercih edilmelidir.

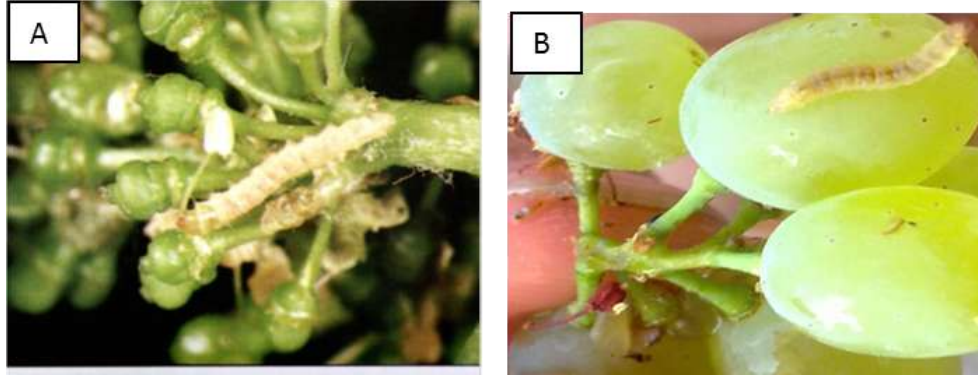
Bağda unlu bite karşı kimyasal mücadelede yapılmaktadır. Bu ilaçlama iki devrede yapılabilir. 1. devre omcanın gövdesinde kabuklarda ıslaklık görülmeye başladığı ve unlu bitin bitkinin yeşil kısımlarına doğru yürümeye başladığı devredir. Bu devrede koruklar tahminen nohut büyüklüğündedir. 2. devre unlu bitin yaprak ve salkımlara geçtiği tanelerin sulanmaya başladığı devredir. İlaçlamalarda Diazinon, Dichlorvos, Parathion methyl v.b. etkili maddeli ilaçlar kullanılmalıdır.

1.3. Üzüm Salkım Güvesi (*Lobesia botrana*, (Lep.: Tortricidae)

Salkım güvesi ergini küçük bir kelebeğdir. Ön kanatların zemini gri renkte, üzeri gri-mavi, kahverengi, kızılımsı sarı ve zeytin yeşili renklerle mozaik gibi süslüdür. Arka kanatlar ise gri renkte açık sarı, mavi parıltılıdır. Etrafi saçaklıdır, erginlerin kanatları gerilmiş olarak 12-14 mm, vücut uzunluğu ise 6 mm'dir. Yumurta 0.7 mm boyunda ve 0.5 mm enindedir. İlk bırakıldığında krem renginde olan yumurtalar sonradan açık mavimsi gri bir renk alır. Şekli yuvarlak ve basıktır. Pupa kahve renginde ve boyu 5-7 mm' dir (Şekil 6). Beyaz bir kokon içinde bulunur. Larva yumurtadan yeni çıktığında yaklaşık 1 mm, olgun larva ise 9-11 mm boyundadır (Şekil 7). Kışı omca kabukları altında ya da diğer korunaklı yerlerde bir kokon içerisinde pupa döneminde geçirir (Şekil 8). İklim koşullarına bağlı olarak genellikle mayıs ayında pupadan çıkan erginler çiftleştikten sonra yumurtalarını çiçek saplarına koyarlar (Uygun, 2010).



Şekil 6. Üzüm salkım güvesinin farklı hayat evreleri. Pupa (A), ergin (B) ve yumurta (C)

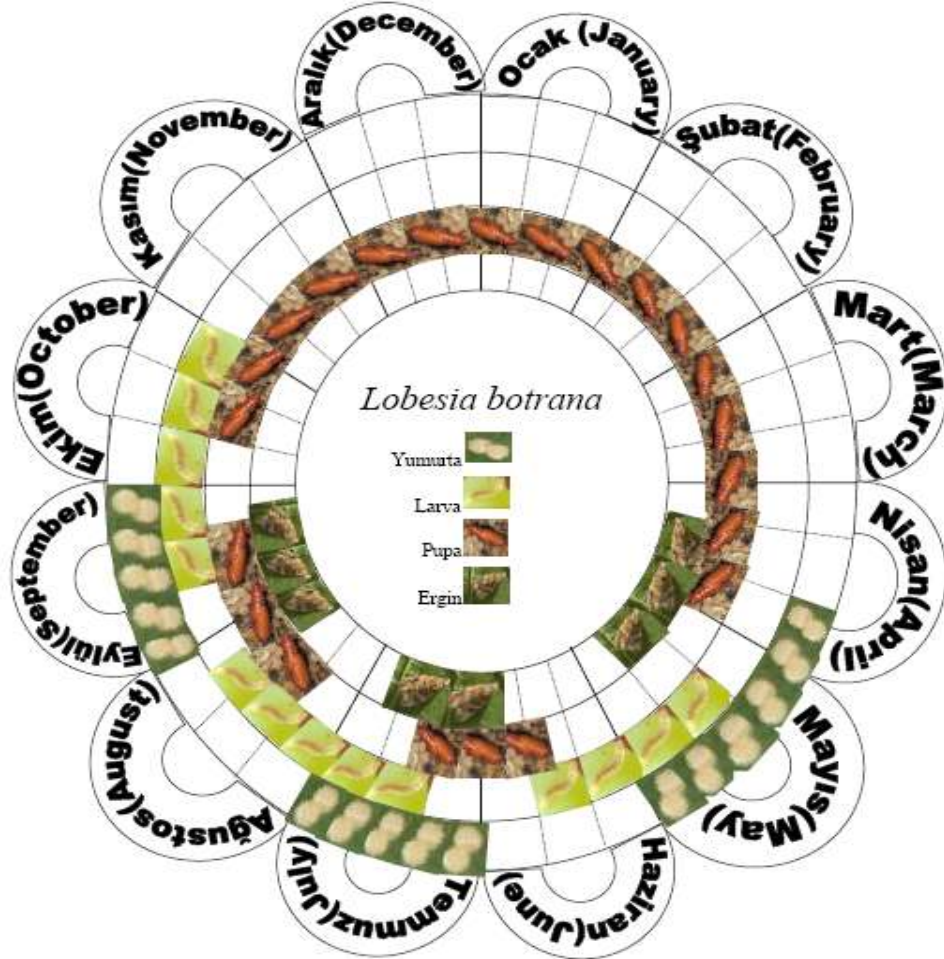


Şekil 7. Üzüm salkım güvesi larvaları. (A) 1. döl larvası ve (B) 3.döl larvası



Şekil 8. Üzüm salkım güvesinin kış kokonu

Erginler gündüzleri omcanın iç kısımlarında hareketsiz durur ve akşamüzeri güneşin batması ile birlikte sıcaklığın 10°C üzerinde olduğu saatlerde harekete geçerler. Uçuş gece yarısına kadar devam eder. Bir dişi ortalama 50-70 adet yumurta bırakır. Yumurta açılma süresi 7-8 gün olup, birinci döl bireyleri gelişmesini çiçek ve tomurcuklarda yaklaşık olarak 35-40 günde tamamlarlar (Uygun, 2010). İkinci döl larvaları koruklarda ve üçüncü döl larvaları da olgun taneleri delip içlerine girerek beslenirler. İklim koşulları çok uygun olduğu için gelişmelerini 25-35 günde tamamlarlar. Genellikle 3 döl verirler ancak bazı yerlerde ve yıllarda döl sayısı 2-4 arasında değişmektedir (Şekil 9).



Şekil 9. Üzüm salkım güvesi (*Lobesia botrana*)'nin hayat döngüsü

Üzüm salkım güvesi doğrudan üründe zarar yapması nedeni ile bağların ana zararlısı olmuştur. Tomurcuk çiçek veya tanede beslenen larva bulunduğu yerden çıkıp hemen yanındakine girerek onun içinde beslenir. Bu şekilde birden fazla taneye zarar verir. Bu arada salgıladığı beyaz renkli ipliklerle taneleri birbirine birleştirir (Şekil 10).



Şekil 10. Üzüm çiçeğinde üzüm salkım güvesi larvasının ağları ve yapışkanlık oluşumu

Olgun üzümde beslenme esnasında tanelerde sulanma başladığı için larva bir tane içinde uzun süre kalmaz ve daha sık yer değiştirir (Şekil 11). Bu arada larvanın girip çıkarken deldiği tanelerden akan şekerli su sayesinde çürüklük meydana getiren mantarların çoğalması sonucu salkımda önemli derecede zarar meydana gelir. Salkım güvesi bu şekilde direkt olarak üründe meydana getirdiği zararla bağların en önemli ve en fazla ekonomik kayıp getiren zararlısıdır. Ayrıca yaş üzüm ihracatında ambalajlamada sorun olarak karşımıza çıkar. Zarar görmüş üzümlerden yapılan şarapların da kalitesi düşük olur.



Şekil 11. Üzüm salkım güvesinin olgun üzüm tanelerinde oluşturduğu zarar şekli

Üzüm salkım güvesi dünyada geniş çapta Avrupa, Orta Asya, Afrika ve son zamanlarda Arjantin, Şili ve Kaliforniyada yayılış göstermektedir (Varela ve ark., 2010) (Şekil 12).



Şekil 12. Üzüm salkım güvesinin dünyada yayılışı. Yayılış alanları kırmızı renk ile gösterilmiş (CIE 1974)

Zararlının doğada çeşitli doğal düşmanları tespit edilmiştir. Bunlar, *Ascogaster* sp., *A.quadridentatus* Wesm., *Bassus cosmicus* Wesm., *Meteorus rubens* Nees (Hymenoptera:

Braconidae), *Dicaelotus* sp., *Thetoscopus hemipterus* Gray, *Pimplacontemplator* Müll (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) ve *Phytomyptera nitidiventris* Rond. (Diptera: Tachinidae)'dir. Ancak, bu organizmaların hiçbiri zararlıyı doğada baskı altında tutamamaktadır. *Bacillus thuringiensis* Berl.'li bakteri preparatları zararlıyı baskı altına almada en önemli biyolojik etmendir (Uygun, 2010).

1.3.1. Üzüm Salkım Güvesi ile Mücadele Teknikleri

Kültürel mücadele: Salkım güvesi larvalarının faaliyeti için sıcaklık ve orantılı nem bakımından omcaların iç ve alt kısımları daha uygun olduğu için salkım güvesi dişi kelebekleri yumurtalarını iç ve alt kısımlardaki salkımların üzerine bırakırlar. Bu nedenle omcayı askıya almak, aralama ve uç almayı omcanın iç kısmını havadar tutacak şekilde yapmak, bağı otlu bırakmamak, kış temizliğine önem vermek zararlının faaliyetini azaltmak bakımından yararlıdır.

Biyoteknik mücadele: Salkım güvesi erginlerinin çıkışına yakın bir zamanda tüm bağ alanı içerisine farklı yerlere çok sayıda feromon tuzakları yerleştirilir ve bu şekilde tüm bağ alanı eşeyssel çekici koku ile doyurulmuş olur. Böylece eşeylerin birbirlerini bulması ve dolayısı ile yumurta bırakması engellenmiş olur.

Biyolojik mücadele: Salkım güvesi'nin birçok doğal düşmanı olmasına rağmen bunların zararlıyı baskı altında tutacak yoğunlukta bulunmaması nedeniyle uygulamaya verilmiş bir yöntem yoktur. Ancak, larvaların beslenmesi yoluyla bünyelerine giren ve ölümlerine yol açan *Bacillus thuringiensis* Berl.'li preparatlar ve pekmez karışımı dört uygulamalı olarak Güney Anadolu Bölgesi bağlarında, iki uygulamalı olarak Orta Anadolu bağlarında kullanılabilir. Ege Bölgesinde *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (30×10^6 canlı spor/mg) (150 g/100 l su) + şeker (1 kg/100 l su) karışımı 1. ve 2. döllerde genellikle bir kez, 3. dölde iklim koşulları ile yumurta kontrollerine göre gerekirse birden fazla sayıda uygulanabilir.

Kimyasal mücadele: Son yıllarda feromon tuzakları ile ilk ergin çıkışı tespit edilerek, en fazla uçuş zamanı, en yoğun yumurta bırakma zamanı, yumurta açılma süreleri ile döl süreleri iklim verilerinden de yararlanarak tahmin edilebilmektedir. Bu tahminler doğrultusunda da tüm döllere karşı en uygun zamanda ilaçlı mücadele tavsiye edilmektedir. Bu amaçla kültürel

mücadelede anlatıldığı gibi, kabukları soyulmuş asmaları katran yağları ile ilaçlamak, zararlıların kışlayan dönemlerinin önemli ölçüde öldürülmesini sağlamaktadır. Yaz aylarında ise bu zararlıya karşı ruhsatlandırılmış ilaçlar ile uygulama yapılır. İlaçlamaya her dölün azami kelebek uçuşundan 5-6 gün sonra başlanır. Uygulamada salkımların iyice ilaçlanmasına dikkat edilmelidir. Ayrıca son ilaçlamada kalıntı problemi de göz önünde bulundularak, ilaçlama ile hasat arasında geçmesi gereken süre dikkate alınarak ilaç seçilmelidir (Anonim, 1995; Uygun, 1996; Erkan ve ark.,1999; URL1). Mücadelesinde *Bacillus thuringiensis* bakterisi ile Fosalone, Karbaryl gibi bileşikler kullanılır (URL8, URL9).

Bilindiği gibi rastgele ve fazla miktarda ilaç kullanımı canlılar arasındaki doğal dengenin bozulması, hastalık etmeni ve zararlıların direnç kazanması, kalıntı ve çevre kirliliği, tarımsal üretim maliyetlerinin artması gibi bir dizi sorunlara neden olmaktadır.

1.4. Zararlılarla Biyolojik Mücadele

Biyolojik mücadelenin geçmişi insanlık tarihi kadar eskidir. Uzun geçmişine rağmen, “Biyolojik mücadele” sözcüğü ilk defa 1919 yılında Kalifornia Üniversitesi’nden Harry Smith tarafından ‘böcek popülasyonlarının tabii veya çeşitli uygulamalarla kontrol altına alınması’ için kullanılmıştır. Bununla birlikte, teknolojik gelişmelerle bu tanım önemli araştırmalara temel oluşturmuştur. DeBach 1964 yılında biyolojik mücadeleyi “hedef organizmanın popülasyonunu kontrol altına alan veya varlığında hedef organizma popülasyonlarında normalden daha fazla azalmaya sebep olan predator, parazit veya patojen organizmalarla yapılan mücadele” olarak tanımlamıştır. Daha sonra biyolojik mücadele, ziraat ve ormancılıkta bitkiler için zararlı olan herhangi bir böceğin tercih edilen bir canlı organizma veya bu organizmaya ait çeşitli ürünler kullanarak kontrol altına alınması olarak ifade edilmiştir (Demirbağ, 2008).

Entomopatojenlerin yakın gelecekte, mikrobiyal mücadele etmeni olarak, sadece fiyat ve etkinlik bakımından değerlendirildiğinde bile kimyasal pestisitlere göre daha kullanışlı olacakları düşünülmektedir. Buna ek olarak, entomopatojenlerin mikrobiyal etmen olarak kullanımları, ekosistemdeki biyolojik çeşitliliğin sürdürülmesi, zararlı türlerin doğal düşmanlarının korunması, besinler üzerinde kalıntı bırakmaması, hedeflenmemiş diğer

organizmalar ve insanlar açısından güvenli olması gibi birçok avantajlara sahiptir (Lacey, 2001).

1.4.1. Biyolojik Mücadelede Materyalleri

Biyolojik mücadele materyallerini parazitoid ve predatörler, feromon ve diğer işaret molekülleri, bitkisel insektisitler, böcek büyüme düzenleyicileri ve mikrobiyal mücadele etmenleri olarak gruplandırmak mümkündür (Demirbağ, 2008).

1.4.1.1. Parazitoid ve Predatörler

Parazit, bir canlının üzerinde veya içerisinde yaşantısını devam ettiren ve üzerinde yaşadığı konukçunun gelişmesini engelleyen organizmalardır. Eğer konağa zarar veren organizma konağın ölümüne sebep olursa bu parazitoid olarak adlandırılır. Doğal düşman kuş, karınca v.s gibi bir hareketli organizma ise predator adını alır (Demirbağ, 2008).

1.4.1.2. Feromon ve Diğer İşaret Molekülleri

Organizmalarda özel davranışsal cevapları harekete geçiren kokulara işaret molekülleri adı verilir. İşaret molekülleri feromonlar, kairomonlar ve diğer davranışsal olarak aktif bileşikler içeren maddelerdir. Feromonlar böcekleri cezbedip yakalanmalarını sağlamak için yıllardır kullanılmaktadır (Demirbağ, 2008). Uçuş aktivitelerinin belirlenmesi pestisit uygulamaları ve diğer uygulamaların yapılabilmesi için uygun zamanların tespit edilmelerine imkan verir.

1.4.1.3. Bitkisel Insektistler

Bitkilerden elde edilen insektisitler dünya çapında kullanılan pestisitlerin sadece küçük bir payını oluşturur. Buna rağmen bunlar, böcek mücadele sisteminde önemli rol oynarlar.

Bitkisel insektistler ya doğal olarak oluşan direkt bitki materyalleri veya bu materyallerden geliştirilen maddelerdir (Demirbağ, 2008).

1.4.1.4. Böcek Büyüme Düzenleyicileri

Böcek büyüme düzenleyicileri böceklerin büyümesinde rol alan hormon ve büyüme maddelerinin benzerleri olup, zararlı böceklerin gelişmelerine engel olurlar. Bu tür maddelerin klasik yöntemler yerine kullanılmalarının asıl sebebi, çevreye karşı fazla toksik olmamaları ve hedef organizma için seçici olmalarından kaynaklanmaktadır (Demirbağ, 2008).

1.4.1.5. Mikrobiyal Mücadele Etmenleri

Biyolojik mücadelede kullanılan mikrobiyal etmenler bakteri, fungus, virüs, protozoa, nematod ve rekombinant tekniklerle geliştirilen etmenleri kapsamaktadır (Peter, 1984; Demirbağ, 2008). Bu mikroorganizmalar kullanılarak yapılan mücadeleye ise ‘Mikrobiyal Mücadele’ denilmektedir. Doğada böceklerin hastalanmasına neden olarak onları öldüren pek çok mikroorganizma mevcuttur (Lipa, 1975). Bu mikroorganizmalar entomopatojen olarak adlandırılır.

Mikrobiyal mücadelede kullanılan entomopatojenlerin büyük bir çoğunluğu konağa spesifik olduğu için sadece mücadelesi yapılmak istenilen organizma üzerinde etkili olur. Bu özelliği ile faydalı ve predatör böcekler, hayvanlar ve insanlar gibi hedef dışı organizmalar üzerinde herhangi bir risk oluşturmazlar. Tamamen doğal olmaları sebebiyle ekosistemde herhangi bir kirliliğe yol açmazlar. Bu özellikleri, gelecekte kimyasal insektisitlerin yerini bu biyolojik etmenlerin alacağını göstermektedir.

1.4.1.5.1. Bakteriler

Entomopatojen bakteriler, günümüzde zararlı böceklere karşı en fazla kullanılan mikroorganizmalardır. Spor oluşturanlar ve spor oluşturmayanlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Spor oluşturmayan böcek patojeni bakteriler, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonaceae*

ve *Micrococcaceae* familyalarına dahildir. Böceklerle önemli zararlar veren bakteriler, daha çok spor meydana getiren gruptandır. Spor oluşturan entomopatojenik bakteriler ise Bacillaceae familyasından *Clostridium* ve *Bacillus* cinslerinde yer alır. Yapılan araştırmalar, bunların sporlarının kuraklık ve yüksek sıcaklığa karşı dayanıklı olduğunu göstermiştir. Bunun yanında spor oluşturmeyen bakteriler olağanüstü şartlar karşısında oldukça dayanıksız ve hassas yapıdadırlar. Dolayısıyla böceklerle karşı yapılacak mücadelede, spor oluşturan ve fakültatif bakterilerin kristal taşıyanlarının kullanılması tavsiye edilmektedir (Oğurlu, 2000).

Bacillus cinsi önemli böcek patojeni türler içerir. Son yıllarda patojenik potansiyeli yüksek bir bakteri olan *Bacillus thuringiensis* üzerinde çok durulmaktadır. *B. thuringiensis*'in çok sayıda varyetesi vardır. Bunlar başta Lepidoptera olmak üzere Diptera ve Coleoptera türlerine karşı da kullanılmaktadır. Bu bakterinin spor ve kristalleri piyasaya toz, ıslanabilir toz veya sulu karışım halinde sunulmaktadır. *B. thuringiensis*'den hazırlanan karışımların uygulandığı böcekler, bu karışımların ihtiva ettiği İnsektisidal Kristal Proteinleri (ICP) sebebiyle ölürler (Demirbağ, 2008).

Bacillus cinsine ait diğer bazı türlerde zararlı böceklerin kontrolünde kullanılmaktadır. *Bacillus popilliae*, Scarabaeidae familyasına ait bazı türlerin kontrolünde kullanılırken, *Bacillus sphaericus* Neide sivrisinek larvalarının kontrolünde kullanılır (Klein ve Jackson, 1992).

1.4.1.5.2. Funguslar

Entomopatojenik funguslar böcek popülasyonlarının düzenlenmesinde önemli role sahiptir. Beş farklı sınıf içerisinde farklı bir diziliş göstermekte olan entomopatojenik funguslar spesifik böcek türlerini enfekte eden zorunlu patojenler, pek çok böcek türünü enfekte edebilen genel patojenler ve fakültatif patojenler olarak gruplandırılabilir. Fungal epizootikler bazı böcek türlerinde yaygın olmasına rağmen, bazı böcek türlerinde ise nadir görülür (Goettel vd., 2005). Entomopatojenik fungusların mikrobiyal mücadele etmeni olarak 100 yılı aşkın bir süredir kullanılmakta olduğu bilinmektedir (Hall vd., 1982).

Böcek patojeni olan funguslar genellikle Deuteromycota ve Entomophthorales gruplarına dahildir (Hajek, 1997). Entomopatojenik funguslar çok geniş bir konak

spektrumuna sahiptirler. Birçok böcek ordosuna ait türleri enfekte edebilirler. Bir entomopatojenik fungus birden fazla böcek türünü enfekte edebilir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, entomopatojenik fungusların insektisidal aktivitelerinin artırılması için diğer biyolojik kontrol ajanları ve çevresel uygulamalarla kombine edilerek kullanılması gerektiği gösterilmiştir (Klein ve Lacey, 1999; Vega vd., 1995; Furlong vd., 1995; Vega vd., 2000). Ayrıca son yıllarda genetik mühendisliği uygulamalarıyla entomopatojenik fungusların virülanslarının artırılması üzerine birçok çalışma yapılmıştır (Ferron vd., 1991; Charnley vd., 1997; St.Leger ve Roberts, 1997). Fakat bu uygulamalar, *B. thuringiensis* ve Baculovirüsler gibi diğer mikrobiyal kontrol ajanları için geliştirilen rekombinant teknolojilerin çok gerisindedir (Lacey vd., 2001).

1.4.1.5.3. Nematodlar

Böceklerde parazit olarak yaşayan ve bazı durumlarda ölümlerine yol açan birçok nematod türü bulunmaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda 30'u aşkın nematod familyasına ait türlerin, böcekler ve diğer omurgasız hayvanlarla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Kaya ve Stock, 1997).

Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyaları günümüzde, özellikle toprak böceklerinin mikrobiyal kontrolünde en sık kullanılan nematode gruplarıdır (Glazer ve Lewis 2000; Lacey vd., 2001). Bu nematodlar, *B. thuringiensis*'den sonra, Amerika'da yıllık 2-3 milyon dolarlık market satışlarıyla en fazla kullanılan mikrobiyal kontrol ajanlarıdır (Georgis, 1997). Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyasına ait türler çok geniş konak spektrumuna sahiptirler. Özellikle toprak böcekleri ve yaprakla beslenen Lepidoptera larvalarında çok aktiftirler. Fakat ekstrem çevre şartları (sıcaklık, radyasyon, kuraklık gibi) aktivitelerini düşürür (Gaugler vd., 1992).

Son yıllarda yapılan genetik çalışmalarla, entomopatojenik nematodların virülanslarının ve ekstrem çevre şartlarına dayanıklılıklarının artırılması, biyokontrol ajanı olarak kullanım potansiyelleri yükseltmiştir (Burnell ve Dowds, 1996; Gaugler ve Hashmi, 1996). Entomopatojenik fungus orjinli yaklaşık 150 ticari preparat 2007 yılından itibaren çeşitli ülkeler tarafından kullanılmaktadır ve üretimi devam etmektedir (Faria ve Wraight, 2007).

1.4.1.5.4. Protozoanlar

Entomopatojenik protozoanlar böcek popülasyonlarını dengede tutması bakımından büyük bir öneme sahiptirler (Maddox, 1987; Brooks, 1988). Genellikle konağa spesifiktirler. Böceklerde oluşturdukları hastalıklar yavaş ilerler. Virülansları düşüktür ve çoğu kez böceklerde kronik enfeksiyonlar oluştururlar. Virülanslarının düşük olması nedeniyle protozoanların enfekte ettiği böceklerin ölümü bazen haftalar sürebilir (Hoffman ve Frodsham, 1993). Çoğu entomopatojenik protozoanın hayat döngüsü komplekstir. Sadece canlı konak içersinde gelişebilirler ve çoğu türün gelişimini tamamlayabilmesi için bir ara konağa ihtiyacı vardır.

Protozoanlar tarafından enfekte edilen böceklerin hareketleri yavaşlar ve tembelleşirler. Bu nedenle gelişimleri de yavaşlar. Beslenme ve üreme faaliyetlerinde azalma görülür. Ölümün gerçekleşebilmesi için enfeksiyon seviyesinin çok yüksek olması gerekir. Gücsüz düşen böceklerin değişen ortam koşullarına karşı olan dirençliliği azalır ve diğer organizmaların saldırılarına açık hale gelirler (Hoffman ve Frodsham, 1993).

Şimdiye kadar belirlenen yaklaşık 15000 protozoa türünün, 1200'e yakın kısmının arthropodlarla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Protozoa sınıfı içersinde yer alan Ciliphora, Sarcocystophora, Apicomplexa ve Microspora gruplarına ait türler böcekleri enfekte edebilirler (Maddox, 1987).

1.4.1.5.5. Virüsler

Birçok virüsün böceklerin hastalanmasına neden olarak böcek salgınlarını kontrol ettikleri bilinmektedir (Steinhaus, 1956). Böcek virüslerinin biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılmasının pekçok avantajı vardır. Bunların başında dar konak spektrumuna sahip olmaları yani, doğrudan hedefledikleri organizmalar üzerinde etkili olmaları ve insanlarda hastalık oluşturmamaları gelmektedir. Ayrıca, birçok virüsün böceklerin hastalanmasına neden olarak böcek salgınlarını kontrol etmeleri de önemli bir avantajdır (Demirbağ, 2008).

Şimdiye kadar sınıflandırılan böcek virüslerinin büyük bir kısmı Baculoviridae, Reoviridae, Poxviridae, Picornaviridae, Densoviridae, Rhabdoviridae, Orthomyxoviridae ve

Iridoviridae familyalarına aittir. Bu böcek virüslerinden, Baculoviridae familyası sadece artropodlar için spesifiktir (Demirbağ ve Beldüz, 1997). Çoğu baculovirüsler sadece bir veya yakından ilişkili birkaç böcek türünü enfekte edebilir (Arif ve Kurstak, 1991). İnsanlar ve diğer hedeflenmemiş organizmalar için güvenli bir mikrobiyal ajan olması, bu virüslerin biyolojik mücadelede kullanılma potansiyelini arttırmaktadır (Gröner, 1986; Demirbağ, 2008).

Baculovirüslerden hazırlanan biyolojik insektisitler birçok ülkede yoğun olarak kullanılmaktadır. Konak spektrumlarının dar olması ve in vivo üretimlerinin oldukça masraflı olması, geniş alanda kullanımları için dezavantaj oluşturmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda konak spektrumu geniş olan formlarda izole edilmiştir. Örneğin *Autographa californica* Nukleopolihedrovirüs (AcNPV)'ün, Lepidoptera takımının 11 farklı familyası içerisinde yer alan 43 değişik türde aktif olduğu belirlenmiştir (Cunningham, 1995; Vail vd., 1999).

Böcek patojeni entomopoksvirüs (EPV)'ler *Poxviridae* familyası içinde *Entomopoxvirinae* altfamilyasına yerleştirilmiş kompleks virüslere örnek bir virüs grubudur. Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Orthoptera ve Hymenoptera ordolarına ait yaklaşık 60 böcekte EPV tespit edilmiştir.

Bir başka böcek virüsü grubu olan İridovirüsler ise Diptera, Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera ve Orthoptera'nın da içinde olduğu birçok böcek takımından izole edilmişlerdir.

Günümüzde “Bitki Koruma”nın amacı klasik yöntemlerde olduğu gibi sadece hastalık ve zararlıyı hedef almak değil, onunla beraber tüm ekosistemi de dikkate alarak, verimlilik hesapları içerisinde yeni mücadele planları yapmak ve saydığımız sakıncaları olabildiğince azaltmaktır. Tüm bunlara cevap verebilen, konuları bir bütün halinde ve çok yönlü ele alan “Entegre Mücadele”dir. Bu bağlamda Entegre Mücadele; bağlarda zararlı türlerin populasyon dinamiklerini ve çevre ile ilişkilerini dikkate alarak, uygun olan bütün mücadele metodlarını ve tekniklerini uyumlu bir şekilde kullanarak, bunların populasyonlarını ekonomik zarar eşiğinin altında tutan bir zararlı yönetimi sistemidir.

Bağların en önemli ve en ekonomik öneme haiz zararlısı olması itibari ile bu zararlı ile etkili bir mücadele gerçekleştirebilmek için daha geniş çapta bilgiye ihtiyacımız olacaktır.

Bu çalışmada üzümün önemli zararlısı olan *Lobesia botrana*'nin simbiyont patojenlerinin aydınlatılması, tanımlanması ve biyolojik mücadele potansiyellerinin

araştırılması hedeflenmektedir. Üzüm salkım güvesine karşı etkili bir kombinasyon elde etmek çalışmanın nihai hedefidir.

1.5. Tezin Amacı

Dünyanın değişik yerlerinde önemli zararlar oluşturan üzüm salkım güvesi, *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae) bütün çabalara rağmen zarar oluşturmaya halen devam etmektedir. Zararlı böceklerle mücadele etmenin en tercih edilen yöntemi böcek patojenlerinin (entomopatojenler) biyolojik mücadele materyali olarak kullanılmasıdır. Bu yaklaşım dikkate alınarak, mevcut doktora tez çalışmasının amacı *L. botrana*'nın kültüre edilebilir bakteriyal florasının ve viral patojenlerinin araştırılması ve çeşitli entomopatojenlerin bu böcek üzerinde insektisidal etkilerini test ederek bu zararlı için daha güvenilir ve etkili bir mikrobiyal mücadele etmeni keşfetmektir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Larvaların Toplanması ve Örneklerin Hazırlanması

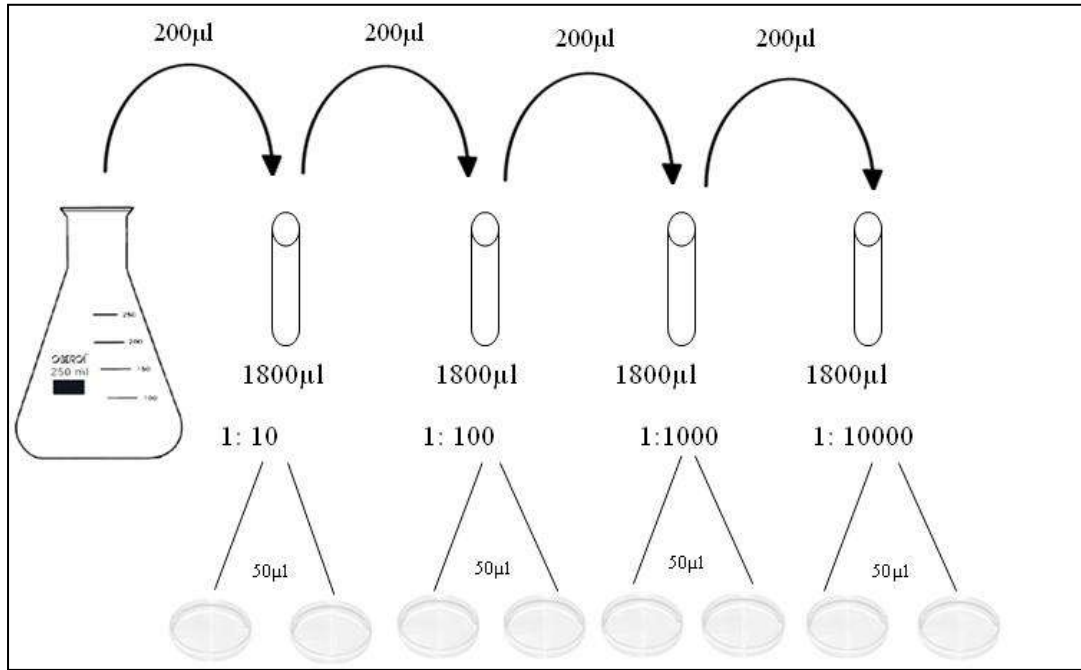
Bu çalışma için gerekli olan *Lobesia botrana* larvaları, 20 farklı bağ (Urmia, İran)'dan Haziran ve Eylül ayında toplandı. Olgun üzümde larvalar taneler içerisinde veya arasından toplandı (Şekil 13). Larvaların makroskobik incelemeleri laboratuarda yapıldı. Her istasyondan toplanan böceklerin sağlıklı olanları biyotest çalışmalarında kullanılmak üzere muhafaza edildi. Ölü, hastalıklı ve yavaş hareket edenlerinden 10'ar larva seçilerek ayrıldı. Ayrılan bu larvalar steril petri kapları içerisine konularak %70'lik etil alkol ile 30 saniye yüzey sterilizasyonuna maruz bırakıldı. Daha sonra içerisinde steril saf su bulunan petrilere alınarak 2-3 kez yıkanıp alkolden arındırıldı. Her larva 3 kısma bölünerek rastgele her kısım bir mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Birinci tüp DNA izolasyonu ve moleküler çalışmaları için, ikinci tüp bakteri izolasyonu ve tanımlaması için ve üçüncü tüp ise moleküler çalışmalar sonucu tespit edilebilecek muhtemel patojenleri elde edebilmek için stok olarak muhafaza edildi.



Şekil 13. Üzüm salkım güvesi larvalarının toplamaları

2.2. Bakteri İzolasyonu, Saf Kültürlerinin Hazırlanması ve Stoklanması

Bakteri izolasyon ve tanımlanması için yukarıda hazırlanan tüplerden birinin üzerine 1 ml nütrient broth (NB) besiyeri ilave edilerek steril bir homojenizatör ile larvaların iyice ezilmesi sağlandı. Elde edilen bu karışım bir tülbent vasıtasıyla süzüldü ve süzöntü iki ayrı tüpe bırakıldı. Tüplerin birisi spor üretmeyen bakterilerin eliminasyonu için 80 °C’de 10 dk inkübe edildi. Diğer tüpe ise 10 ml NB besiyeri ilave edildikten sonra 30 °C’de 5-6 saat inkübe edilerek ön bakteriyal zenginleştirme yapıldı. Bu inkübe edilen kültürden 1:10 oranında seyreltmeler yapıldı ve her farklı seyreltmeden 50’şer µl alınarak iki ayrı NA besiyerine yayma ekim yapıldı (Şekil 14).



Şekil 14. Bakteri içeren homojenatın seri seyreltmesi ve yayma ekim

Üzerlerine çizgi ekim yapılan NA petrileri 30 °C’ye ayarlı etüvde iki gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından besiyeri üzerinde oluşan bakteriyal koloniler binoküler mikroskop altında incelendi. Farklı koloni rengi ve morfolojilerine sahip olanlar belirlendi ve bunlar ayrı ayrı dikkatli bir şekilde steril edilmiş platin öze ile alınarak NA besiyeri üzerine

izgi ekim yapıldı. izgi ekimi yapılan bu kolonilerin saf olduklarından emin olunduktan sonra bu bakterilerin gliserol stokları hazırlandı. Bunun için NB besiyerine ekimi yapılan bakteriler 16-24 saat 30 °C’de inkübe edildikten sonra %20’lik steril gliserol ile karıştırılarak (230 ml %87’lik gliserol + 770 ml bakteri kültürü) – 80°C’de muhafaza edildiler.

2.2.1. Bakteriyal İzolatların Tanımlanmaları

2.2.1.1 İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.1.1.1 Koloni Morfolojilerinin Belirlenmesi

Koloni rengi ve morfolojisi dikkate alınarak ilk ayrımları yapılan ve saf kültürleri hazırlanan izolatların binoküler mikroskop altında detaylı incelemeleri yapıldı. Tüm izolatların koloni rengi ve morfolojisi bilgileri kayıt edildi.

2.2.1.1.2. Gram Boyama

Gram boyama için herbir izolat NB besiyerine ekildi ve 30 °C’ye ayarlı su banyosunda 16-24 saat inkübasyona bırakıldı. Büyüyen kültürlerden lam üzerine smear hazırlandı ve alevden geçirilerek tespit edildi. Hazırlanan smearlar, 1 dk kristal viole boyası ile muamele edilerek dH₂O ile yıkandı. Kuruması beklenmeden 1 dk lugol ile muamele edildi. Ardından aseton-alkol karışımı ile renk giderilinceye kadar yıkandıktan sonra, renk kaybını durdurmak için hemen dH₂O ile yıkandı. Safranin boyası ile 30-60 saniye muamele edildikten sonra smear tekrar dH₂O ile yıkandı. Açık havada kurutulduktan sonra mikroskop altında incelemeye alındı (Cappuccino ve Sherman, 1992).

2.2.1.1.3. Endospor Boyama

İzolatların endospor oluşturup oluşturmadığını ve varsa endosporun hücre içersindeki pozisyonunu belirlemek amacıyla, yalnız Gram olumlu izolatlar NB besiyerine ekildi ve 48-72

saat 30 °C'ye ayarlı su banyosunda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından lam üzerinde smear hazırlandı ve smear alevden geçirilerek tespit edildi. Hazırlanan smearlar küçük bir filtre kağıdı ile kapatıldı, üzerlerine malaşit yeşili boyası damlatıldı ve 5 dk boyunca su buharı üzerinde boyandı. Daha sonra dH₂O ile yıkandı ve 30-60 saniye safranin ile muamele edildi. Tekrar dH₂O ile yıkanarak açık havada kurutuldu ve mikroskopta incelendi (Cappuccino ve Sherman, 1992).

2.2.1.1.4. Hareket Testleri

İzolatların hareketli olup olmadığının araştırılması için “lam-lamel arası preparasyon” tekniği kullanıldı (Cappuccino ve Sherman, 1992). Bu amaçla izolatların hareketli olup olmadığının ortaya çıkarılması için hazırlanan 24 saatlik kültürlerden bir öze dolusu alındı ve temiz bir lam üzerine konulup lamelle kapatıldı. Hazırlanan bu preparat mikroskopta incelendi ve izolatların hareketli olup olmadığına karar verildi

2.2.2 Bakteriyal İzolatların Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.2.1. Büyüme pH Aralıklarının Belirlenmesi

Mikroorganizmaların üremeleri için, besiyerinin pH'sının optimal sınırlar içinde bulunması gereklidir. Minimal ve maksimal pH limitlerine yanaştıkça üreme azalır ve durur. Bakterilerin tercih ettikleri pH (optimal pH) limitleri birbirinden farklıdır. İzolatların büyüebildiği pH aralığının belirlenmesi için izolatlar değişik pH değerlerine (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10) sahip NB besiyerlerine inoküle edildi ve 30 °C'ye ayarlı etüvde üç gün inkübe edildi. İnkübasyon neticesinde üreme olup olmadığına spektrofotometrede (OD₆₀₀'de) ölçümler yapılarak karar verildi (Sneath, 1968).

2.2.2.2. NaCl Toleranslarının Belirlenmesi

İzolatların NaCl ihtiyaçlarının belirlenmesi amacıyla %2, 3, 5, 7 ve 8 oranında NaCl eklenmiş NB besiyerleri hazırlandı. Bu besiyerlerine her bir izolattan ayrı ayrı ekimler yapıldı ve 14 gün boyunca 30 °C'ye ayarlı etüvde inkübe edildi. Üreme olan ve olmayan tüpler belirlenerek, izolatların hangi oranlarda tuzu tolere edebildiklerine karar verildi (Sneath, 1986).

2.2.3. Bakteriyal İzolatların Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.3.1. Oksidaz Testi

Oksidaz testi belirli mikroorganizmalar için spesifik olan oksidaz enziminin (sitokrom C oksidaz) varlığını veya yokluğunu belirleyen bir testtir. In vitro yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde bakterilerde sitokrom oksidaz testinin yapılabilmesi için bir ucunda reaktif bölgesi olan test şeritleridir (Bactident Oxidase, Merck 1.13300). Reaktif bölge N,N-Dimethyl-1,4-phenylenediammonium chloride (0,1 µmol) ve α-naphthol (1,0 µmol) içerir. Testin uygulanışında doğrudan tek koloni ya da tek koloniden elde edilmiş yoğun bakteri süspansiyonu platin bir öze ile alınıp test bölgesine aktarıldı ve 20-60 saniye içinde kutu üzerindeki renk skalası ile kıyaslanmak üzere mavi veya mor renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilir. Şeridin test bölgesine el sürülmemelidir.

İzolatların oksidaz enzimi üretilip üretilmediklerinin belirlenmesi amacıyla triptik soy agar (TSA) besiyerleri hazırlandı. Her bir izolattan bu besiyeriye içeren petrilere çizgi ekim yapıldı ve 30 °C'de 24-48 saat inkübe edildikten sonra petrilere oksidaz testi yapıldı. Oluşan mavi veya mor renge göre testin pozitif olduğuna karar verildi.

2.2.3.2. Katalaz Testleri

İzolatların katalaz enzimi üretilip üretilmediğinin belirlenmesi amacıyla yine izolatlar TSA besiyerisi içeren petrilere çizgi ekim yapıldı. 30 °C'de 24-48 saat inkübe edildikten sonra petrilere büyüyen kolonilerin üzerine %3'lük H₂O₂ damlatıldı ve köpürme oluşup oluşmadığına bakıldı (Cappuccino ve Sherman, 1992).

2.2.3.3. MacConkey Agarda Büyümeleri

MacConkey Agar besiyeri bileşimindeki safra tuzları ve kristal viyole Gram olumlu mikrobiyel florayı önemli ölçüde inhibe eder. pH indikatörü olan nötral kırmızısı laktozun kullanıldığını ya da kullanılmadığını gösterir. 35-37 °C 'da 18-24 saat inkübasyon sonunda laktoz negatif bakteriler renksiz koloniler oluştururken, laktoz pozitif olanların kolonileri kırmızı olur ve etrafları pH düşmesine bağlı olarak safra asitlerinin presipitasyonu nedeni ile bulanık bir zon ile çevrilir. In vitro yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde koliform grup bakterilerin geliştirilmesi için selektif katı besiyeri olarak kullanılır (Snyder, 2006). İzolatların MacConkey Agar besiyeride büyüme durumlarını belirlemek amacıyla besiyerileri hazırlandı. Herbir izolattan bu besiyeriyi içeren petrilere çizgi ekim yapıldı. 30 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra petrilere bakterilerin geliştirilmesi ve renk değişimleri incelendi.

2.2.4. Bakteriye İzolatların Biyokimyasal İdentifikasyon Sistemleri

2.2.4.1. API Test Kitleri ile Bakteriye İzolatların Tanımlanması

API test kitleri, panel haline getirilmiş biyokimyasal testlerden oluşan ve veri tabanı kullanılarak değerlendirilen bir sistemdir. Gram olumlu çubuk şekilli olan bakterilerin tür seviyesinde tanımlanmaları için API20E ve API50CHB (bioMérieux, France) test kitleri kullanıldı (Muratoğlu ve ark., 2011) API20E, 21 biyokimyasal test ve veri tabanı kullanan Enterobacteriaceae ve zor üremeyen Gram olumsuz çomaklar için standart hale getirilmiş tanımlama sistemidir.

Bu test uygulanırken TSA üzerinde büyütülmüş gece kültürlerinden bir öze ile alınarak %0.85 NaCl (kitte olan özel ampüller) içerisinde iyice karışması sağlandı. Kullanılacak olan kültür miktarı McFarland standardına göre yoğunluğu 0,5 McFarland olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan kültürler her bir bakteri için tüm kuyucuklara dolduruldu. Bu aşamada bazı kuyucukları tam doldurulurken (CIT, VP ve GEL) bazı kuyucukların ise (ADH, LDC, ODC, H₂S ve URE) anaerobik koşulları sağlamak için mineral yağ ile üzeri kapatıldı. Böylece kuyucuk içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Daha sonra bu API panelleri 18-24 saat inkübasyona tabii tutuldu. Elde edilen sonuçlar API20E test sistemi için belirlenmiş anahtara (Ek-2) bakılarak pozitif veya negatif şeklinde değerlendirildi.

API50CH, mikroorganizmaların karbonhidrat metabolizmasının çalışmasını sağlayan 49 biyokimyasal testten oluşan bir tanımlama sistemidir.

İzolatların bu test sisteminde değerlendirilmelerinin yapılabilmesi için bir gece önceden bakterilerin genel bir besiyeri olan TSA besiyerine çizgi ekimleri yapıldı. İnkübasyon sonunda elde edilen kültürlerden, kite özel ampüller içerisine 'Mc Farland' standartı 0,5 olacak şekilde aktarıldı. Hazırlanan bu bakteri karışımı test panellerinin başlangıç gözeneğine ilave edilip panel dik tutularak bakteri karışımının tüm test kuyucuklarına aynı anda ulaşması sağlandı. Üzerlerine kültür eklenmiş paneller özel bölmelerine yerleştirildikten sonra 24 saat ile 48 saat arasında inkübasyona tabii tutuldu. Bu panel sisteminin, API 20E'den uygulandığındaki farkı panele sonradan ayrıca ilavesi yapılmamasıdır. TDA kuyucuğuna 1 damla TDA ayırıcı, IND kuyucuğuna 1 damla JAMES ayırıcı ve VP kuyucuğuna ilk önce 1 damla VP1 ve ardından 1 damla VP2 ayırıcı ilave edildi ve tablo Ek-2 ye göre sonuçlar incelendi.

Elde edilen sonuçlar API50CH test sistemi için belirlenmiş anahtara göre pozitif veya negatif şeklinde değerlendirildi.

2.2.4.2. VITEK-2 Testi

VITEK-2 (bioMerieux), bakterilerin asidifikasyon, alkalinizasyon, enzim hidrolizi gibi çeşitli metabolik aktivitelerini belirleyen ve geniş veritabanı üzerinde tanımlanmalarını sağlayan bir sistemdir. Bu sistemde spor oluşturan Gram olumlu basiller için BCL, Gram olumlu koklar ve spor oluşturmeyan Gram olumlu basiller için GP, Gram olumsuz fermentatif

ve non-fermantatif basiller içinse GN kartları kullanılmaktadır (Muratoğlu ve ark., 2011) Bu test için örnekler TSA besiyerine inoküle edildi ve 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra steril bir swap yardımıyla alınan bakteri steril tuz solusyonuna aktararak süspansiyon haline getirildi. McFarland bulanıklık aralığı BCL için 1.80-2.20, GN ve GP kartları içinse 0.50-0.63 olacak şekilde ayarlandı ve süspansiyonlar kasetlere yerleştirildi. Kartlar da süspansiyonlara yerleştirilerek barkodları bilgisayar sistemine tanıtıldı ve cihazın otomatik taşıyıcı sistemine yüklendi. Yaklaşık 14-15 saat sonra sonuçlar alındı.

2.2.5. Bakteriyal İzolatların Moleküler Karakterizasyonu

Konvansiyonel yöntemlerle seçilen, saflaştırılan ve tanımlanan bakteriyal izolatların daha hassas tanımlanmaları için moleküler tanımlamaları gerçekleştirildi.

2.2.5.1. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA'nın izolasyonu, Sambrook (1989) ve arkadaşlarına göre gerçekleştirildi. Bir gün önceden 3 ml Leura-Bertani (LB) besiyerine ekim yapılarak 30 °C'de inkübe edilen bakteriler, ependorf tüpler içerisinde 13.000 rpm'de 3-4 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 500 µl TE tamponu eklendi. Pellet iyice çözüldü ve üzerine 10 mg lizozim ilave edilerek 37 °C'de 1 saat bekletildi. Hücrelerdeki proteinlerin parçalanması için 50 µl %10'luk SDS eklendi ve 37 °C'de 30 dk bekletildi. Daha sonra her tüpe 3 M'lık 55 µl (0,1 hacim) sodyum asetat (pH 5,2) eklendi ve 65°C'de, 30 dk alt-üst edilerek hücrelerin parçalanması sağlandı. Tüplere 500 µl fenol-kloroform-izoamil alkol ilave edildi. Tekrar alt-üst edilerek karıştırıldı ve 13.000 rpm'de 4 dk santrifüj edildi. Tüplerin içerisindeki karışımın üst fazı alınarak yeni tüplere aktarıldı. Bu tüplere 500 µl kloroform eklendi ve alt-üst edilerek 13.000 rpm'de 4-5 dk santrifüj edildi. Üst faz alınarak yeni tüplere aktarıldı, üzerine 3 ml 55 µl 3 M sodyum asetat ve 1.000 µl %96'lık etil alkol ilave edildi ve -20°C'de 45 dk bekletildi. Daha sonra 13.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi ve sıvı kısım uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 500 µl alkol ilave edilerek 13.000 rpm'de 2 dk tekrar santrifüj edildi. Üst kısımdaki sıvılar

boşaltıldı ve pellet açık havada kurutuldu. Elde edilen DNA pelleti, 50µl steril TE tamponunda çözüldü ve +4 °C'de kullanılmak üzere saklandı.

2.2.5.2. 16S rRNA Genlerinin PCR ile Çoğaltılması ve Dizin Analizi

16S rRNA genleri, herbir izolattan saflaştırılan genomik DNA'dan UNI16S-L (5'-ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA-3') ileri ve UNI16S-R (5'-ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3') geri primerleri kullanılarak PCR yardımı ile çoğaltıldı. PCR reaksiyonlarının şartları Beffa (1996)'ya göre oluşturuldu. 12 ng kalıp DNA, 5 µl 10 x PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM steril KCl), 1,5 mM MgCl₂, 1 U Taq DNA Polimeraz, 0,25 mM ileri primeri, 0,25 mM geri primeri, 170 mM d ATP, 170 mM dCTP, 170 mM dGTP ve 170 mM dTTP karışımı steril saf su ile 50µl'ye tamamlandı. Çoğaltma işlemi 200µl'lik tüplerde, "Biometra Personal Cycler"da gerçekleştirildi. PCR şartları, 95 °C'de 2 dakikalık denatürasyondan sonra 36 döngü olacak şekilde 94 °C'de 1 dk, 56 °C'de 1 dk ve 72 °C'de 2 dk ve son olarakta 72 °C'de 10 dk son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin 5µl'si %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve "Gel Logic; Kodak" sistemiyle görüntüledi. Tek bant şeklinde elde edilen 16S rRNA genlerine ait PCR ürünleri pGEMT-Easy vektörüne klonlandı. Tüm izolatlara ait oluşturulan klonlar MacroGen firması (Kore)'na dizin analizi yaptırılmak üzere gönderildi. Dizin analizi sonucunda elde edilen bilgiler BioEdit programı ile düzenlendikten sonra Gen Bankasında mevcut olan bakterilere ait 16S rRNA dizileri ile NCBI/BLAST programı kullanılarak karşılaştırıldı ve aralarındaki benzerlikler belirlendi.

2.2.5.3. Filogenetik Analiz

DNA dizilerinin Cluster analizi aynı şekilde BioEdit programı kullanarak Clustal W programı ile yapıldı ve buradan elde edilen veriler MEGA5 filogenetik programı yardımıyla maximum-likelihood analizinde kullanıldı. Aligment boşlukları kayıp veri olarak değerlendirildi. Oluşturulan dendrogramların güvenilirliği MEGA5 programı kullanarak seç-bağla (bootstrap) analizi ile 1000 tekrarlı olacak şekilde test edildi.

2.3. *Lobesia botrana*'dan Virüslerin Araştırılması

2.3.1. Işık Mikroskobu ile Virüslerin Araştırılması

Herhangi bir virüs enfeksiyonu olabileceğinden şüphelendiğimiz larva dokularından yayma preparatlar hazırlanarak, virüslerin oluşturmuş oldukları polihedral inklüzyon yapılarının (PIB) varlığı incelendi. Inklüzyon yapıların varlığının güvenilir bir teşhisini yapmak için hücre sitoplazmasını veya çekirdeğini araştırmak gerekir. Bunun için en iyi metot trake sıvısının, hemositlerin ya da hipodermislerin faz-kontrast mikroskobunda incelenmesi sağlandı (Deacon, 1983). Mikroskop altında enfekte hücrelerin çekirdekleri önemli bir şekilde genişlerler ve yağ dokusunda hücre bölünmesi artar (Lipa, 1975).

Virüs inklüzyon yapılarını inorganik kristallerden ayırmak için, değişik boyama metodları mevcuttur. Enfekte hücrelerin ayrıntıları Giemsa boyası gibi farklılaştırıcı boya kullanılarak ayırt edilebilir (Demirbağ ve ark., 2008). Numunenin taze materyalden hazırlanması halinde, normal dokuların kontrol olarak kullanılmasıyla enfeksiyon sonucu çekirdek ve sitoplazmada meydana gelen değişiklikler net bir şekilde ayırt edilebilir. Çekirdek ve sitoplazmanın sınırının kaybolması, özellikle çekirdeğin dağılması, çekirdek ya da yoğun materyalin görünümü enfeksiyonu ve virojenik bir gelişimi ifade eder (Thiery ve Frachon, 1997). Işık mikroskobu için birçok boyama yöntemi olmasına rağmen, özellikle inklüzyon yapıları oluşturan virüslerin teşhisine yardımcı olmak amacıyla virüs teşhisinde başlıca iki boyama metodu yaygın olarak kullanılacaktır. Buffalo Black 12B ve Giemsa boyaması, fiksasyon ve kompleks yöntemlerin kullanılmasına gerek kalmadan kolaylıkla uygulanabilir (Demirbağ ve ark., 2008).

2.3.2. Dokudan Direk Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Virüs Varlığının Belirlenmesi

Zararlıda ilk olarak bakülovirüs taraması yapıldı. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) işlemi için bakülovirüslerin tanımlayıcı genlerine (*polihedrin*, *lef-8*, *mcp*) ait primerler kullanıldı.

Dokudan PCR (Finnzymes` Phire, Animal Tissue Direct PCR) iki farklı metot (dilüsyon ve direkt) ile yapılabilmektedir:

Dilüsyon metodunda küçük bir parça (1-2 mm) üzerine 20 µl dilüsyon tamponu eklenir ve üstüne 0.5 µl "DNA release" ilave edilir iyice vorteks ile karıştırdıktan sonra hızlıca karıştırılır. 2-5 dk oda sıcaklığında ve daha sonra 98 °C de 2 dk bekletilir ve 30 s 6000 x g de santrifüj edilir. Supernatant alınır ve -20°C de muhafıza edilir.

Direkt metotta doku (veya böcek homojenatı) dan 0.5 mm alınır ve 50 µl PCR reaksiyonu içine konulur. Gömülü virüslerin polihedral yapılarının çözünmesi için doku (veya böcek homojenatı) DAS (Na₂CO₃, 0.1 M; EDTA, 0.01M; NaCl, 0.17) ile muamele edildi (Peng K, 2011). Bir saat 37 °C ve daha sonra 10 dk kaynar suda bekletildi ve ardından 14000 rpm' de 1 dk santrifüj edildi. PCR yaparken süpernatant DNA örneği yerine kullanıldı.

Direk doku PCR'ında lepidoptera NPVlerine özgün polihedrin (*polh*) (universal) ve 8. geç ekspresiyon faktörü (*lef-8*) (Herniou, 2003) ve major kapsid protein (*mcp*) (Nalcacioglu ve ark, 2003) genlerini çoğaltmak amacıyla dejenerat primerler hazırlandı (Tablo 3).

Tablo 3. Virüs taraması için kullanılan primerlerin özellikleri

Hedef gen (uzunluğu)	Primer	Tm (°C)	Baz sırası ^{a,b}
<i>lef-8</i> (800)	Fw (M13-20)	62.5	(<u>GTAAAACGACGGCCAG</u>)TTYTTYCAYGG NGARATGAC
	Rv (M13 Reverse)	64.9	(<u>AACAGCTATGACCAT</u>)GGNAYRTANGGR TCYTCNGC
<i>Polh</i> (600)	Fw (M13)	61.3	(<u>GTAAAACGACGGCCAG</u>)TTYIKIGGICIG GIAARAA
	Rv (M13)	59.3	(<u>AACAGCTATGACCAT</u>)GTCIGGIGCRAAYT CYTT
<i>MCP</i> (1400)	Fw	62	CTTCTGGTTTCATCGATATCG
	Rv	60	CCAAGTGCTCCGCCGAA

(B = C, G, veya T; D = A, G, veya T; H = A, C, veya T; I = Inosin; N = C, A, T, veya G; R = A veya G; S = C veya G; Y = C veya T; M = A veya C; K = T veya G; W = A veya T; V = A, C veya G; U = Urasil; F = fosforothioat-A). Altı çizgili olan nukleotidler standard primer sıraları (20) M13 forward ve M13 reversi göstermektedir. Tm sıcaklığı sadece primer sırasından dejenerat bazları içeriyor (altı çizili olmayanlar).

PCR yapmak için Thermal Cyclers (Biorad, USA) kullanılarak toplam hacim 50 µl olmak üzere 1.5 µl DNA (0.5 µg DNA), 1 µl 10 mM dNTP karışımı, 1'er µl 10 pM primerlerden, 3 µl 25 mM'lık MgCl₂, 10 µl *Taq* DNA polimeraz reaksiyon tamponu ($\times 5$), 0.5 µl 5U/µl GoTaq DNA polimeraz (Promega) ve 32 µl dH₂O kullanıldı. Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri ise *Polh* ve *lef-8* genleri için ilk denatürasyon basamağı 95 °C de 5 dk olarak gerçekleştirildikten sonra, 10 döngü, 94 °C (denatürasyon) de 60 s, 45 °C (hibridizasyon)'de 45 s, ve 72 °C (polimerizasyon)'de 1 dk ve 25 döngü 94 °C de 45 s, 60 °C de 30 s ve 72 °C de 1 dk. En son basamak 72 °C (son uzama)'de 5 dk şeklinde gerçekleştirildi. MCP geni için reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri ise ilk denatürasyon basamağı 95 °C de 2 dk olarak gerçekleştirildikten sonra, 10 döngü 95 °C'de 1 dk, 55 °C'de 45 s, 72 °C'de 1 dk ve 25 döngü 95 °C'de 45 s, 60 °C'de 30 s, 72 °C'de 1 dk ve en son 72 °C'de 5 dk bekletmek şeklinde gerçekleştirildi.

Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütmek için "DNA Release" boyaya ilave edildi ve daha sonra "BioDocAnalyze" sistemiyle görüntülendi.

2.4. İnsektisidal Aktivite Testleri

İnsektisidal aktivite çalışmaları için üzüm bağlarından toplanan sağlıklı *Lobesia botrana* larvaları üzerinde gerçekleştirildi. Deneyler laboratuvar koşullarında yürütüldü. Bu çalışmalarda böcekten izola edilen ve tanımlanan bakterilerin yanı sıra laboratuvar stoklarında bulunan ve daha önce tanımlanmış olan çeşitli entomopatojenlerin (2 tane *Bacillus thuringiensis*, 12 tane fungus, 4 tane virüs örneği) insektisidal aktiviteleri araştırıldı (Tablo 4).

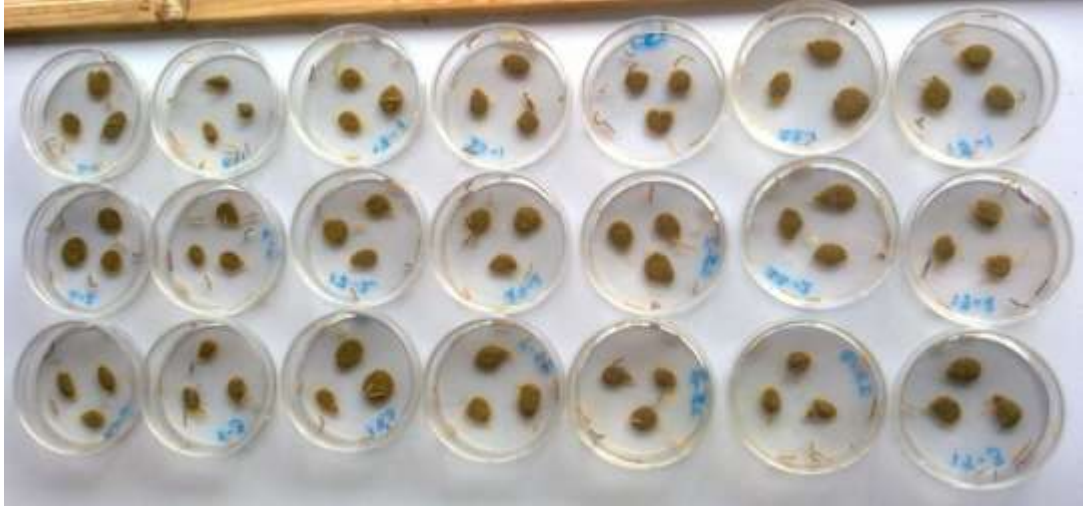
2.4.1. *Lobesia botrana*'dan İzole Edilen Bakteriyel İzolatların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

Elde edilen bakteriyel izolatlardan spor oluşturmayanlar 24-48 saat, spor oluşturanlar ise 72-96 saat inkübasyondan sonra yoğunlukları $1,8 \times 10^9$ bakteri/ml olacak şekilde ayarlandı (Ben-Dov ve ark. 1995). Daha sonra her birinden $1,8 \times 10^9$ bakteri olacak şekilde petri kaplarındaki yapay olarak hazırlanmış besinlere (Rauscher, 1984) emdirildi. Kontrol grubunun bulunduğu kaptaki besinlere su eklendi. Kapların her birine 10'ar adet sağlıklı 3. ve 4. evre larvalar bırakıldı. Bütün deney grupları 26 ± 2 °C'de ve %60 nem içeren iklim dolabında 16

saat ışık ve 8 saat karanlık periyodunda inkübe edildi. Deney düzeneği Şekil 15'deki gibi oluşturuldu. Her gün ölen larvalar kaplardan çıkartıldı, sonuçlar kaydedildi ve 10 gün sonunda deneyler sonlandırıldı. Deneyler 3'er kez tekrarlandı. Böylece her bir izolat için toplam 30 adet larva kullanıldı.

Tablo 4. İnsektisidal aktivite testlerinde kullanılan entomopatojenler ve referansları

Entomopatojen izolat	Referans
MnD (<i>Bacillus thuringiensis</i>)	Sevim ve ark., 2012
BnBt (<i>Bacillus thuringiensis</i>)	Sezen ve Demirbağ 1999
Ardeşen (<i>Metarhizium anisopliae</i> KTU-2)	Sevim ve ark., 2010
ÇK (<i>Beauveria bassiana</i> KTU-24)	Sevim ve ark., 2010
53 (<i>Metarhizium anisopliae</i> KTU-40)	Sevim ve ark., 2010
117 (<i>Metarhizium anisopliae</i> KTU-21)	Sevim ve ark., 2010
269 (<i>Metarhizium brunneum</i> KTU-60)	Sevim ve ark., 2010
4-Gm-a (<i>Metarhizium anisopliae</i>)	Sevim ve ark., 2010
68-b (<i>Isaria fumosorosea</i> KTU-42)	Sevim ve ark., 2010
287 (<i>Beauveria pseudobassiana</i> KTU-53)	Sevim ve ark., 2010
Gg-12 (<i>Metarhizium anisopliae</i>)	Yayınlanmamış
Gg-1 (<i>Beauveria bassiana</i>)	Yayınlanmamış
Y-2 (<i>Isaria fumosorosea</i>)	Sevim ve ark., 2010
Gg-11 (<i>Myriodontum kerotinophylum</i>)	Yayınlanmamış
LydiNPV	Yayınlanmamış
ManeNPV	Demir ve ark., 2013
CIV	Dizman ve ark., 2012
HycuNPV	Demir ve Demirbağ 2006



Şekil 15. İnektisidal aktivite testi için hazırlanan deney düzeneği

2.4.2. Farklı Zararlılardan İzole Edilen *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının İnektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

Daha önceden farklı zararlılardan izole edilmiş ve KTÜ-Mikrobiyoloji laboratuvarı (Karadeniz Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı) koleksiyonunda mevcut olan 2 farklı *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (MnD ve BnBt) izolatlarının *Lobesia botrana* larvaları üzerindeki inektisidal etkileri yukarıda anlatıldığı şekilde araştırıldı.

2.4.3. Farklı Zararlılarından İzole Edilen Fungus İzolatlarının İnektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

KTÜ-Mikrobiyoloji laboratuvarı (Karadeniz Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı) koleksiyonunda mevcut olan 12 farklı entomopatojen fungus (2 adet *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., 1 adet *Beauveria pseudobassian* S.A. Rehner & R.A. Humber, 5 adet *Metarhizium anisopliae* sensu lato, 1 adet *Metarhizium brunneum*, 1 adet *Myriodontum kerotinophylum* ve 2 adet *Isaria fumosorosea* (Wize)) türü *Lobesia botrana* larvaları üzerinde test edildi.

Fungus türlerinin inektisidal aktivitelerini belirlemek için spor süspansiyonları hazırlandı. Bunun için laboratuvarında bulunan stok fungal izolatlardan (1×10^7 spor/ml) Patates dekstroz agar + maya ekstraktı (PDAY) besiyeriye 100 µl yayma ekim yapıldı ve 25 °C'de 2-3

gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Büyüme periyodunun sonunda, tek koloniler seçilerek başka bir PDAY besiyerine transfer edildi ve 25 °C'de 4 hafta boyunca inkübe edildi. Büyüyen fungusların üzerine 10 ml steril %0,01'lik Tween 80 eklendi ve cam baget ile kazınarak sporlar elde edildi. Spor süspansiyonları iki katlı steril tülbent ile 50 ml'lik steril falkon tüplerine süzülerek misel ve agar parçalarının uzaklaştırılması sağlandı. Elde edilen süspansiyonlar 5 dk vortekslenerek homojen hale getirildi. Spor konsantrasyonları Neubauer hemositometresi ile sayılarak arzu edilen konsantrasyonlara (1×10^7) ayarlandı. Sporların yaşayabilirliği, 100 µl spor süspansiyonun PDAY agar üzerine yayma ekim yapılması ve 24 saatlik bir inkübasyondan sonra çimlenme özelliğinin belirlenmesi ile test edildi. Germ tüpü spor çapından büyük olan sporlar çimlenmiş olarak kabul edildi. Bunun sonucunda %95 oranında çimlenen sporlar patojenite testlerinde kullanıldı.

Hazırlanan spor süspansiyonları *L. botrana* larvaları üzerinde test edildi. Bunun için 10'ar adet larva her bir süspansiyona maruz bırakılarak böceklere tamamen bulaşması sağlandı. Kontrol grubu ise steril %0,01'lik Tween 80 ile muamele edildi. Muamele edilen böcekler besiyeri ihtiva eden plastik kutulara konuldu. Bütün deneyler 3 defa tekrar edildi. Her bir izolat için toplam 30 adet larva kullanıldı. Deney düzenekleri 26 ± 2 °C'de ve %60 nem içeren iklim dolabına konularak 16 saat ışık ve 8 saat karanlık periyodunda 10 gün boyunca inkübe edildi. İncelemeler her gün yapıldı ölü larvalar sayılarak yüzde ölüm değerleri hesaplandı. Yüzde mikoz değerini hesaplamak için ise ölü bulunan larvalar %1'lik sodyum hipoklorit çözeltisi ile yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra 3 kez steril distile su ile yıkandı ve steril nemli filtre kağıdı içeren petrilere alındı. Bunu takiben funguslanan larvalar sayılarak yüzde mikoz değerleri hesaplandı.

2.4.4 Farklı Zararlılarından İzole Edilen Virüslerin İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

KTÜ Mikrobiyoloji laboratuvarında mevcut olan 4 farklı virüs (*Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus (LydiNPV), *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus (HycuNPV), *Malacosoma neustria* nucleopolyhedrovirus (ManeNPV) ve *Chilo iridescent* virus (CIV)), *L. botrana* larvaları üzerinde test edildi. Kullanılacak virüs örnekleri stoklardan direkt alınarak kullanıldı. LydiNPV, HycuNPV ve ManeNPV bakülovirüsleri 1×10^8 PIB / ml (polyhedral

inclusion bodies) konsantrasyonunda kullanılırken, CIV 100 ng/enjeksiyon sıvısı konsantrasyonunda kullanıldı. PIB'leri saymak için hemositometre lamı kullanıldı. Yoğun olduklarında steril saf su ile seyreltildi. Virüs solusyonları hazırlandıktan sonra plastik kutularda olan yapay besiyeri üzerine bulaştırıldı ve her kutuya 10'ar adet 3-4. evrede olan *L. botrana* larvası bırakıldı. Deney düzeneği 25 °C'de 16 saat ışık ve 8 saat karanlık periyodunda 10 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Bütün kutular 10 gün boyunca incelenerek ölü bulunan larvalar sayıldı ve ölümler ayrı ayrı ependrof tüplere alınarak -20 °C'de muhafaza edildi. Yüzde ölüm değerleri hesaplandı.

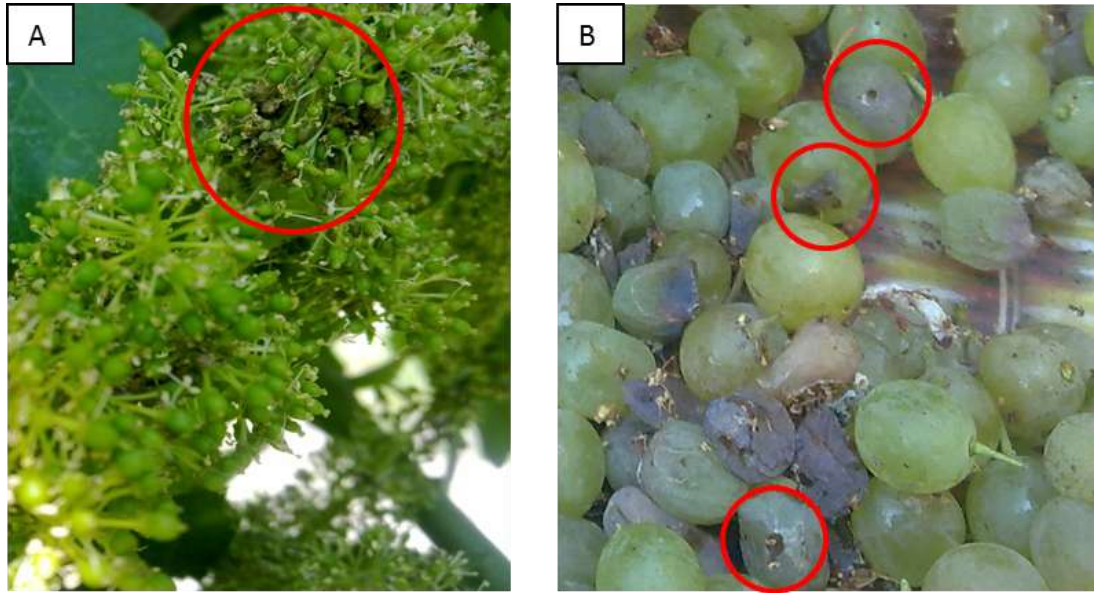
2.4.5 İnsektisidal Aktivite Sonuçlarının İstatistiksel Analizleri

Elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri SPSSwin/VR18 programı ile yapıldı. Kontrol ve test gruplarında ölüm ve yaşam oranlarını karşılaştırmak için Descriptive Statistics, Pearson correlation testi kullanıldı (confidence interval %95 ve $P < 0.05$). Ölüm oranlarını farklı günlerde incelemek ve anlamlı farkları bulmak için Survival istatistiksel analizi yapıldı. Yaşam ve ölüm oranları hesaplandı ve grafikler çizildi.

3. BULGULAR

3.1. *Lobesia botrana*'nın Doğadan Toplanması

Larvalar, oluşturdıkları zarar şekli ve belirtilerinden dolayı birinci ve üçüncü dölde daha kolay bulunabildiler. Birinci dölde salgıladıkları beyaz renkli ipliklerle çiçekleri birbirine birleştirdiklerinden kolayca gözlenebildi ve toplanabildiler. Üçüncü dölde de taneler olgunlaşmış olduklarından larvaların bu taneler üzerindeki izleri, oluşturdıkları delikler ve çürükler kolayca görülebildi. Yine üçüncü dölde larvaların salgıladıkları beyaz renkli ipliklerde rastlanıldı (Şekil 16). Bunların yanı sıra ikinci ve dördüncü döllere de seyrek olarak rastlanıldı. Larvaların toplanması esnasında rastlanılan ölü ve hastalıklı görünümde olanlar ayrı olarak muhafaza edildiler. Larvaların üzüm salkımlarında görülüp toplanmasının yanı sıra birde salkımların steril suya batırılarak toplanması işlemi gerçekleştirildi. Bu şekilde özellikle ölü larvalar tespit edildiler. Ağır olan üzüm taneleri su içinde dip kısma inerken hafif olan larvalar yüze çıktıklarından dolayı ölü larvaları kolayca toplamak mümkün oldu.



Şekil 16. *Lobesia botrana* larvalarının oluşturdıkları zararlar. A) 1.dölün, B) 3.dölün zarar şekilleri

3.2. *Lobesia botrana* Larvalarının Bakteriyal Florası

Üzüm bağlarından toplanan böceklerden hazırlanan süspansiyondan nütrient agar besiyeri üzerine ekim sonucunda *Lobesia botrana* larvalarından ilk başta 27 bakteri izole edildi. Daha sonra çeşitli aşamalarda benzer oldukları düşünülen izolatlar elimine edildi ve ardından koloni morfolojileri ve izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri dikkata alınarak 7 farklı bakteri izolatu tespit edildi. Bu izolatlar Lb4, Lb6, Lb12, Lb13, Lb15, Lb17 ve Lb21 şeklinde numaralandırıldı. Seçilen bakteriyal izolatların tanımlanmaları için çeşitli konvensiyonel ve modern testler uygulandı.

3.2.1. Bakteriyal İzolatların Karakterizasyonu

3.2.1.1. Bakteriyal İzolatların Morfolojik Özellikleri

Gözle yapılan incelemeler sonucunda Lb4, Lb6, Lb12, Lb15, Lb17 ve Lb21 numaralı izolatların kolonilerinin krem rengi, Lb13 numaralı izolatu ise pembe renkli olduğu belirlendi. Binoküler mikroskop incelemeleri sonucunda ise Lb4 numaralı izolatu koloni büyüklüğünün diğer izolatlara göre daha büyük olduğu tespit edildi. Yine koloni morfolojisi olarak Lb4, Lb6, Lb12, Lb15, Lb17 ve Lb21 numaralı izolatların kolonilerinin düzgün-yuvarlak, Lb13 numaralı izolatu ise düzgün olduğu belirlendi. Makroskobik gözlemlerle özellikleri belirlenen bakteri izolatlarının mikroskobik özelliklerinin belirlenmesine geçildi.

Gram boyama preparatlarının ışık mikroskobunda incelenmeleri sonucunda Lb4 ve Lb13 numaralı izolatların Gram olumlu, diğer izolatların ise Gram olumsuz oldukları belirlendi. Ayrıca, Lb4 numaralı izolatu kok, Lb13 numaralı izolatu basil ve diğer izolatların ise kokkobasil oldukları tespit edildi. Yapılan hareket incelemeleri sonucunda Lb4, Lb6 ve Lb13 numaralı izolatlar hariç diğer izolatların az veya çok hareketli, oldukları belirlendi. Spor boyama neticesinde izolatların spor ihtiva etmediği belirlendi. İzolatlara ait morfolojik özellikler toplu halde Tablo 5'te gösterilmektedir.

Tablo 5. Bakteriyal izolatların morfolojik özellikleri.

İzolatlar	Morfolojik Özellikler						
	Koloni rengi	Koloni şekli	Gram boyama	Hareket	Hücre Şekli	Kaynak Böcek	NB'deki Görünüm
Lb4	Krem	Düz.-Yuv. KK	+	-	Kokus	CL/ ÖL	B
Lb6	Krem	Düz.-Yuv. BK	-	-	Kokkobasil	CL/ ÖL	B
Lb12	Krem	Düz.-Yuv. BK	-	+	Kokkobasil	CL/ ÖL	B
Lb13	Pembe	Düz.-Akışkan, BK	+	-	Basil	CL/ ÖL	B
Lb15	Krem	Düz.-Yuv. BK	-	Z+	Kokkobasil	CL/ ÖL	B
Lb17	Krem	Düz.-Yuv. BK	-	Z+	Kokkobasil	CL/ ÖL	B
Lb21	Krem	Düz.-Yuv. BK	-	+	Kokkobasil	CL/ ÖL	B

Düz.: Düzgün; Yuv.: Yuvarlak; CL: Canlı larva, ÖL: Ölü larva, B: Bulanık; KK: küçük koloni ve BK: büyük koloni, Z+: zayıf pozitif

3.2.1.2. Bakteriyal İzolatların Fizyolojik Özellikleri

İzolatların fizyolojik özellikleri Tablo 6'da verilmiştir. İzolatların büyümeleri üzerine etkili olan pH ve NaCl'e karşı tolerans gibi fiziksel özelliklerinin araştırılma testler yapıldı. Gram olumlu olan Lb4 izolatı pH'sı 5-7 ve Lb13 izolatın 5-9 arasında olan besiyerlerinde optimum olarak büyürken diğer Gram olumsuz (Lb6, Lb12, Lb15, Lb17, Lb21) olan izolatların pH'sı 4-10 arasında olan besiyerlerinde optimum olarak büyüdükleri tespit edildi.

İzolatların NaCl'ye olan toleranslarının belirlenme testler sonucunda tüm izolatların %2 oranında NaCl içeren besiyerlerinde büyüdükleri görüldü. %8 NaCl içeren besiyerinde Lb4, Lb6, Lb13 numaralı izolatların büyümediği, diğer izolatların büyüdüğü; %9 NaCl içeren besiyerinde hiçbir izolatın büyümediği tespit edildi (Tablo 6).

MacConkey Agar besiyeri bileşimindeki safra tuzları ve kristal viyole Gram olumlu bakterileri inhibe ettiği gibi bu çalışmada Gram olumlu olan Lb4 ve Lb13 nolu izolatlar bu besiyeride büyümedikleri halde diğer Gram olumsuz (Lb6, Lb12, Lb15, Lb17 ve Lb21 nolu) izolatlar McC. Agar'da büyüme özelliğine sahiplerdi.

Tablo 6. Bakteriyal izolatların fizyolojik özellikleri

Izolot	pH Testi	NaCl Testi (%)	McC. Agar'da büyüme
Lb4	$5 \leq \text{pH} \leq 7$	$2 \leq \text{NaCl} \leq 7$	-
Lb6	$4 \leq \text{pH} \leq 9$	$2 \leq \text{NaCl} \leq 7$	+
Lb12	$4 \leq \text{pH} \leq 10$	$2 \leq \text{NaCl} \leq 8$	+
Lb13	$5 \leq \text{pH} \leq 9$	$2 \leq \text{NaCl} \leq 7$	-
Lb15	$4 \leq \text{pH} \leq 10$	$2 \leq \text{NaCl} \leq 8$	+
Lb17	$4 \leq \text{pH} \leq 10$	$2 \leq \text{NaCl} \leq 8$	+
Lb21	$4 \leq \text{pH} \leq 10$	$2 \leq \text{NaCl} \leq 8$	+

3.2.1.3. Bakteriyal İzolatların Biyokimyasal ve Metabolik Özellikleri

3.2.1.3.1. Bakteriyal İzolatların API20E Panel Test Sistemi ile Tespit Edilen Özellikleri

API20E panellerine yapılan ekimler 1 gece 30 °C'de inkübe edildikten sonra bazı test kuyucukları direk incelenerek bazıları ise (TDA, JAMES, VP1-VP2, NIT1-NIT2) ayıraç ilave edilerek incelendi ve izolatların bazı metabolik ve biyokimyasal özellikleri belirlendi. API20E test sisteminde oluşan renkler belirlenmiş anahtara (Ek-2) bakılarak pozitif veya negatif şeklinde değerlendirildi. API 20E test panellerinin pozitif ve negatif sonuçlarının görüntüsü EK-2 anahtar tabloya göre Şekil 17'de gösterilmiştir. Tablo 7'de ise izolatların API 20E panel test sistemindeki biyokimyasal test sonuçları görülmektedir.

3.2.1.3.2. Bakteriyal İzolatların API 50 CH Panel Test Sistemiyle Tespit Edilen Özellikleri

API 50 CH test panellerine yapılan ekimler 1 gece 30 °C'de inkübe edildikten sonra sıfır numaralı tüp kontrol olarak alındı ve renk değişimi olan tüpler pozitif sonuç olarak değerlendirildi. API 50 CH test panellerinde eğer bakteri tüpte olan şekeri (Ek-3) kullandıysa sarı renk, kullanmadıysa kırmızı renk oluşmaktadır.



Şekil 17. Bakteriyal izolatların API 20E test sistemi sonuçları. Pozitif (üstte) ve negatif (altta) görüntüler

Büyümesi yavaş olan izolatların sonuçları inkübatörde 2 gece inkübe edildikten sonra kaydedildi. API 50CHB test panellerinin pozitif ve negatif sonuçlarının panel üzerindeki görüntüsü Şekil 18’de gösterilmektedir. Tablo 9’da ise izolatların API 50CHB panel test sistemindeki biyokimyasal test sonuçları görülmektedir.



Şekil 18. Bakteriyal izolatların API 50CHB test sistemi sonuçları. Pozitif (solda) ve negatif (sağda) görüntüler

Tablo 7. Bakteriyal izolatların API20E panel test sistemi ile belirlenen özellikleri

Testler	Substrat	Aktivite	Lb4	Lb6	Lb12	Lb13	Lb15	Lb17	Lb21
ONPG	ONPG	Beta-galaktosidaz	-	Z+	+	-	+	+	+
ADH	Arginin	Arginin dihidrolaz	+	-	+	-	Z+	+	-
LDC	Lisin	Lisin dekarboksilaz	-	+	-	-	+	-	+
ODC	Ornitin	Ornitin dekarboksilaz	-	-	+	-	+	+	+
CIT	Sitrat	Sitrat kullanımı	-	+	+	-	+	+	+
H ₂ S	Na thiosulfate	H ₂ S üretimi	-	-	-	-	-	-	-
URE	Üre	Üre hidrolizi	-	+	-	+	-	-	-
TDA	Triptofan	Deaminaz	-	-	-	-	-	-	-
IND	Triptofan	İndol üretimi	-	-	-	-	-	-	-
VP	Na piruvat	Aseton üretimi	+	+	+	-	+	+	+
GEL	Kömür jelatin	Jelatinaz	+	-	-	-	-	-	+
GLU	Glukoz	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	+	-	+	+	+
MAN	Mannitol	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	+	-	+	+	+
INO	İnositol	Fermantasyon / oksidasyon	-	+	-	-	+	-	-
SOR	Sorbitol	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	+	-	+	+	+
RHA	Ramnoz	Fermantasyon / oksidasyon	-	+	-	-	+	+	-
SAC	Sucrose	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	+	-	+	+	+
MEL	Melibiose	Fermantasyon / oksidasyon	-	+	+	-	+	+	+
AMY	Amigdalin	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	+	-	+	+	+
ARA	Arabinoz	Fermantasyon / oksidasyon	-	+	+	-	+	+	-
NO ₂	NO ₃	Nitrattan amonyuma indirgeme	-	+	+	+	+	+	+
N ₂	NO ₃	Nitrattan moleküler azota indirgeme	+	-	-	-	-	-	-
Oxidase	O ₂	oksidasyon	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	H ₂ O ₂	Hidrojenperoksid redüksiyon	-	+	+	+	+	+	+

Z+: Zayıf pozitif

API20E çeşitli şeker fermentasyon testlerinde Ld13 kodlu bakterinin şekerleri fermente etmediği (negatif sonuç) ve diğer bakteri izolatlarının çoğunlukla fermente ettikleri belirlendi.

API sisteminde Gram olumlu bakterilerin tanımlanması için API 50CHB'nin uygulanması gereklidir. Tablo 8'de izole edilen Gram olumsuz Lb4 ve Lb13 kodlu bakterilerin API 50 CHB panel test sistemindeki biyokimyasal test sonuçları görülmektedir.

Tablo 8. İzolatların API50CH panel test sistemi ile belirlenen özellikleri

Testler	Açık Adı	Lb4	Lb13
GLY	glycerol	+	+
ERY	erythriol	-	-
DARA	D-arabinose	-	-
LARA	L-arabinose	-	-
RIB	D-ribose	+	+
DXYL	D-xylose	-	-
LXYL	L-xylose	-	-
ADO	D-adonitol	-	-
MDX	methyl- β D-xylopyranoside	-	-
GAL	D-galactose	+	-
GLU	D-glucose	+	+
FRU	D-fructose	+	+
MNE	D-mannose	+	+
SBE	L-sorbose	-	-
RHA	L-rhamnose	-	-
DUL	dulcitol	-	-
INO	inosidol	-	-
MAN	D-mannitol	+	+
SOR	D-sorbitol	+	+
MDM	methyl- α D-mannopyranoside	-	-
MDG	methyl- α D-glucopyranoside	-	-
NAG	N-asetylglucosamine	+	+
AMY	amygdalin	+	+
ARB	arbutin	+	+
ESC	esculin-ferric sitrate	+	+
SAL	salisin	+	+
CEL	D-celiobiose	+	+
MAL	D-maltose	+	-
LAC	D-lactose(bovineorgine)	+	-
MEL	D-melibiose	+	-
SAC	D-saccharose(sucrose)	-	-
TRE	D-trehalose	-	+
INU	inulin	-	Z+
MLZ	D-melezitoz	-	Z+

Tablo 8'in devamı

RAF	D-raffinose	+	Z+
AMD	amidon(starch)	-	Z+
GLYG	glycogen	-	-
XLT	xylitol	+	-
GEN	gentiobiose	-	+
TUR	D-turanose	-	-
LYX	D-lyxose	+	-
TAG	D-tagatose	-	+
DFUG	D-fucose	-	-
LFUC	L-fucose	-	-
DARL	D-arabitol	-	-
LARL	L-arabitol	+	-
GNT	potassium gluconate	+	+
2KG	potassium 2- ketogluconate	-	Z+

Z+: zayıf pozitif

API test kitlerinden elde edilen sonuçlar API Software programında değerlendirilerek izolatların tanımlaması yapıldı. İzolatların benzerlik gösterdiği bakteriler Tablo 11'de verildi. Bazı izolatların tanımlanmasında şüphe yaşanması nedeni ile bu izolatlara VITEK-2 testi yapıldı. Ancak, Lb13'ün tanımlanması kesin olduğundan dolayı bunun için VITEK-2 testine gerek kalmadı.

VITEK-2 panel test sistemi ile tam otomatik olarak bakterilerin asidifikasyon, alkalinizasyon, enzim hidrolizi gibi çeşitli metabolik aktiviteleri belirlendi ve kendi veritabanı üzerinde sonuçlar değerlendirildi. Gram olumlu sporsuz kok ve basil bakteriler için VITEK-2 GP kartı, Gram olumsuz kok ve basil bakteriler içinse VITEK-2 GN kartı kullanılarak bazı biyokimyasal özellikler test edildi.

VITEK-2 panel test sistemi sonuçları ve bakterilere ait bazı biyokimyasal testler bilgisayar tarafından otomatik olarak değerlendirilerek izolatların tanımlaması sağlandı ve sonuçlar Tablo 9 ve 10'da verildi.

Tablo 9. Gram olumlu sporsuz bakteriyal izolatların VITEK-2 test sonuçları

Test	Açık Adı	Lb4
AMY	D –Amygdalin	+
PIPLC	Phosphatidylinositol Phospholipase C	+
dXYL	D-Xylose	-
ADH1	Arginine Dihydrolase 1	+
BGAL	Beta-Galactosidase	-
AGLU	Alpha-Glukosidase	-
APPA	Ala-Phe- Arylamidase	-
CDEX	Cyclodextrin	-
AspA	L-Aspartate Arylamidase	+
BGAR	Beta-Galactopyranosidase	-
AMAN	Alpha-Mannosidase	-
PHOS	Phosphatase	
LeuA	Leusine Arylamidase	
ProA	L-Proline Arylamidase	-
BGURr	Beta Glucuronidase	-
AGAL	Alpha-Galactosidase	-
PyrA	L-Pyrrolidonyl-Arylamidase	+
BGUR	Beta Glucuronidase	-
AlaA	Alanine Arylamidase	+
TyrA	Tyrosine Arylamidase	+
dSOR	D-Sorbitol	+
URE	Urease	-
POLYB	Polymixin B Resistance	+
dGAL	D-Galactose	+
dRIB D-Ribose	D-Ribose	+
ILATk	L-Lactate Alkanization	-
LAC	Lactose	-
NAG	N-Acetyl-D-Glucosamine	+
dMAL	D-Maltose	+
BACI	Bacitrasin Resistance	+
NOVO	Novobiosin Resistance	+
NC6.5	Growth in 6.5% NaCl	+
dMAN	D-Mannitol	+
dMNe	D-Mannose	+

Tablo 9'un devamı

MBdG	Methyl-B-D-Glucopyranosidase	+
PUL	Pullulan	-
dRAF	D-Raffinose	-
O129R	O/129 Resitance	-
SAL	Salicin	+
SAC	Saccharose	+
dTRE	D-Trehalose	+
ADH2s	Arginine Dihydrolase 2	+
OPTO	Optochin Resistance	+

Tablo 10. Gram olumsuz bakteriyal izolatların VITEK-2 sonuçları

Testler	Açık adı	Lb6	Lb12	Lb15	Lb17	Lb21
APPA	Ala-Phe-Pro Arylamidase	-	-	-	-	-
ADO	Adonitol	+	-	+	-	+
PyrA	L-Pyrrolidonyl-Arylamidase	+	-	+	-	+
IARL	L-Arabitol	+	-	-	-	+
dCEL	D-Cellobiose	+	+	+	+	-
BGAL	Beta-Galactosidase	+	+	+	+	-
H2S	H2S Production	-	-	-	-	-
BNAG	Beta-N-Acetyl-Glucosamine	+	-	+	+	+
AGLTp	Glutamyl Arylamidase pNA	-	+	-	-	-
dGLU	D-Glukoz	+	+	+	+	+
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase	+	+	+	+	+
OFF	Fermantation/Glucose	+	+	+	+	+
BGLU	Beta-glucosidase	+	+	+	-	+
dMAL	D-Maltose	+	+	+	+	+
dMAN	D-Mannitol	+	+	+	+	+
dMNE	D-Mannose	+	+	+	+	+
BXYL	Beta-Xylosidase	+	+	+	+	-
Balap	Beta-Alanine Arylamidase pNA	-	-	-	-	-
ProA	L-Proline Arylamidase	+	+	-	+	+
LIP	Lipase	-	-	-	-	-
PLE	Palatinose	+	+	+	+	-
TyrA	Tyrosine Arylamidase	+	+	-	+	+

Tablo 10'un devamı

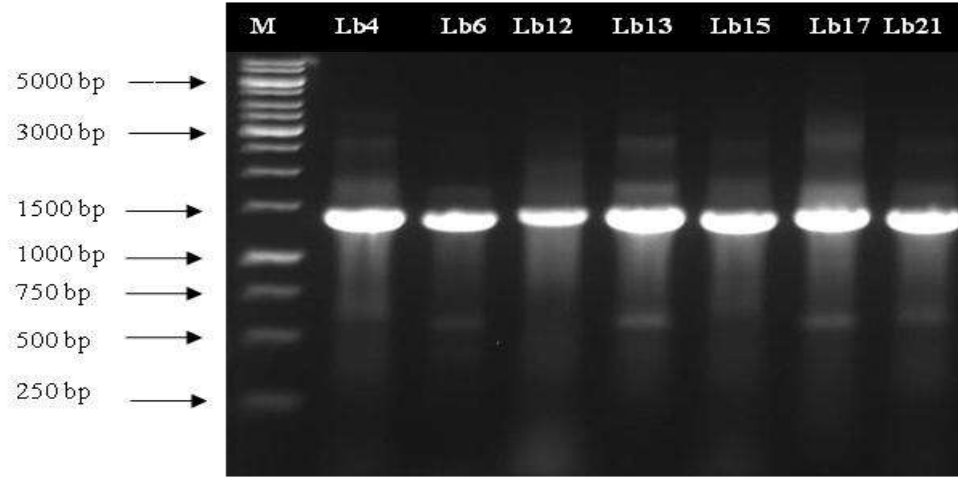
URE	Urease	-	-	-	-	-
dSOR	D-Sorbitol	+	+	+	+	+
SAC	Saccharose	+	+	+	+	+
dTAG	D-Tagatose	-	-	-	-	-
dTRE	D-Trehalose	+	+	+	+	+
CIT	Citrate	+	+	+	+	+
MNT	Malonate	+	-	+	+	-
5KG	5-Keto-D-Gloconate	+	-	-	-	+
ILATk	L-Laktate Alkalinisation	+	+	+	+	+
AGLU	Alpha-Glucosidase	-	-	-	-	-
SUCT	Succinate Alkalinisation	+	+	+	+	+
NAGA	Beta-N-Acetyl-Galactosaminidase	-	+	-	-	-
AGAL	Alpha-Galactosidase	+	+	+	+	-
PHOS	Phosphatase	+	+	+	-	-
GlyA	Glycine Arylamidase	+	+	-	+	-
ODC	Ornithine Decarboxylase	-	+	+	+	+
LDC	Lysine Decarboxylase	+	-	+	-	+
IHISa	L-Histidine assimilation	+	-	-	-	-
CMT	Coumarate	-	-	-	-	+
BGUR	Beta Glucuronidase	-	-	-	-	-
O129R	O/129 Resistance	+	+	+	+	+
GGAA	Glu-Gly-Arg-Arylamidase	-	-	-	-	+
IMLTa	L-Malate Assimilation	+	-	-	-	-
ELLM	Ellman	-	-	-	-	-
ILATa	L-Laktate Assimilation	+	-	-	-	-

3.2.1.4. İzolatların Moleküler Özellikleri

3.2.1.4.1. Bakteriyal İzolatların 16S rRNA Gen Dizileri

Bakteri sistematiği çalışmalarında 16S rRNA genlerinin baz dizilerinin ortaya çıkarılması önemli genetiksel özelliklerin başında gelir. Bakteriyal izolatların DNA kullanılarak PCR yardımı ile 16S rRNA genleri (yaklaşık olarak 1400 bp) çoğaltıldı (Şekil

19). İzolatların 16S rRNA genlerinin dizilerine göre Gen Bankasındaki diğer bakterilere olan benzerlikleri Tablo 11’de gösterilmiştir.



Şekil 19. *Lobesi botrana*’dan elde edilen bakteriyel izolatların PCR ile çoğaltılan 16S rRNA gen dizileri. %1’lik agaroz jeldeki görüntüler (M: Marker; 1000 bp DNA ladder)

Tablo 11. *Lobesi botrana*’dan elde edilen bakteriyel izolatların 16S rRNA gen dizilerine göre gen bankasındaki diğer bakteriler ile benzerlikleri

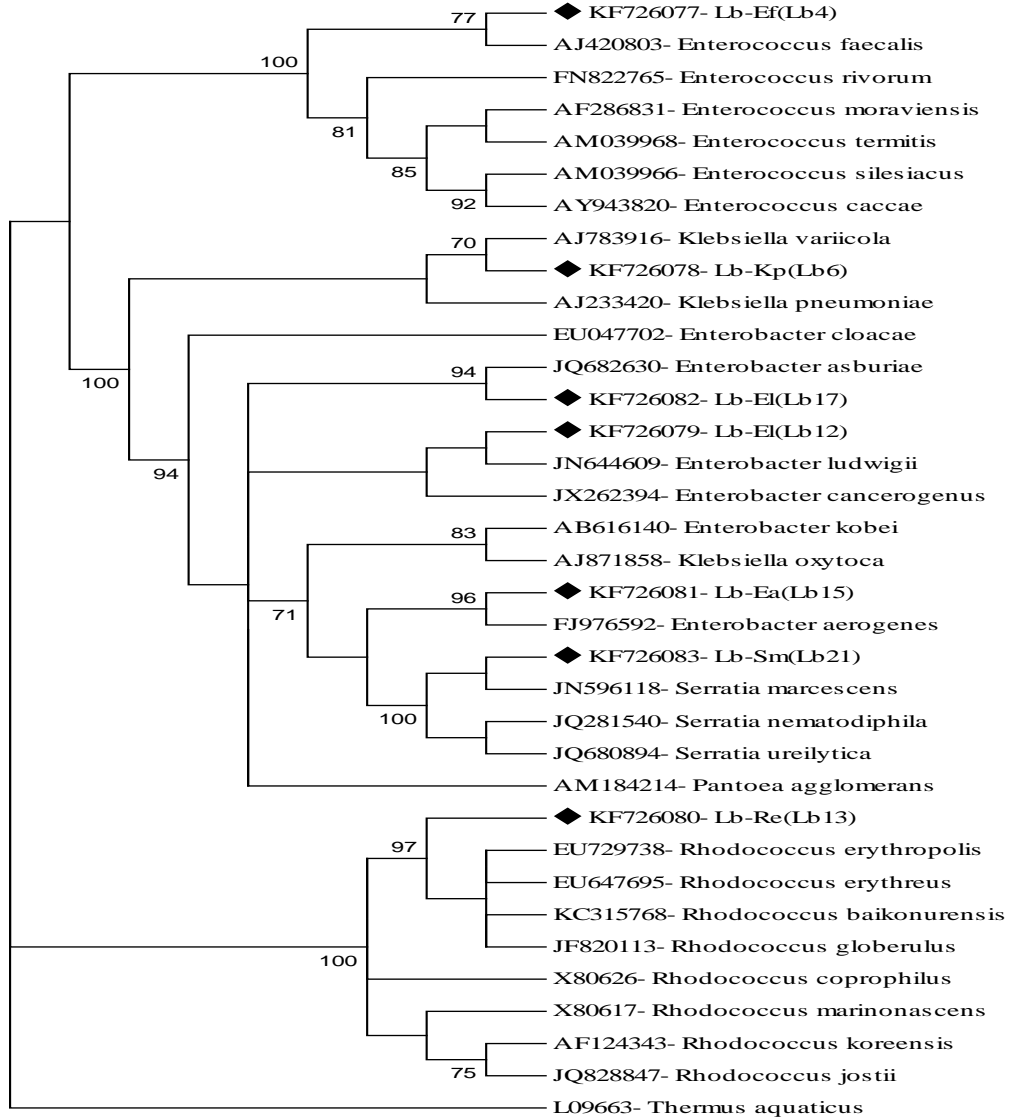
İzolat	Gen bankasının 16 S rRNA dizin analizine ve önerdiği tür ve cinsler	Accession numarası	Benzerlik Oranı %	API & VITEK2 sonuçları	sonuç
Lb4	<i>Enterococcus faecalis</i>	AJ420803	100%	<i>Enterococcus faecalis</i> ,	<i>Enterococcus faecalis</i>
	<i>Enterococcus rivorum</i>	FN822765.1	98%		
	<i>Enterococcus moraviensis</i>	AF286831	97%	<i>Bacillus licheniformis</i>	
	<i>Enterococcus silesiacus</i>	AM039966	97%		
	<i>Enterococcus termitis</i>	AM039968	97%		
	<i>Enterococcus caccae</i>	AY943820	97%		
Lb6	<i>Klebsiella variicola</i>	AJ783916	99%	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AJ233420	99%		
	<i>Enterobacter cloacae</i>	HE978272.1	98%		

Tablo 11'in devamı

Lb12	<i>Enterobacter ludwigii</i>	JN644609.1	97%	<i>Enterobacter cloacae</i> complex (<i>E. cloacae</i> , <i>E. asburiae</i> , <i>E. hormaechei</i> , <i>E. kobei</i> , <i>E. ludwigii</i> ve <i>E. nimipressuralis</i>)	<i>Enterobacter ludwigii</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i>	GU186117.1	96%		
	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	FJ009374.1	96%		
	<i>Pantoea agglomerans</i>	AM184214	96%		
Lb13	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	EU729738K	100%	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
	<i>Rhodococcus baikonurensis</i>	C315768	100%		
	<i>Rhodococcus globerulus</i>	JF820113	100%	<i>Bacillus lentus</i>	
	<i>Rhodococcus erythreus</i>	EU647695	99%		
	<i>Rhodococcus coprophilus</i>	X80626	99%		
	<i>Nocardia calcarea</i>	AB037105	98%		
Lb15	<i>Enterobacter aerogenes</i>	FJ976592	99%	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	JQ680798	99%		
	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	JQ682639	99%		
	<i>Enterobacter hormaechei</i>	AJ853890	99%		
	<i>Enterobacter cloacae</i>	EU073021	98%		
	<i>Enterobacter asburiae</i>	HM854374	98%		
Lb17	<i>Enterobacter ludwigii</i>	JX500182	99%	<i>Enterobacter cloacae</i> complex (<i>E. cloacae</i> , <i>E. asburiae</i> , <i>E. hormaechei</i> , <i>E. kobei</i> , <i>E. ludwigii</i> ve <i>E. nimipressuralis</i>)	<i>Enterobacter ludwigii</i>
	<i>Enterobacter asburiae</i>	JQ682630	99%		
	<i>Enterobacter hormaechei</i>	JF690889	99%		
	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	JX262394	99%		
	<i>Enterobacter cloacae</i>	EU047702	99%		
	<i>Enterobacter kobei</i>	JQ680938	98%		
Lb21	<i>Serratia marcescens</i>	JN596118	99%	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
	<i>Serratia ureilytica</i>	JQ680894	99%		
	<i>Serratia nematodiphila</i>	JQ281540	99%		

3.2.1.4.2. Taksonomik Karakterizasyon

İzolatların filogenetik olarak pozisyonlarını gösterebilmek için elde edilen 16S rRNA gen dizileri kullanılarak Mega 5 programı yardımıyla maksimum-likelihood analizi gerçekleştirildi ve izolatlara ait filogenetik ağaç çizildi (Şekil 20).

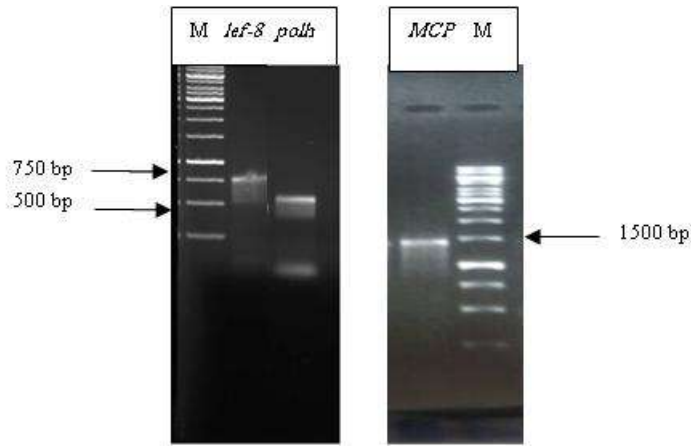


Şekil 20. Bakteriyal izolatların filogenetik analizi. 16S rRNA gen bölgesi kullanılarak maximum-likelihood analizi yapılmıştır (Bootstrap metodu ile 1000 tekrarlı olarak gerçekleştirildi). *L. botrana* izolatları (Lb4, 6, 12, 13, 15, 17, 21) ◆ ile gösterilmiştir.

3.3. *Lobesia botrana* Larvalarının Virüs Araştırmaları Sonucu

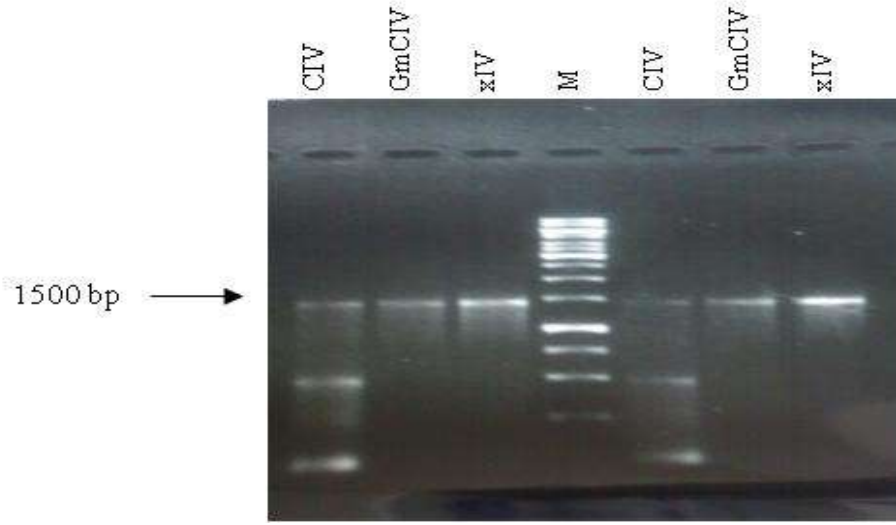
Direk doku PCR yöntemi ile elde edilen PCR ürünlerinin 5 µl'si %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür boyası (0,5 µg/ml) ile boyandıktan sonra "BioDocAnalyze" sistemiyle görüntüledi.

Muhtemel oluşan bantlar Şekil 21'de gösterilen ağırlıklarda (Tablo 3) olması bekleniyordu.



Şekil 21. *L.botrana*'da doku PCR sonucu *lef-8*, *polh* ve *MCP* gen ürünleri

Tez çalışması kapsamında yapılan virüs araştırmaları sonucunda virüs enfeksiyonuna rastlanılmıştır. Uygun yöntemlerle izole edilen virüs DNA'sı jel elektroforezinin ardından yapılan görüntüleme DNA'nın, CIV'ye (*Chilo Iridescent* virüs) ait olma ihtimali üzerinde durulmuş, fakat yapılan doku PCR deneyleri sonucunda çoğaltılan DNA'nın jelden temizlenmesi aşaması başarısız olmuştur. Bu denemenin ardından herhangi bir viral enfeksiyona rastlanılamamıştır (Şekil 22).



Şekil 22. PCR ile çoğaltılan *mcp* geni. CIV: kontrol CIV virüsünden, GmCIV: *Galleria melonella*'dan izole edilen CIV'den, xIV: *L. Botrana*'dan izole edilen muhtemel CIV, M: Marker; 1000 bp DNA ladder

3.4. Mikrobiyal İzolatların *Lobesia botrana* Üzerindeki İnsektisidal Etkileri

Yapılan arazi çalışmaları sonucunda laboratuara getirilen *L. botrana* larvaları üzerinde kendinden izole edilen bakteriyel izolatların yanı sıra, Karadeniz Teknik Üniversitesi Mikrobiyoloji laboratuvarı mikroorganizma koleksiyonunda bulunan çeşitli bakteriler, funguslar ve virüslerde test edildi.

3.4.1. *Lobesia botrana*'dan İzole Edilen Bakteri İzolatlarının İnsektisidal Etkileri

Elde edilen izolatların uygulanması amacıyla farklı coğrafik bölgelerden toplanan sağlıklı 3. ve 4. evre larvalar seçilerek kullanıldı. Toplanan larvalar hazırlanan plastik petri kaplarına aktarıldı ve her bir izolatın insektisidal etkisi 10 gün boyunca günlük takip edilerek ölüm oranları kaydedildi.

L. botrana'nın izolatları arasında Lb21 (*Serratia marcescens*) izolatının %93 ölüm oranıyla en yüksek öldürücü etkiye sahip olduğu belirlendi. Bunu %87 ölüm oranlarıyla Lb12 (*Entrobacter ludwigii*) ve Lb17 (*Entrobacter ludwigii*) takip etti. İstatistik analizler bu

izolatların kontrol grubu ile anlamlı farkları olduklarını gösterdi ($P < 0.05$). Ancak, Lb4 (*Enterococcus faecalis*), Lb6 (*Klebsiella pneumonia*), Lb15 (*Enterobacter aerogenes*) ve Lb13 (*Rhodococcus erythropolis*) sırasıyla gösterdikleri %70, %77, %73 ve %63'lük insektisidal etkiler ile kontrol gurubu ile anlamsız bir fark oluşturmuşlardır. Kontrol grubu %57'lik bir ölüm oranı ortaya koymuştur (Tablo 12).

Tablo 12. Bakterilerin *L. botrana* üzerindeki insektisidal etkileri

İzolatlar	ölüm oranı %	Anlamlılık (P)	Ki-Kare değeri
Lb4	70	0.211	1.56
Lb6	77	0.099	2.7
Lb12	87	0.013*	6.1
Lb13	63	0.614	0.25
Lb15	73	0.240	1.37
Lb17	87	0.019*	5.5
Lb21	93	0.000*	16.18
MnD	100	0.000*	31.73
BnBt	100	0.000*	47.47
Kontrol	57		

*Anlamlılık, uygulanan konsantrasyon: 1.8×10^9 bakteri/ml

3.4.2. Diğer Zararlılardan İzole Edilen Entomopatojen Bakterilerin *Lobesia botrana* Larvaları Üzerindeki İsektisidal Etkileri

KTÜ-Mikrobiyoloji laboratuvarı koleksiyonunda mevcut olan ve başka zararlılardan izole edilmiş bakteriyal izolatların *Lobesia botrana* üzerindeki insektisidal etkileri'de yukarıdaki gibi belirlendi. Daha önce gerçekleştirilen insektisidal aktivite çalışmalarında Lepidoptera'larda yüksek öldürücü etkiye sahip olan *Malacosoma neustria* ile *Balaninus nucum*'dan izole edilmiş *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* suşları (MnD ve BnBt) kullanıldı. İzolatların (MnD ve BnBt) zararlı üzerinde %100 ölüm etkisine sahip oldukları belirlendi (Tablo 12). İstatistiksel analizler bu izolatların kontrol grubu ile anlamlı farkları olduklarını gösterdi ($P = 0.000$).

Ayrıca bakterilerin etkisinin çift karşılaştırılması için Kaplan-Meier modeli kullanıldı (Tablo 13). BnBt ve MnD izolatları diğer tüm bakterilerden anlamlı farka sahip oldukları belirlendi ($P < 0.05$). Aynı zamanda Lb21, Lb12 ve Lb17 numaralı izolatlarda da anlamlı farklar bulunmuştur (Tablo 13).

L. botrana'dan izole edilen bakterilerin *L. botrana* üzerindeki 10 gün boyunca etkinlikleri Tablo 14'de gösterilmiştir. İzolatların ilk 6 günde daha etkili oldukları belirlenmiştir.

Tablo 13. *L. botrana*'dan izole edilen bakterilerin *L. botrana* üzerindeki insektisidal etkilerinin çift karşılaştırması

Group	Kontrol		Lb 4		Lb 6		Lb 12		Lb 13		Lb 15		Lb 17		Lb 21		MND		BnBt	
	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	Kontrol		.644	.422	1.271	.260	4.406	.036	.002	.963	.697	.404	4.085	.043	12.773	.000	31.738	.000	47.471	.000
	Lb 4	.644	.422		.155	.694	1.725	.189	.712	.399	.008	.929	1.614	.204	8.427	.004	32.553	.000	47.264	.000
	Lb 6	1.271	.260	.155	.694		.925	.336	1.715	.190	.288	.591	.893	.345	7.415	.006	37.301	.000	52.308	.000
	Lb 12	4.406	.036	1.725	.189	.925	.336		5.290	.021	2.218	.136	.000	.991	3.289	.070	27.598	.000	43.579	.000
	Lb 13	.002	.963	.712	.399	1.715	.190	5.290	.021		.726	.394	5.509	.019	13.792	.000	37.436	.000	51.511	.000
	Lb 15	.697	.404	.008	.929	.288	.591	2.218	.136	.726	.394		2.314	.128	9.386	.002	37.009	.000	50.008	.000
	Lb 17	4.085	.043	1.614	.204	.893	.345	.000	.991	5.509	.019	2.314	.128		3.919	.048	33.490	.000	49.607	.000
	Lb 21	12.773	.000	8.427	.004	7.415	.006	3.289	.070	13.792	.000	9.386	.002	3.919	.048		6.811	.009	20.360	.000
	MND	31.738	.000	32.553	.000	37.301	.000	27.598	.000	37.436	.000	37.009	.000	33.490	.000	6.811	.009		12.272	.000
	BnBt	47.471	.000	47.264	.000	52.308	.000	43.579	.000	51.511	.000	50.008	.000	49.607	.000	20.360	.000	12.272	.000	

Tablo 14. Bakterilerden etkilenen *L. botrana* larvaları'nın canlılık tablosu.

Group	Gün	örnek sayısı	Ölü sayısı	Toplam canlılık paydası	Group	Gün	örnek sayısı	Ölü sayısı	Toplam canlılık paydası
Kontrol	0	30	0	1.00	Lb 13	0	30	0	1.00
	1	30	0	1.00		1	30	1	.97
	2	30	2	.93		2	29	1	.93
	3	28	7	.70		3	28	3	.83
	4	21	4	.57		4	25	6	.63
	5	17	0	.57		5	19	1	.60
	6	17	2	.50		6	18	0	.60
	7	15	2	.43		7	18	7	.37
	8	13	0	.43		8	11	0	.37
	9	13	0	.43		9	11	0	.37
	10	13	0	.43	10	11	0	.37	
Lb4	0	30	0	1.00	Lb15	0	30	0	1.00
	1	30	1	.97		1	30	2	.93
	2	29	3	.87		2	28	0	.93
	3	26	2	.80		3	28	4	.80
	4	24	6	.60		4	24	3	.70
	5	18	4	.47		5	21	5	.53
	6	14	2	.40		6	16	3	.43
	7	12	3	.30		7	13	4	.30
	8	8	0	.30		8	9	1	.27
	9	4	0	.30		9	8	0	.27
	10	4	0	.30	10	8	0	.27	
Lb6	0	30	0	1.00	Lb17	0	30	0	1.00
	1	30	1	.97		1	30	0	1.00
	2	29	0	.97		2	30	1	.97
	3	29	4	.83		3	29	7	.73
	4	25	8	.57		4	22	6	.53
	5	17	4	.43		5	16	4	.40
	6	13	3	.33		6	12	6	.20
	7	10	3	.23		7	6	2	.13
	8	7	0	.23		8	4	0	.13
	9	6	0	.23		9	4	0	.13
	10	6	0	.23	10	4	0	.13	
Lb12	0	30	0	1.00	Lb21	0	30	0	1.00
	1	30	1	.97		1	30	7	.77
	2	29	3	.87		2	23	4	.63
	3	26	4	.73		3	19	6	.43
	4	22	7	.50		4	13	4	.30
	5	15	3	.40	5	9	3	.20	

Tablo 14'ün devamı

	6	12	4	.27		6	6	1	.17
	7	8	3	.17		7	5	1	.13
	8	5	1	.13		8	4	2	.07
	9	4	0	.13		9	2	0	.07
	10	4	0	.13		10	2	0	.07
MnD	0	30	0	1.00	BnBt	0	30	0	1.00
	1	30	4	.87		1	30	21	.30
	2	26	12	.47		2	9	4	.17
	3	14	10	.13		3	5	4	.03
	4	4	4	.00		4	1	1	.00

3.4.3. Diğer Kaynaklardan Elde Edilen Entomopatojen Fungusların *Lobesia botrana* Larvaları Üzerindeki İnsektisidal Etkileri

L.botrana ile fungal mücadelede yeni bir etmen belirlemeye yönelik olarak yapılan bu çalışmada KTÜ-Mikrobiyoloji laboratuvarı koleksiyonunda mevcut olan bazı fungal izolatların *L. botrana* larvaları üzerindeki insektisidal etkileri araştırıldı. Bunun için özellikle daha önceki çalışmalarda patojenitesi yüksek olduğu belirlenen fungal izolatlar seçildi. *L. botrana* üzerindeki patojenite değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, *Myriodontum kerotinophylum* (Gg-11) izolatu hariç bütün izolatların kontrol grubundan farklı ölüm değerlerine sahip oldukları belirlendi ($p < 0,05$). Birbirleriyle karşılaştırıldıklarında ise izolatların *L. botrana* üzerinde istatistiksel olarak farklı ölüm oranlarına neden oldukları belirlendi. Testler sonucunda *Metarhizium anisopliae* (Gg-12), *Isaria fumosorosea* (Y-2)'nin *L. botrana* üzerinde %93'lük bir değer ile en yüksek ölüm etkisine sahip oldukları belirlendi ($p < 0,05$).

Ölü böcekler üzerindeki büyüme ve sporlaşma oranlarının (mikozlanma) karşılaştırılmasında da bütün izolatların kontrol grubundan anlamlı farkı oldukları ($p < 0,05$) ve aralarında değişik mikozlanma seviyeleri gösterdikleri tespit edildi ($p < 0,05$). *L. botrana* üzerinde %93 ölüm etkisi gösteren *Metarhizium anisopliae* (Gg-12) ve *Isaria fumosorosea* (Y-2)'da mikozlanma sırasıyla %93 ve %70'dir (Tablo 15).

Bakteriyel izolatlarda olduğu gibi funguslarda da etkinin çift karşılaştırılması için Kaplan-Meier modeli kullanıldı. Anlamlılık değerine dikkat edilirse izolatlar arasında anlamlı farklar bulunmaktadır ($P < 0.05$) (Tablo 16).

Fungusların en etkili oldukları dönemin çalışma döneminin ilk 6 günü olduğu gözlenmiştir (Tablo 17).

Tablo 15. Fungusların *L. botrana* üzerindeki insektisidal etkileri

Funguslar	10. Günde Ölüm %	Mikozlanma %	anlamlılık (P)	Ki -Kare değeri
Ardeşen (<i>Metarhizium anisopliae</i> KTU-2)	83	70	0.001*	10.335
ÇK (<i>Beauveria bassiana</i> KTU-24)	90	87	0.000*	14.700
53 (<i>Metarhizium anisopliae</i> KTU-40)	83	57	0.001*	10.335
117 (<i>Metarhizium anisopliae</i> KTU-21)	73	60	.018*	5.554
269 (<i>Metarhizium brunneum</i> KTU-60)	90	77	0.000*	14.700
4-Gm-a (<i>Metarhizium anisopliae</i>)	83	80	0.001*	10.335
68-b (<i>Isaria fumosorosea</i> KTU-42)	80	63	0.004*	8.531
287 (<i>Beauveria pseudobassiana</i> KTU-53)	73	53	.018*	5.554
Gg-12 (<i>Metarhizium anisopliae</i>)	93	93	0.000*	17.330
Gg-1 (<i>Beauveria bassiana</i>)	70	70	.034*	4.344
Y-2 (<i>Isaria fumosorosea</i>)	93	70	0.000*	17.330
Gg-11 (<i>Myriodontum kerotinophylum</i>)	77	67	.079	6.944
Kontrol	43	-	-	-

*Anlamlılık, uygulama konsantrasyonu: 1×10^7 spor/ml

Tablo 16. Fungusların *L. botrana* üzerindeki insektisidal etkilerinin çift karşılaştırması

Group	Ardeşen		117		Çk		287		269		Gg-12		Gg-1		68-b		4-Güm-a		53		Y-2		Gg-11		Kontrol			
	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.		
Ardeşen			1.643	.200			1.240	.266	2.270	.132	2.919	.088	.807	.369	.692	.405	2.766	.096	.015	.902	.027	.870	1.903	.168	8.029	.005	12.774	.000
117	1.643	.200			6.693	.010			.119	.730	8.928	.003	5.086	.024	.157	.692	.123	.726	1.791	.181	1.635	.201	.068	.795	1.627	.202	5.536	.019
Çk	1.240	.266	6.693	.010			8.435	.004	.630	.427	.316	.574	3.160	.075	9.068	.003	.863	.353	2.006	.157	8.567	.003	17.645	.000	20.544	.000		
287	2.270	.132	.119	.730	8.435	.004			10.498	.001	7.657	.006	.382	.537	.008	.931	2.647	.104	2.950	.086	.338	.561	1.108	.292	4.794	.029		
269	2.919	.088	8.928	.003	.630	.427	10.498	.001			1.292	.256	5.511	.019	10.939	.001	1.658	.198	3.093	.079	9.623	.002	18.398	.000	22.359	.000		
Gg-12	.807	.369	5.086	.024	.316	.574	7.657	.006	1.292	.256			2.482	.115	9.525	.002	.402	.526	.535	.465	7.424	.006	17.283	.000	19.278	.000		
Gg-1	.692	.405	.157	.692	3.160	.075	.382	.537	5.511	.019	2.482	.115			.182	.670	1.222	.269	.668	.414	.051	.821	1.265	.261	5.694	.017		
68-b	2.766	.096	.123	.726	9.068	.003	.008	.931	10.939	.001	9.525	.002	.182	.670			2.751	.097	2.566	.109	.859	.354	.748	.387	5.906	.015		
4-Güm-a	.015	.902	1.791	.181	.863	.353	2.647	.104	1.658	.198	.402	.526	1.222	.269	2.751	.097			.057	.811	1.149	.284	6.258	.012	12.236	.000		
53	.027	.870	1.635	.201	2.006	.157	2.950	.086	3.093	.079	.535	.465	.668	.414	2.566	.109	.057	.811		.946	.331	6.103	.013	11.205	.001			
Y-2	1.903	.168	.068	.795	8.567	.003	.338	.561	9.623	.002	7.424	.006	.051	.821	.859	.354	1.149	.284	.946	.331		3.907	.048	10.779	.001			
Gg-11	8.029	.005	1.627	.202	17.645	.000	1.108	.292	18.398	.000	17.283	.000	1.265	.261	.748	.387	6.258	.012	6.103	.013	3.907	.048		3.086	.079			
Kontrol	12.774	.000	5.536	.019	20.544	.000	4.794	.029	22.359	.000	19.278	.000	5.694	.017	5.906	.015	12.236	.000	11.205	.001	10.779	.001	3.086	.079				

Tablo 17. Funguslardan etkilenen *L. botrana* larvaları'nın canlılık tablosu

Group	Gün	örnek sayısı	Ölü sayısı	Toplam canlılık paydası	Group	Gün	örnek sayısı	Ölü sayısı	Toplam canlılık paydası
Kontrol	0	30	0	1.00	269	0	30	0	1.00
	1	30	1	.97		1	30	7	.77
	2	29	2	.90		2	23	12	.37
	3	27	2	.83		3	11	2	.30
	4	25	4	.70		4	9	2	.23
	5	21	0	.70		5	7	2	.17
	6	21	0	.70		6	5	1	.13
	7	21	1	.67		7	4	1	.10
	8	20	3	.57		8	3	0	.10
	9	17	0	.57		9	3	0	.10
	10	17	0	.57	10	3	0	.10	
Ardeşen	0	30	0	1.00	Gg-12	0	30	0	1.00
	1	30	3	.90		1	30	1	.97
	2	27	7	.67		2	29	9	.67
	3	20	5	.50		3	20	3	.57
	4	15	3	.40		4	17	6	.37
	5	12	1	.37		5	11	6	.17
	6	11	3	.27		6	5	2	.10
	7	8	3	.17		7	3	0	.10
	8	5	0	.17		8	3	0	.10
	9	5	0	.17		9	3	1	.07
	10	5	0	.17	10	2	0	.07	
117	0	30	0	1.00	Gg-1	0	30	0	1.00
	1	30	1	.97		1	30	2	.93
	2	29	2	.90		2	28	10	.60
	3	27	7	.67		3	18	2	.53
	4	20	3	.57		4	16	2	.47
	5	17	5	.40		5	14	3	.37
	6	12	2	.33		6	11	1	.33
	7	10	1	.30		7	10	0	.33
	8	9	0	.30		8	10	0	.33
	9	9	1	.27		9	10	1	.30
	10	8	0	.27	10	9	0	.30	
Çk	0	30	0	1.00	68-b	0	30	0	1.00
	1	30	3	.90		1	30	1	.97
	2	27	9	.60		2	29	2	.90
	3	18	9	.30		3	27	3	.80
	4	9	2	.23		4	24	2	.73
	5	7	1	.20		5	22	4	.60
	6	6	1	.17		6	18	5	.43
	7	5	2	.10	7	13	0	.43	

Tablo 17'nin devamı

	8	3	0	.10		8	13	3	.33
	9	3	0	.10		9	10	0	.33
	10	3	0	.10		10	10	4	.14
287	0	30	0	1.00	4-Güm-a	0	30	0	1.00
	1	30	1	.97		1	30	9	.70
	2	29	2	.90		2	21	2	.63
	3	27	3	.80		3	19	3	.53
	4	24	4	.67		4	16	4	.40
	5	20	6	.47		5	12	2	.33
	6	14	5	.30		6	10	2	.27
	7	9	0	.30		7	8	0	.27
	8	9	0	.30		8	8	2	.20
	9	9	0	.30		9	6	1	.17
	10	9	1	.24		10	5	0	.17
53	0	30	0	1.00	Y-2	0	30	0	1.00
	1	30	4	.87		1	30	0	1.00
	2	26	4	.73		2	30	2	.93
	3	22	4	.60		3	28	1	.90
	4	18	9	.30		4	27	7	.67
	5	9	1	.27		5	20	3	.57
	6	8	0	.27		6	17	3	.47
	7	8	0	.27		7	14	0	.47
	8	8	1	.23		8	14	9	.17
	9	7	1	.20		9	5	0	.17
	10	6	1	.14		10	5	3	.04
Gg-11	0	30	0	1.00					
	1	30	1	.97					
	2	29	0	.97					
	3	29	1	.93					
	4	28	2	.87					
	5	26	6	.67					
	6	20	0	.67					
	7	20	0	.67					
	8	20	11	.30					
	9	9	0	.30					
	10	9	2	.19					

3.4.4. Bazı Entomopatojen Virüslerin *Lobesia botrana* Larvaları Üzerindeki İnsektisidal Etkileri

Lobesia botrana ile viral mücadelede yeni bir etmen belirlemeye yönelik olarak bu çalışmada KTÜ-Mikrobiyoloji laboratuvarı kolleksiyonunda mevcut olan farklı viral izolatların *L. botrana* larvaları üzerindeki insektisidal etkileri araştırıldı.

Bu amaca yönelik olarak seçilen Baculoviridae familyasından *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirüs (LydiNPV), *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirüs (HycuNPV), *Malacosoma neustria* nucleopolyhedrovirüs (ManeNPV) ve Iridoviridae familyasından *Chilo iridescent virüs* (CIV) *L. botrana*'ya karşı test edildi. *L. botrana* üzerindeki patojenite değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, bütün izolatların kontrol grubundan farklı ölüm değerlerine sahip oldukları belirlendi ($p < 0,05$). Birbirleriyle karşılaştırıldıklarında ise izolatların *L. botrana* üzerinde istatistiksel olarak ölüm oranlarına neden oldukları anlamsız farklılık tespit edildi ($p > 0,05$). Testler sonucunda CIV'nin *L. botrana* üzerinde %90'lık yüksek ölüm etkisine sahip olduğu belirlendi. LydiNPV, HycuNPV ve ManeNPV ise sırasıyla %83, %83 ve %80'lik ölümlere sebep oldukları belirlendi (Tablo 18).

Virüslerin etkisinin çift karşılaştırılması için de Kaplan-Meier modeli kullanıldı fakat izolatlar arasında anlamlı fark bulunamadı ($P > 0.05$) (Tablo 19). Virüslerinde en etkili oldukları dönemin çalışmanın ilk 6 günü olduğu gözlemlendi (Tablo 20).

Tablo 18. Virüslerin *L. botrana* larvaları üzerindeki insektisidal etkileri

Virüsler	10.Günde Ölüm %	Anlamlılık (P)	Ki -kare değeri
LydiNPV	83	0 .001*	10.355
ManeNPV	80	0.004*	8.531
CIV	90	0 .000*	14.700
HycuNPV	83	0 .001*	10.355
Kontrol	43	-	-

*Anlamlılık

Tablo 19. Virüslerin *L. botrana* üzerindeki insektisidal etkilerinin çift karşılaştırması

	Group	LydNPV		ManeNPV		CIV		HycuNPV		Kontrol	
		Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.	Ki-Kare	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	LydNPV			.215	.643	1.759	.185	.002	.965	7.969	.005
	ManeNPV	.215	.643			3.316	.069	.049	.825	6.454	.011
	CIV	1.759	.185	3.316	.069			2.199	.138	15.296	.000
	HycuNPV	.002	.965	.049	.825	2.199	.138			8.006	.005
	Kontrol	7.969	.005	6.454	.011	15.296	.000	8.006	.005		

Tablo 20. Virüslerden etkilenen *L. botrana* larvaları'nın yaşam tablosu

Group	Gün	Örnek sayısı	Ölü sayısı	Toplam canlılık paydası	Group	Gün	Örnek sayısı	Ölü sayısı	Toplam canlılık paydası
Kontrol	0	30	0	1.00	CIV	0	30	0	1.00
	1	30	0	1.00		1	30	4	.87
	2	30	2	.93		2	26	6	.67
	3	28	2	.87		3	20	0	.67
	4	26	4	.73		4	20	9	.37
	5	22	0	.73		5	11	2	.30
	6	22	5	.56		6	9	2	.23
	7	16	0	.56		7	7	1	.20
	8	15	0	.56		8	6	2	.13
	9	12	0	.56		9	4	1	.10
	10	12	0	.56	10	3	0	.10	
LydNPV	0	30	0	1.00	HycuNPV	0	30	0	1.00
	1	30	1	.97		1	30	2	.93
	2	29	0	.97		2	28	4	.80
	3	29	9	.67		3	24	0	.80
	4	20	3	.57		4	24	5	.63
	5	17	2	.50		5	19	4	.50
	6	15	3	.40		6	15	6	.30
	7	12	3	.30		7	9	0	.30

Tablo 20'nin devamı

	8	9	3	.20		8	9	1	.27
	9	6	1	.17		9	8	3	.17
	10	5	0	.17		10	5	0	.17
ManeNPV	0	30	0	1.00					
	1	30	1	.97					
	2	29	0	.97					
	3	29	9	.67					
	4	20	3	.57					
	5	17	2	.50					
	6	15	3	.40					
	7	12	3	.30					
	8	9	3	.20					
	9	6	1	.17					
	10	5	0	.17					

4. TARTIŞMA

Dünya nüfusunun 2050 yılında 9.6 milyara ulaşacağı tahmin edilirken, artan nüfusun besin ihtiyacını karşılamak için mevcut gıda miktarında %70 oranında bir artışın gerektiği belirtilmektedir. Dünya Kaynakları Enstitüsü (WRI) tarafından açıklanan rapora göre, hızla artan dünya nüfusunun besin ihtiyacını karşılamak için daha fazla sürdürülebilir gıda kaynağına ve üretime ihtiyaç duyulmaktadır. Artan nüfusun ihtiyaçları konusunda yetersizliğe sürüklenen tarımsal üretimdeki artış; giderek kirlenen dünya, azalan tarım arazileri ve değişen iklim koşulları nedenleri etkisiyle de giderek yavaşlamaktadır (URL10). Aynı zamanda yapılan çalışmalara rağmen, tarımsal zararlılardan dolayı üretimde istenilen oranda artış sağlanamamaktadır.

Tarım zararlıları için kullanılan kimyasallar sadece zararlıları değil, bunları baskı altında tutan faydalı böcekleri de doğrudan ve dolaylı olarak etkilemektedir. Böylece, doğal denge bozulmakta, tür çeşitliliği azalmakta, daha önceden problem olmayan potansiyel zararlılar sorun olmakta ve bu zararlılara karşı ek ilaçlama yapma zorunluluğu ortaya çıkmaktadır. Kimyasalların bu olumsuz etkileri göz önünde bulundurulması ile alternatif yöntemlerin geliştirilmesi gerçeği ortaya çıkmıştır. Zararlı böceklerle mücadelede kullanılan insektisitlerin anlatılan yan etkilerinden dolayı, bilim adamları kimyasal mücadelenin günümüzde mümkün olduğunca kısıtlanması ve bunun yerini çevresel açıdan daha güvenli olan biyolojik mücadelenin alması gerektiğini düşünmektedirler. Entomopatojenik mikroorganizmalar (bakteriler, virüsler, funguslar, nematodlar, protozoonlar) zararlı böceklerde hastalık oluşturarak böcek popülasyonlarının dengede tutulmasını ve zararlarının en aza indirilmesini sağlamaktadır. Bu entomopatojenlerin büyük bir çoğunluğu konağa özel olduğu için yalnızca mücadele yapılmak istenilen organizma üzerinde etkili olur. Bu özelliğiyle, faydalı ve predatör böcekler, hayvanlar ve insanlar gibi hedef dışı organizmalar üzerinde herhangi bir risk oluşturmaz. Tamamen doğal olmaları sebebiyle bu etmenler ekosistemde herhangi bir kirliliğe yol açmaz. Tüm bu olumlu etkilerinin yanında mikrobiyal patojenlerin etkilerinin uzun sürmesi kimyasal mücadeleye alternatif olan diğer bir özelliğidir (Charles ve ark., 2000; Lacey ve Kaya 2007).

Bir ekosistemdeki zararlıları tamamen yok etmek yerine ekonomik zarar eşiğinin altında tutma prensibine dayanan “entegre mücadele” bugün dünyada ve Türkiye’de zararlılara karşı geliştirilmiş ve bu mücadele yönteminden başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Entegre mücadele programında, zararlılara karşı belirlenen tüm mücadele yöntemleri birlikte değerlendirilmeli, öncelikle bitkinin sağlıklı yetiştirilmesi için kültürel önlemler alınmalıdır. Bu yönde insan ve çevreye en az olumsuz etkisi olan mücadele yöntemlerine öncelik verilmelidir. Mekanik mücadele ve biyolojik mücadele (buna dahil mikrobiyal mücadele) bu yöntemlerin başında gelmektedir. Tarım ürünlerinde görülen hastalık, zararlı ve yabancı otlarla mücadelede, entegre mücadele prensiplerine uyulması sürdürülebilir tarım yaklaşımı açısından mutlaka gereklidir.

Lepidoptera takımında yer alan *Lobesia botrana* (üzüm salkım güvesi) çok önemli bir üzüm zararlısıdır. Yapılan literatür araştırması sonucunda daha önce *Lobesia botrana*’nın mikrobiyal florasıyla ilgili herhangi bir çalışma tespit edilememiştir. Dolayısıyla, bu çalışma, *L. botrana*’nın mikrobiyal florası üzerine yapılan ilk çalışmadır.

Uygulanan biyolojik mücadele çalışmalarıyla uyumlu çalışabilecek hatta ona alternatif olabilecek bir mikrobiyal mücadele etmenin geliştirilmesi ve *Lobesia botrana*’nın bakteriyel florasının belirlenmesinin amaçlandığı bu çalışmada 7 adet kültüre edilebilir bakteri izolasyonu yapılmıştır.

İzolatların tür tayininde rutin olarak kullanılan konvansiyonel testlerin (morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal) dışında, son yıllarda tür tayinlerinin daha etkin ve doğru bir şekilde yapılabilmesi için geliştirilmiş 16S rRNA dizi analizi, API20E, API50CH ve VITEK-2 identifikasyon sistemleri de kullanılmıştır. Bu testler genellikle insan kaynaklı bakterilerin tanımlamalarında kullanıldığı ve böcek orjinli bakteriler kütüphanelerinde olmadığı için, tür tayinleri direkt olarak gerçekleştirilememiştir. Bununla birlikte, elde edilen test sonuçları bakterilerin tanımlanmalarında dikkate alınmıştır. Bakterilerin tür tayinleri için “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” kaynak kitabından (Sneath, 1986) yararlanılarak, yapılan tanımlar API20E, API50Ch ve VITEK-2 sistemleri ve 16S rRNA dizinin analizi sonuçlarıyla desteklenmiş ve bu sistemler yardımıyla izolatlarımızın sahip olduğu metabolik aktiviteler ve biyokimyasal özellikleri hakkında önemli bilgilere ulaşılmıştır. Rutin çalışmalarla elde edilen veriler, tür tayini için yeterli olmadığı durumlarda bu test sistemlerinden elde edilen veriler kullanılarak tür tayini yapılmıştır.

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

Yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda, *L. botrana*'dan, *Enterococcus faecalis* (Lb4), *Klebsiella pneumonia* (Lb6), *Enterobacter ludwigii* (Lb12), *Rhodococcus erythropolis* (Lb13), *Enterobacter aerogenes* (Lb15), *Enterobacter ludwigii* (Lb17) ve *Serratia marcescens* (Lb21) olmak üzere 5 farklı cinse ait, 6 farklı tür elde edilmiştir (Table 3).

Yapılan çalışmalarda 4 nolu izolatın Gram (+), aerobik, hareketsiz, kok formunda bir bakteri olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu izolatın nütrient agar üzerinde çok ince, krem renkli, düzgün ve yuvarlak koloniler oluşturduğu; katalaz ve oksidaz enzimlerini üretmediği; %2-7 arası NaCl'ye ve 5-7 arası pH'ya toleranslı olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri göz önünde tutulmuş ve bunlara ilaveten API20E, API50Ch ve VITEK-2 sistemleri sonucu %95 oranında, 16s rRNA dizin analizine göre ise %100 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilerek, bu izolatın *Enterococcus faecalis* olduğu sonucuna varılmıştır.

Enterococcus faecalis insan normal bağırsak florasında bulunmaktadır. Yapılan literatür çalışması sonucunda *E. faecalis*'ın omurgasızlardan ve *Manduca sexta* (Mason, 2011), *Acrosternum hilare* ve *Nezara viridula* (Hirose ve ark., 2006) gibi böceklerden izole edildiği tespit edilmiştir. Ancak mikrobiyal mücadelede kullanımı ile ilgili herhangi bir bilgiye rastlanılmamıştır.

Çalışma kapsamında *Lobesia botrana* larvasından izole edilen Lb6, Lb12, Lb15, Lb17 nolu izolatların Gram (-), aerobik, kokkobasil formunda oldukları tespit edilmiştir. Ancak, Lb6 hareketsiz iken diğerleri hareketli bulundular.

Lb6 izolatın nütrient agar üzerinde krem renkli, düzgün ve yuvarlak koloniler oluşturduğu; katalaz enzimin ürettiği ve oksidaz enzimin üretmediği; %2-7 arası NaCl'ye ve 4-9 arası pH'ya toleranslı olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri göz önünde tutulmuş ve bunlara ilaveten API20E sistemi sonucu %97.7 oranında, 16s rRNA dizin analizine göre ise %99 oranında *K. pneumonia* ve *K. variicola*'ya benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Fakat bu iki bakteri adonitol fermentasyonunda (ADO) farklılık göstermektedirler (*K. pneumoniae* pozitif ve *K.*

variicola negative) (Alves ve ark., 2006) ve bu izolatın ADO'sı pozitif olduğundan *Klebsiella pneumonia* olduğu sonucuna varılmıştır.

K. pneumonia bakterisi daha önce *Bactrocera tryoni* (Thaochan ve ark., 2010), *Nezara viridula* (Hirose ve ark., 2006) gibi böceklerden de izole edilmiştir.

Lb12 ve Lb17 izolatlarının API test sonuçları sırasıyla %99.4 ve %95 ve VITEK2 sistemi sonucu %96 ve %99 olarak *Enterobacter sp.*'ye benzer olduklarını gösterdi. *Enterobacter sp.* altı tür içermektedir: *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii* ve *Enterobacter nimipressuralis*. Bu bakterilerden *E. asburiae* hariç hepsi hareketli, üreaz negatif ve sorbitol pozitiflerdir. Bu iki bakteri (Lb12 ve Lb17) *Enterobacter ludwigii* olarak tanımlandı sadece RHA (Rhamnose) Lb12'de negatif ve Lb17'de pozitif bulundu. 16s rRNA dizin analizleri %97 benzerlikle *Enterobacter ludwigii* olma sonucunu destekledi.

Lb15 izolatının lizin dekarboksilaz (LDC) ve inozitol fermentasyon (INO) testleri pozitifdir. VITEK2 (%99) ve API 20E (%99.7) sonuçlarına bakarak *Enterobacter aerogenes* olduğu görülmekle birlikte, 16S rRNA dizin analizleri bu sonucu doğrulamaktadır.

Daha önce yapılan çalışmalar sonucunda Enterobacteriaceae familyasına ait bakterilerin böceklerin bağırsak sistemlerinde yer aldığı belirtilmiştir (De Vries ve ark., 2008). Gayatri ve ark. (2012), yaptıkları araştırmalar sonucunda *Helicoverpa armigera* larvasının bağırsağından *Enterobacter sp.* türünü izole etmişlerdir. Tez kapsamında yapılan bu çalışmada ise Enterobacteriaceae familyasına ait *Enterobacter ludwigii* ve *Enterobacter aerogenes* olmak üzere iki farklı tür izole edilmiştir. Lighthart (1988) yaptığı bir çalışmada *Peridroma saucia* zararlısının bağırsağından, *Enterobacter aerogenes* türünü izole etmiştir. Bir başka çalışmada Dong ve ark. (2009), bir sivrisinek türü olan *Anopheles gambiae* bağırsağından *Enterobacter aerogenes* bakterisini izole etmiştir. Bunun yanında Sevim ve ark. (2010), *Agrotis segetum* üzerine yaptıkları bir araştırmada yine *Enterobacter aerogenes* bakterisini bu zararlıdan izole etmiştir.

Lb13 izolatın Gram (+), aerobik, hareketsiz, çubuk formunda bir bakteri olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, bu izolatın nütrient agar üzerinde pembe renkli, düzgün ve akışkan koloniler oluşturduğu; katalaz enzimi ürettiği ve oksidaz enzimi üretmediği; %2-7 arası NaCl'ye ve 5-9 arası pH'ya toleranslı olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri göz önünde tutulmuş ve bunlara

ilaveten 16s rRNA dizin analizine göre ise %100 oranında *Rhodococcus erythropolis* ve *Rhodococcus baikonurensis* türlerine benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Fakat inozitol testi ve sukroz fermentasyonu negatif olduğu için bu izolatin *Rhodococcus erythropolis* olduğu sonucuna varılmıştır (*R. baikonurensis*'in inozitol ve sukroz fermentasyonu pozitifdir). Ayrıca *R.erythropolis* kliniksel bir patojen olmadığı için tanımlaması API sistemiyle mümkün olmamıştır.

Rhodococcus cinsi bakteriler günümüze kadar toprak, kaya, yeraltı kaynakları, deniz suyu, bitki, hayvan ve böcek bağırsağı gibi pek çok farklı kaynaktan izole edilmiştir (Gürtler ve ark., 2004). Bu çalışmada ise *Rhodococcus* cinsi, *L. botrana* konağından ilk kez izole edilmiş ve bu izolat *Rhodococcus erythropolis* olarak tanımlanmıştır.

Lb21 izolatin Gram (-), aerobik, hareketsiz, çubuk formunda bir bakteri olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu izolatin nütrient agar üzerinde krem renkli, düzgün ve yuvarlak koloniler oluşturduğu; katalaz enzimin ürettiği ve oksidaz enzimin üretmediği; %2-8 arası NaCl'ye ve 4-10 arası pH'ya toleranslı olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri göz önünde tutulmuş ve bunlara ilaveten API20E, API50Ch %96 ve VITEK-2 sistemleri sonucu %99 olasılıkla, 16s rRNA dizin analizine göre ise %100 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilerek, bu izolatin *Serratia marcescens* olduğu sonucuna varılmıştır.

Serratia marcescens ise birçok zararlıdan izole edilen önemli bir böcek patojeni olup, *L. botrana*'dan izole edilen diğer bir türdür. Kleespies ve ark. (2008) yaptıkları araştırmalar sonucunda *Serratia marcescens* bakterisinin *Blatta orientalis*, *Blatta germanica* (*Phyllodromia germanica*), *Rhyparobia maderae* (*Leucophaea maderae*), *Epilachna varivestis*, *Nymphalis antiopa*, *Operophtera brumata*, *Ostrinia nubilalis*, *Chrysoperla carnea*, *Achaeta domesticus*, *Zonocerus variegates* gibi birçok konukçudan izole edildiğini rapor etmiştir. Bunun yanında bu bakteri türünü Thaochan ve ark. (2010) *Bactrocera tryoni* konukçusundan, Gökçe ve ark. (2010) *Rhynchites bacchus*'dan, Seçil ve ark. (2012) ise *Ostrinia nubilalis*'ten izole etmişlerdir.

Şu ana kadar *Lobesia botrana*'dan herhangi bir virüs belirlenmemiştir. Bu böcek ile mücadelede kullanılmak ve yeni bir böcek patojeni virüs keşfedebilmek için bu tez kapsamında virüs araştırmaları yapıldı. Bazı larvalarda mavi-yeşilimsi reng değişimi dikkat çekiciydi. Bu larvalar *iridovirüs* enfeksiyonundan şüpheli olmakla incelendi Ancak,

iridovirüsler ışık mikroskopta görünemezler. Bu tez kapsamında yapılan moleküler virüs araştırmaları sonucunda bir virüs enfeksiyonuna rastlanılmıştır. İzole edilen virüs DNA'sı jel elektroforezinin ardından yapılan görüntüleme DNA'nın, CIV'ye ait olma ihtimali üzerinde durulmuş, fakat yapılan doku PCR deneyleri sonucunda çoğaltılan DNA'nın jelden temizlenmesi aşaması başarısız olmuştur. Bu denemenin ardından herhangi bir viral enfeksiyona rastlanılamamıştır.

Virüsler dar konak spektrumuna sahip olmaları, insanlarda hastalık oluşturmamaları ve kolayca degradasyona uğrayabilmeleri nedeniyle zirai mücadelede zararlıya karşı kullanılabilecek mikrobiyal insektisitlerin en çok gelecek vaadeden biyolojik mücadelede ajanlarıdır. Ayrıca, günümüzde genetik mühendisliği yöntemleri ile böceklerle karşı daha etkili patojen ajanlar inşa etmek için virüsler önemsenilmektedirler.

İdentifikasyonun ardından bakteriyel izolatların *Lobesia botrana* üzerinde virulanslarının belirlenmesi amacıyla insektisidal aktivite testleri yapılmıştır. Lb4 (*Enterococcus faecalis*) %70'lik insektisidal etki göstererek kontrol grubu ile anlamlı fark ($p = 0.211$) göstermediğinden dolayı mikrobiyal mücadelede kullanımı için uygun materyal olarak bulunmamıştır (Tablo 13). Yapılan aktivite testleri sonucunda Lb21 numaralı izolatu, *Serratia marcescens* bakterisinin *L. botrana* larvaları üzerinde, 10 günlük deney periyodunda, %93 ölüm oranı ile en yüksek öldürücü etkiye sahip olduğu belirlenmiştir ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farklılığın olduğu görülmüştür ($P=0.000$). Lb12 ve Lb17 izolatlar ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık ($P < 0.05$) ancak diğer izolatlar (Lb4, Lb6, Lb13, Lb15) ise kontrol grubu ile aralarında olan farklılığın anlamsız olduğu ($P > 0.05$) belirlendi.

Campos ve ark. (2007) yaptıkları bir çalışmada *Serratia marcescens* ve *Enterobacter cloacae* türlerinin *Phyllocnistis citrella* (Lep.: Gracillariidae) üzerindeki etkisini araştırmıştır. Yaptıkları bu çalışmada 10^{10} ve 10^7 UCF \times ml⁻¹ konsantrasyonlarının her ikisinde de *S. marcescens* ve *E. cloacae* bakterilerinin *P. citrella* üzerinde %48 oranında öldürücü etkiye sahip olduklarını göstermiştir. Ancak, bu çalışmada *S. marcescens* ve *E. ludwigii* izolatları *L. botrana* larvaları üzerinde sırasıyla %93 ve %86 oranında ölüme sebep olmuştur. Bu sonuçlar kontrol grubunda yüksek oranda (%57) ölüm gözlenmesine rağmen, önemli derecede farklılık göstermektedir.

Sonuç olarak *Serratia marcescens* ve *Enterobacter ludwigii* türleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak güçlü etkilerinin olduğu belirlenmiştir. *S. marcescens*'in öldürücü etkisi ise dikkate alınacak orandadır. Bu sebepten dolayı *Serratia marcescens* ve *Enterobacter ludwigii* izolatları bu zararlı için potansiyel mikrobiyal kontrol ajanı olarak görülmektedirler.

Bu çalışmada *L. botrana*'nın üzerinde kendi bakteriyal izolatları'nın yanında 18 farklı mikrobiyal patojenin insektisidal aktivite testleri yapılmış ve etkileri araştırılmıştır. Bu patojenler daha önce yapılan çalışmalarda yüksek virulans özelliğine sahip olmaları göz önünde bulundurularak KTU, Mikrobiyoloji Laboratuvarı koleksiyonundan seçilmiştir (Demir ve Demirbag, 2006; Sevim ve ark., 2013; Demir ve ark., 2013; Ozkan Cakıcı ve ark., 2014). Mevcut çalışmalar sonucunda en yüksek öldürücü etkiye sahip patojenin, üzüm bahçelerinde verimi ve kaliteyi artırmak amacıyla *L. botrana*'nın biyolojik mücadelesinde kullanılması hedeflenmiştir.

Bacillus thuringiensis bakterisi son zamanlarda zararlı popülasyonlarının kontrol altına alınmasında en sık kullanılan organizma olarak bilinmektedir. *B. thuringiensis* bakterisinden başka çalışma kapsamına *L. botrana*'dan izole edilen *S. marcescens* ve *E. ludwigii* türleri de insektisidal aktivite testlerine dahil edilmiştir. Ancak, bu çalışmada *S. marcescens* ve *E. ludwigii* türleri ile muamele edilen *L. botrana* larvalarında sırasıyla %93 ve %86 ölüm oranı elde edilmekle birlikte, en yüksek ölüm oranı (%100) *B. thuringiensis* suşlarında (MnD ve BnBt) gözlenmiştir.

Bazı *B. thuringiensis* suşları ve bu suşların formülasyonları, hem laboratuvar koşullarında hem de arazi denemelerinde *L. botrana* zararlısına karşı test edilmiştir. Laboratuvar koşullarında veya arazi şartlarında, *L. botrana* üzerine *B. thuringiensis* sporları ve endotoksin kristalleri kullanılarak yapılan ilk deneme Roehrich (1964, 1970) tarafından yapılmıştır. *B. thuringiensis*'in kontrol grubu üzerindeki etkisi ise iklim koşulları ve çevresel etkilerin varlığında %75 ile %90 oranında değişiklik göstermektedir. Bazı araştırmacılar *B. thuringiensis* preperatlarının *L. botrana* üzerindeki etkisinin kimyasal insektisitlerden daha düşük olduğunu göstermiştir (Fischer-Colbrie, 1980; Roditakis, 1986). *B. thuringiensis*, carbaryl ile düşük dozda carbaryl ve *B. thuringiensis* kombinasyonları ile yapılan bir çalışmada *B. thuringiensis* tek başına %79 oranı ile düşük bir ölüm oranı gösterirken diğer uygulamalar %90 etki göstermiştir (Atac ve ark., 1990). Ifoulis vd. (2004) *B. thuringiensis*

Berliner bakterisinin ıslatılabilir ve kuru formülasyonları olmak üzere iki farklı preparatını 11 asma zararlısı içinde *L. botrana*'yı kontrol etmek için kullanarak denemişlerdir. Yapılan denemeler sonucunda *B. thuringiensis*'in iki farklı formülasyonunun kontrol grubundan önemli derecede farklı olduğu gösterilmiştir. Tez kapsamında kullanılan *B. thuringiensis* suşları (MnD ve BnBt) ile yapılan denemelerde enfeksiyonun ardından sırasıyla 3. ve 4. günlerde ölüm gözlenmesi, bu suşların dikkate alınması gerektiğini vurgulamaktadır. Bu sonuçlar doğrultusunda asmalarda büyük hasara sebep olan *L. botrana* zararlısına karşı *B. thuringiensis* suşlarının kullanılması gerektiği aşıkardır.

L. botrana ile yapılmış entomopatojen fungus çalışmaları oldukça yetersizdir. Cozzi vd. (2013), yaptıkları bir çalışmada, farklı kaynaklardan izole ettikleri *Fusarium*, *Beauveria*, *Paecilomyces* ve *Verticillium* cinslerine ait 11 farklı fungus suşunu, spor konsantrasyonu 2×10^8 spor \times ml⁻¹ ayarlayarak, bu suşların virulanslarını araştırmıştır. *Fusarium subglutinans* ITEM-1399 ve *Verticillium* spp. ITEM-1237 suşlarının zararlı üzerinde herhangi bir etkisi görülmezken, *B. bassiana* dışındaki diğer izolatların da ölüm etkisinin %20'nin altında olduğu görülmüştür. Aynı denemede *B. bassiana* ITEM-1559 %55 larval ölüm oranıyla en yüksek insektisidal etkiyi göstermiştir.

Bu çalışmada ise kaynağı toprak ve farklı böcekler olan 12 farklı fungal izolatin, *L. botrana* üzerine insektisidal aktivite testleri yapılmıştır. Yapılan testler sonucunda *Metarhizium anisopliae* (Gg-12) ve *Isaria fumosorosea* (Y-2) izolatlarının %93 ölüm oranıyla en yüksek öldürücü etkiye sahip olduğu görülmüştür. *B. bassiana* (ÇK) ve *M. brunneum* (269) izolatları ise %90 öldürücü etkisi ile yine etkili izolatlar arasındadır. *M. anisopliae* (4-Gm-a) ise *L. botrana* larvaları üzerinde %83 ölüm oranı göstermiştir. Ancak *Isaria fumosorosea* (Y-2) izolatu %70 mikozyanma gösterirken, *B. bassiana* (ÇK) %87, *M. brunneum* (269) %77 ve *M. anisopliae* (4-Gm-a) izolatında ise %80 oranında mikozyanma görülmüştür. Mikozyanma değerleri göz önünde bulundurulduğunda, *B. bassiana* (ÇK), *M. brunneum* (269) ve *M. anisopliae* (4-Gm-a) izolatlarının, *L. botrana* larvaları üzerinde *Isaria fumosorosea* (Y-2) izolatından daha yüksek oranda öldürücü etkiye sahip olduğu söylenebilir. Elde edilen bu veriler insektisidal etkileri bakımından incelendiğinde, tez kapsamında teste tabi tutulan izolatların ölüm oranlarının, Cozzi vd. (2013)'nin yaptığı çalışmada elde edilen ölüm oranlarından çok daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda *L.*

botrana ile yapılacak biyolojik mücadele çalışmalarında *M. anisopliae* (Gg-12) ve *I. fumosorosea* (Y-2) izolatlarının umut verici oldukları tespit edilmiştir.

Son olarak bu çalışmada 4 entomopatojen virüs *L. botrana* larvaları üzerine test edilmiştir. *L. botrana*'ya karşı entomopatojen virüs potansiyelini araştırma üzerine literatürde sadece bir çalışma bulunmaktadır. Gürcistan'da yapılan bu çalışmada *Adoxophyes orana*'dan izole edilen yaklaşık %60-100 oranında, $3-6 \times 10^9$ granül ml⁻¹ konsantrasyonunda *Baculovirus orana* virüsünün etkisi araştırılmıştır (Chkhubianishvili ve Malaniya, 1986, 1990).

Tez çalışmasında ise bakülovirüs gurubuna ait üç tane nükleopolihedrovirüs (LydiNPV, HycuNPV ve ManeNPV) *L. botrana* larvaları üzerine ilk kez test edildi. Bu çalışma sonucunda NPV'lerin bu zararlı üzerinde önemli derecede ölüm etkisi oluşturduğu görüldü (sırasıyla %83, %83 ve %80). Fakat en yüksek öldürücü etki 10 günlük deney periyodunda, %90 ölüm oranı ile *Chilo iridescent* virüsten elde edildi. CIV ile *L. botrana* larvalarının enfeksiyonu bu çalışma ile ilk kez kayıt altına alınmıştır.

Omurgasız iridescent iridovirüslerin çok sayıda zararlı böceği enfekte ettiği bilinmektedir (Jenkins ve ark., 2011). *Chilo iridescent* virüs (CIV), pirinç sap kurdu (*Chilo suppressalis*)'ndan izole edilmiştir (Fukaya ve Nasu 1966). CIV Iridovirüslerin pamuk kurdu, Kök kurdu ve pamuk afitlerini de içeren Coleopteran türlerini efekte ettikleri ve bu enfeksiyonun zararlıda yüksek oranda ölüme sebep olduğu bilinmektedir.

Sonuç olarak tez kapsamında birçok farklı entomopatojen mikroorganizmanın *L. botrana* üzerine insektisidal aktivite testleri yapılmıştır. Çalışmada kullanılan farklı entomopatojen grupları içerisinde en yüksek öldürücü etkiye sahip mikroorganizmalar, bu zararlı üzerinde potansiyel biyolojik mücadele materyali olarak kullanılabilir. Teste tabi tutulan mikroorganizmalardan *Bacillus thuringiensis* (MnD), *Metarhizium anisopliae* (Gg-12) ve *Chilo iridescent* virüs (CIV) izolatları yüksek ölüm etkileri ile *L. botrana* larvaları için biyolojik mücadelede kullanılabilir etkili izolatlar olduğunu göstermektedir. Daha sonraki çalışmalarda bu izolatların biyolojik preparatlara dönüştürülmesi ve arazi çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Bu sebeple, biyolojik ürün üretiminde bu etkili izolatların dikkate alınması gerekmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda, tez çalışması kapsamında elde edilen bu izolatların biyopestisit üretiminde umut vaat edici olduğu düşünülmektedir.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında üzümde ciddi zararlara yol açan *L. botrana* ile etkili ve güvenilir bir şekilde mücadele edebilecek bir biyolojik mücadele etmeni geliştirme doğrultusunda araştırmalar gerçekleştirildi. Bu araştırmalar sonucunda *Lobesia botrana*'nın kültüre edilebilir bakteriyal florası belirlendi. Bakteriyal flora üyeleri ve farklı zararlılardan izole edilmiş 2 *Bacillus thuringiensis* türü, 12 entomopatojen fungus ve 4 virüsün zararlı üzerindeki insektisidal etkileri belirlendi. Çalışmada ulaşılan sonuçlar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- 1) *L. botrana* larvalardan 7 farklı bakteriyal izolat elde edildi. Bunların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler özelliklerine göre karakterizasyonları yapıldı ve tanımlanmaları gerçekleştirildi. Yapılan tanımlama çalışmaları sonucu, izole edilen bakterilerin hepsi tür seviyesinde tanımlandı. Böylece, *L. botrana*'nın kültüre edilebilir bakteriyal florası *Enterococcus faecalis* (Lb4), *Klebsiella pneumonia* (Lb6), *Enterobacter ludwigii* (Lb12), *Rhodococcus erythropolis* (Lb13), *Enterobacter aerogenes* (Lb15), *Enterobacter ludwigii* (Lb17) ve *Serratia marcescens* (Lb21) olarak belirlendi.
- 2) Bakteriyal flora üyelerinden Lb21, Lb12 ve Lb17 kodlu izolatların sırasıyla %93, %86 ve %86 oranlarıyla zararlı üzerinde en yüksek ölüm etkisine sahip oldukları belirlendi. Diğer izolatların yeterli insektisidal etki gösteremedikleri tespit edildi.
- 3) Farklı zararlılardan izole edilen ve yüksek öldürücü etkiye sahip oldukları bilinen *Bacillus* türlerinden MnD (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) ve BnBt (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*)'nin sırasıyla 3. ve 4. günde *L. botrana* larvaları üzerinde %100 öldürücü etkiye sahip oldukları belirlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda asmalarda büyük hasara sebep olan *L. botrana* zararlısına karşı *B. thuringiensis* suşunun bu böceğe karşı kullanılabilecek önemli bir entomopatojen olduğu belirlendi.
- 4) Kaynağı toprak ve farklı böcekler olan 12 farklı fungal izolattan, *L. botrana* üzerinde *Metarhizium anisopliae* (Gg-12) ve *Isaria fumosorosea* (Y-2) izolatlarının %93, ve *B. bassiana* (ÇK) ve *M. brunneum* (269)'un inse %90 öldürücü etki ile en yüksek ölüm oranına sahip oldukları belirlendi. Mikozlanma değerleri göz önünde

bulundurulduğunda, *B. bassiana* (ÇK, %87), *M. brunneum* (269, %77) ve *M. Anisopliae* (4-Gm-a, %80) izolatlarının, *L. botrana* larvaları üzerinde *Isaria fumosorosea* (Y-2) izolatından daha yüksek oranda öldürücü etkiye sahip olduğu belirlendi. Bu sonuçlar ile entomopatojenik fungusların *L. botrana*'ya karşı biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılabilirleri ortaya konuldu.

- 5) *L. botrana* larvaları üzerinde böcek virüslerinin insektisidal etkileri araştırıldı. Bu çalışmalar sonucunda, *L. botrana*'nın Chilo iridescent virüs (CIV) ile enfeksiyonu ilk kez bu çalışma ile belirlendi. En yüksek öldürücü etki 10 günlük deney periyodunda, %90 ölüm oranı ile elde edildi. LydiNPV, HycuNPV ve ManeNPV (nükleopolihedrovirüsler)'de *L. botrana* larvaları üzerine ilk kez test edildi ve sırasıyla %83, %83 ve %80 etki gözlemlendi.
- 6) Gerçekleştirilen virüs tarama çalışmaları sonucunda sadece bir virüs enfeksiyonuna rastlanıldı. İzole edilen virüs DNA'sı Agaroz jelde elektroforez edildikten sonra yapılan görüntüleme DNA'nın, CIV'ye ait olma ihtimali üzerinde duruldu, fakat PCR deneyleri sonucunda çoğaltılan DNA'nın jelden temizlenmesi aşaması başarısız oldu.

6. ÖNERİLER

Bu çalışmada *Lobesia botrana*'dan 7 farklı kültüre edilebilir bakteri izole edildi ve bunların zararlı üzerindeki insektisidal etkileri araştırıldı. Ayrıca, farklı böceklerden izole edilen yüksek insektisidal etkiye sahip 2 *Bacillus thuringiensis* türü, 12 entomopatojen fungus ve 4 virüsün zararlı üzerindeki insektisidal etkileri belirlendi. Çalışmada ulaşılan sonuçlardan hareketle, gelecek çalışmalara yönelik olarak aşağıdaki hususlar önerilebilir.

- 1) Elde edilen yeni bakteriyal izolatların başka zararlılar üzerinde de insektisidal etkileri araştırılabilir.
- 2) İnsektisidal aktivite testleri yapılırken zararlı böcek larvalarına aynı anda sadece tek bir patojen uygulandı. Ancak birden fazla patojenin karıştırılarak uygulanması daha yüksek etki oluşturabileceğinden dolayı karışımlar şeklinde uygulamalar test edilebilir.
- 3) Labaratuar koşullarında elde edilen sonuçların alan uygulamalarında da benzer etki gösterip göstermedikleri araştırılabilir.
- 4) Yüksek öldürücü etkiye sahip olan izolatların ticari olarak geliştirilmesine yönelik ve mikrobiyal mücadele preparatına dönüştürme çalışmaları başlatılabilir.
- 5) Öldürücü aktivitesi yüksek izolatın virülansını etkileyen biyolojik faktörler araştırılabilir.
- 6) Kanıtlara dayanarak bir kere görünen ve en yüksek öldürücü etkiye sahip olduğu belirlenen, CIV enfeksiyonu'nun araştırılması önerilebilir.

7. KAYNAKLAR

- Alves, M.S., Clayton da Silva Dias, R., Christina Dias de Castro, A., Riley, L.W. ve Meurer Moreira, B., 2006. Identification of Clinical Isolates of Indole-Positive and Indole-Negative *Klebsiella* spp., J. Clin. Microbiol., 44, 10, 3640–3646.
- Anonim, 1995. ZiraiMücadele Teknik Talimatları, 3, 444.
- Arif, B. ve Kurstak, E., 1991. Viruses of Invertebrates, Kurstak, E. (Ed.), Marcel Dekker, Inc., 179, New York, USA.
- Atac, O., Bulut, H, ve Cevik, T., 1990. Investigations on the effectiveness of *Bacillus thuringiensis* alone and in combination with low doses of carbaryl against European grape berry moth (*Lobesia botrana* Den. Schiff), Türkiye Biyolojik Mücadele Kongresi, Eylül, Ankara, Bildiriler kitabı: 26-29.
- Beffa, T., Blanc, M., Lyon, P.-F., Vogt, G., Marchiana, M., Fischer, J.L. and Aragno, M. 1996. Isolation of Thermus strains from hot composts (60–80 °C), Applied and Environmental Microbiology, 62, 1723–1727.
- Ben-Dov E., Boussiba S. ve Zaritsky A., 1995. Mosquito larvicidal activity of E. coli with combinations of genes from *B. thuringiensis* subsp. *Israelensis*, Journal of Bacteriology, 177, 2851-2857.
- Burnell, A. M. ve Dowds, B. C. A., 1996. The Genetic Improvement of Entomopathogenic Nematodes and Their Symbiont Bacteria, Phenotypic Targets, Genetic Limitations and an Assesment of Possible Hazards, Biocontr. Sci. Technol., 6, 435-447.
- Campos, Y., Sepúlveda, B. ve Tume, P., 2007. Entomopathogenicity of native bacteria from *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* against the pest *Phyllocnistis citrella*, Pest Manag. Sci., 63, 4, 394-8.
- Cappuccino, J. G. ve Sherran, N., 1992. Microbiology, a Laboratory Manual, Third Edition, Rockland Community College, Suffern, New York.
- Castellucci, F., 2004. Excerpt from the Report on the Vitiviniculture World Market in 2003, The Organisation Internationale De La Vigne Et Vin, (O.I.V.) Newsletter XXVIII Congress Special Issue June s. 4.
- Chapman, A., D., 2006. Numbers of Living Species in Australia and the World, Australian Biological Resources Study, Canberra, Australia, 61.

- Charles, J.F., Delecluse, A. ve Nielsen-LeRoux, C., 2000. Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands. 524 pp. DOI: 10.1080/0958315031000110382.
- Charnley, A. K., Cobb, B. ve Clarksion, J. M., 1997. Toward the Improvement of Fungal Insecticides, In “Microbial Insecticides, Novelty or Necessity” (Evans, H. F., Chair), Proc. Br. Crop. Prot. Council Symp., 68, 115-126.
- Chkhubianishvili, Ts.A. ve Malaniya, I.G., 1986. Granulosis virus against the European grape moth, Zashchita Rastenii, 5, 33.
- Chkhubianishvili, Ts.A. ve Malaniya, I.G., 1990. Entomopathogenic viruses against the grape leaf-roller, Sadovodstvo i Vinogradarstvo, No. 10, 27-28.
- CIE, 1974. *Lobesia botrana* (Schiff.) Distribution Maps of Pests. Series A. Map No. 70 (revised). Commonwealth Institute of Entomology/Commonwealth Agricultural Bureau. Wallingford. UK.
- Cozzi, G., Somma, S., Haidukowsk, M. ve Logrieco, A.F., 2013. Ochratoxin a management in vineyards by *Lobesia botrana* biocontrol, Toxins, 5, 49-59. DOI:10.3390/toxins5010049.
- Cunningham, J. C., 1995. Baculoviruses as Microbial Insecticides, In “Novel Approaches to Integrated Pest Managements” (Reuveni, R., Ed.), 261-292, Lewis, Boca Raton.
- De Vries, E.J., Wurff, A.W.G., Jacobs, G. ve Breeuwer, J.A.J., 2008. Onion Thrips. *Thrips tabaci*. Have Gut Bacteria That are Closely Related to the Symbionts of the Western Flower Thrips. *Frankliniella occidentalis*, J. Insect Sci., 8, 23.
- Deacon, J., 1983. Microbial Control of Plant Pests & Diseases. Published by Van Nostrand Reinhold (UK) Co.Ltd. Molly Millars Lane, Wokingham, Berkshire, England.
- Demir, İ., Nalçacıoğlu, R., Mohammad Gholizad, L. ve Demirbağ, Z., 2013. Characterization of a new isolate of *Malacosoma neustria* nucleopolyhedrovirus (ManeNPV) from Turkey, Turk. J. Biol., 37, 385-391. DOI: 10.3906/biy-1209-24
- Demir, İ. ve Demirbag, Z., 2006. A productive replication of *Malacosoma neustria* nucleopolyhedrovirus in *Lymantria dispar* cell line, J. Microbiol. Biotechnol., 16, 10, 1485-1490. DOI:10.3906/biy-0805-5
- Demirbağ, Z. ve Beldüz, A. O., 1997. Baculovirüs’ün Biyolojik Mücadeledeki Önemi, Kükem Dergisi, 20, 1, 49-58.
- Demirbağ, Z., Nalçacıoğlu, R., Katı, H., Demir, İ., Sezen, K. ve Ertürk, Ö., 2008. Entomopatojenler ve Biyolojik Mücadele 1st ed. Esen Ofset Matbaacılık, Trabzon.TR, Gunduz Press, chapter 1, 40-45.

- Dizman, Y. A., Demirbag, Z. Ince, I. A. ve Nalcacioglu, R., 2012. Transcriptomic analysis of *Chilo* iridescent virus immediate early promoter, Virus Research, 167, 2, 353-7. DOI:10.1016/j.virusres.2012.05.025.
- Dong, Y., Manfredini, F. ve Dimopoulos, G., 2009. Implication of the Mosquito Midgut Microbiota in the Defense against Malaria Parasites, PLoS Pathogens, 5, 5, e1000423.
- Erkan, M., Ataç, Ö., Altındişli, Ö., Göven, M., A., Erkılıç, L., Tokgönül S., Kaplan, C. ve Uçkan, A., 1999. Bağ Entegre Mücadele Teknik Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, 96.
- Erwin, Terry, L., 1982. "Tropical forests, their richness in Coleoptera and other arthropod species", Coleopt. Bull., 36, 74–75.
- Faria, M.R.d. ve Wraight, S.P., 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides, a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types, Biological Control, 43, 237-256.
- Ferron, P., Fargues, J. ve Riba, G., 1991. Fungi as Microbial Insecticides Against Pests, In "Handbook of Applied Mycology" (Arora, D. K., Ajelio, L. ve Mukerji, K. G., Eds.), 2, 665-706. Dekker, New York.
- Fischer-Colbrie, P., 1980. Present pests in viticulture and modern methods of control, Pflanzenarzt, 33, 4, 35-37.
- Fukaya, M. ve Nasu, S., 1966. A *Chilo* iridescent virus (CIV) from the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae), Applied Entomology and Zoology, 1, 69-72.
- Furlong, M. J., Pell, J. K., Choo, O. P. ve Rahman, S. A., 1995. Field and Laboratory Evaluation of a Sex Pheromone Trap for the Autodissemination of the Fungal Entomopathogen *Zoophthora radicans* (Entomophtharales) by the Diamond-Back Moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera, Yponomeutidae), Bull. Entomol. Res., 85, 331-337.
- Gaugler, R. ve Hashmi, S., 1996. Genetic Engineering of an Insect Parasite, In "Genetic Engineering Principles and Methods" (Setlow, J., Ed.), 135-137, Plenum Press, New York.
- Gaugler, R., Bednarek, A. ve Campbell, J. F., 1992. Ultraviolet Inactivation of Heterorhabditid and Steinernematid Nematodes, J. Invertebr. Pathol., 59, 155-160.
- Gayatri, P. N., Ojha, A., Kajla, MK., Raj, A. ve Rajagopal, R. 2012. Host Plant Induced Variation in Gut Bacteria of *Helicoverpa armigera*, PLoS ONE., 7, 1, e30768.

- Georgis, R., 1997. Commercial Prospects of Microbial Insecticides in Agriculture, In “Microbial Insecticides, Novelty or Necessity?” (Evans, H. F., Chair), Proc. Br. Crop. Prot. Council Symp., 68, 243-252.
- Glazer, I. ve Lewis, E. E., 2000. Bioassays for Entomopathogenic Nematodes, In “ Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes” (Navon, A. ve Ascher, K. R. S., Eds.), CAB International Publishing, 229-247.
- Goettel, M. S., Eilenberg, J. ve Glare, T., 2005. Entomopathogenic Fungi and Their Role in Regulation of Insect Populations. In, Comprehensive Molecular Insect Science, Gilbert, L., I., Iatrou, K. ve Gill, S., S. (Ed.), Amsterdam, 361-405.
- Gokce, C., Sevim, A., Demirbag, Z. ve Demir, I., 2010. Isolation. characterization and pathogenicity of bacteria from *Rhynchites bacchus* (Coleoptera: Rhynchitidae). Biocontrol Science and Technology, 20, 9, 973-982.
- Gullan, P. J. ve Martin, J. H., 2009. Sternorrhyncha in “Encyclopedia of Insects”. Second Edition _Vincent H. Resh ve Ring T. Cardé (Eds) University of California, 964.
- Gürtler, U., Fuchs, P., Stangelmayer, A., Bernhardt, G., Buschauer, A. ve Spruss, T., 2004. Construction and validation of a microprocessor controlled extracorporeal circuit in rats for the optimization of isolated limb perfusion, Arch Pharm (Weinheim), 337, 672–681.
- Hajek, A. E., 1997. Ecology of Terrestrial Fungal Entomopathogens, In “Advanced in Microbial Ecology” (Jones, J. H., Ed.), 15, 193-249, Plenum Press, New York.
- Hall, R. A. ve Papierok, B., 1982. Fungi as Biological Control Agents of Arthropods of Agricultural and Medical Importance, Parasitology, 84, 205-240.
- Hirose, E., Panizzi, A. R., De Souza, J. T., Cattelan, A. J. ve Aldrich, J. R., 2006. Bacteria in the Gut of Southern Green Stink Bug (Heteroptera, Pentatomidae), Ann Entomol Soc Am., 99, 91-95.
- Hoffman, M. P. ve Frodsham, A. C., 1993. Naturel Enemies of Vegetable Insect Pests, Cooperative Extension, 63, Cornell University, Ithaca.
- Ifoulis, A. A. ve Savopoulou-Soultani, M., 2004. Biological control of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) larvae by using different formulations of *Bacillus thuringiensis* in 11 vine cultivars under field conditions, J. Econ. Entomol., 97, 340-343. DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/0022-0493-97.2.340>
- Jenkins, D. A., Hunter, W. B. ve Goenaga, R., 2011. Effects of Invertebrate Iridescent Virus 6 in *Phyllophaga vandinei* and its potential as a biocontrol delivery system, Journal of Insect Science, 11, 44. DOI: 10.1673/031.011.0144

- Kaya, H. K. ve Stock, S. P., 1997. Techniques in Insect Nematology, In “Manuel of Techniques in Insect Pathology” (Lacey, L. A., Ed.), Academic Press, London, 281-324.
- Kleespies, R.G., Huger. A.M. ve Zimmermann, G. 2008. Diseases of insects and other arthropods: Results of diagnostic research over 55 years, Biocontrol Science and Technology, 18, 5, 439 – 482.
- Klein, M. G. ve Lacey, L. A., 1999. An Attactant Trap for Autodissemination of Entomopathogenic Fungi Into Populations of Japanese Beetle, *Papilla japonica* (Coleoptera, Scarabaediae), Biocontr. Sci. Technol., 9, 151-158.
- Klein, M. G. ve Jackson, T. A., 1992. Bacterial Diseases of Scarabs, In “Use of Pathogens in Scarab Pest Management” (T.A. Jackson, T. A. ve Glare, T. R., Eds.), 43-61, Intercept, Andover.
- Lacey, A. ve Kaya, H. K., 2007. Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and other Invertebrate Pests. Second Edition, Springer, The Netherlands. DOI: 10.1111/j.1570-7458.2008.00751.x.
- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K. ve Vail, P., 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents, Do They Have a Future, Biol. Control, 21, 230-248.
- Lighthart, B., 1988. Some Changes in Gut Bacterial Flora of Field-Grown *Peridroma saucia* (Lepidoptera: Noctuidae) When Brought into the Laboratory, Applied and Environmental Microbiology, 1896-1898.
- Lipa, J. J., 1975. An Outline of Insect Pathology, Warsaw, Poland.
- Maddox, J. V., 1987. Protozoan Diseases, In “Epizootiology of Insect Diseases” (Fuxa, J. R. ve Tanada, Y., Eds.), 417-452, Wiley, New York.
- Mason, K. L., Stepien, T. A., Blum, J. E., Holt, J. F., Labbe, N. H., Rush, J. S., Raffa, K. F. ve Handelsman, J., 2011. From commensal to pathogen, translocation of *Enterococcus faecalis* from the midgut to the hemocoel of *Manduca sexta*., mBio. 2, e00065-11.
- Nalcacioglu, R., Marks, H., Vlak, J. M., Demirbag, Z. ve Oers, M. M. van, 2003. Promoter analysis of the Chilo iridescent virus DNA polymerase and major capsid protein genes, Virology, 317, 2, 321-329
- Oğurlu, İ., 2000. Biyolojik Mücadele, Isparta, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları, No,8 (1. Baskı) 98-10.
- Ozkan Cakıcı, F., Sevim, A., Demirbag, Z. ve Demir, I., 2014. Investigating internal bacteria of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and some *Bacillus* strains as biocontrol agents, Turk. J. Agric.For., 38, 99-110. DOI:10.3906/tar-1302-65

- Peng, K., van Lent, J. W., Vlak, J.M., Hu, Z. ve van Oers, M. M. (2011). In situ cleavage of baculovirus occlusion-derived virus receptor binding protein P74 in the peroral infectivity complex, J Virol., 85, 20, 10710–10718. doi, 10.1128/JVI.05110-11
- Peter, G., 1984. Plant Pests and Their Control, Fenemore, London.
- Rauscher, S., Arn, H. ve Guerin, P., 1984. Effects of dodecyl acetate and Z-10-tridcenylacetate on attraction of *Eupoecilia ambiguella* males to the main sex pheromonecomponent, Z-9-dodecenyl acetate, Journal of Chemical Ecology, 10, 253–264.
- Roditakis, N. E., 1986. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki* on the grape berry moth *Lobesia botrana* Den. and Schiff. (Lepidoptera, Tortricidae) under field and laboratory conditions in Crete, Entomologia Hellenica, 4, 2, 31-35.
- Roehrich, R., 1964. A comparative study of the sensitivity of three Lepidoptera (Tortricoidea) to *Bacillus thuringiensis* Berliner, Journal of Insect Pathology, 6, 186-197.
- Roehrich, R., 1970. Essais de deux produits commerciaux à base de *Bacillus thuringiensis* pour la protection de la vigne contre l'Eudémis (*Lobesia botrana* Schiff), Revue de Zoologie Agricole et de Pathologie Végétale, 69, 73-78.
- Sacchi, C. T., Whitney, A. M., Mayer, L. W., Morey, R., Steigerwalt, A., Boras, A., Weyant, R. S. ve Popovic, T., 2002. Sequencing of 16S rRNA gene, a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*, Emerg. Infect. Dis., 8, 1117–1123.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. ve Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Baskı, 2, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Seçil, E. S., Sevim, A., Demirbag, Z. ve Demir, I., 2012. Isolation, characterization and virulence of the culturable bacteria from entire tissues of larval *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae), Biologia, 67, 4, 767-776
- Sevim, A., Demir, I., Sonmez, E., Kocacevik S. ve Demirbag, Z., 2013. Evaluation of entomopathogenic fungi against the sycamore lace bug, *Corythucha ciliata* (Say) (Hemiptera: Tingidae), Turk J Agric., 37, 595-603. DOI:10.3906/tar-1208-55.
- Sevim, A., Demirbag, Z. ve Demir, I., 2010. A new study on the bacteria of *Agrotis segetum* Schiff. (Lepidoptera: Noctuidae) and their insecticidal activities, Turk. J. Agric., 34, 333-342. DOI:10.3906/tar-0902-9.
- Smith, J. E., 1996. Biotechnology, Cambridge University Press.
- Sneath, A. P., 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2, Sneath, A. P., Mair, N. S., Sharge, M. S. ve Holt, J. G., Williams and Wilkins, Baltimore.

- St. Leger, R. J. ve Roberts, D. W., 1997. Engineering Improved Mycoinsecticides, Trends Biotechnol., 15, 83-85.
- Steinhaus, E. A., 1956. Microbial Control, The Emergence of an Idea, J. Agric. Sci., 26, 107-160.
- Thaochan, N., Drew, R. a I., Hughes, J. M., Vijaysegaran, S. ve Chinajariyawong, a., 2010. Alimentary tract bacteria isolated and identified with API-20E and molecular cloning techniques from Australian tropical fruit flies, *Bactrocera cacuminata* and *B. Tryoni*, Journal of Insect Science (Online), 10, 131. doi:10.1673/031.010.13101
- Thiery, I. ve Frachon, E., 1997. Identification, isolation, culture and preservation of entomopathogenic bacteria. In, Lacey AL (ed), Manual of Techniques in Insect Pathology, Academic Press, London, s 55-73.
- URL1, www.tarim.gov.tr Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü; BAĞ Hastalık ve Zararlıları ile Mücadele. 24 Ağustos 2010.
- URL2, <http://ziraat.cu.edu.tr/biyomuc/neden.htm> Uygun Nedim. 24 Ağustos 2010.
- URL3, <http://tr.wikipedia.org/wiki/%C3%9Cz%C3%BCm>. 15 Ağustos 2010.
- URL4, http://www.taris.com.tr/uzumweb/t_uzum_hak.asp. 5 Eylül 2010.
- URL5, İzmir'in Altın Salkımı, <http://www.egelisesi.k12.tr/dosyalar/editor/file/q5.pdf>. 30 Ağustos 2010.
- URL6, <http://www.agri-jahad.ir/persian/data/statistic/book1381/amarname.asp?dd=45>. 6 Eylül 2010.
- URL7, <http://www.foodna.ir/17227-fa.html>. 19 Ağustos 2010.
- URL8, <http://www.ziraatciyiz.biz/bag-hastalik-ve-zararilari-t1237.html>. 15 Ağustos 2010.
- URL9, www.bagcilik.gov.tr Bağ hastalıkları. 19 Ağustos 2010.
- URL10, <http://www.gidagundemi.com/gundem/dunya/2050-yilinda-gida-uretimi-yuzde-70-artmali-h2046.html>. 27 Ekim 2013.
- Uygun, N., 1996. Bahçe Bitkileri Zararlıları. Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Ders Kitabı, No, 26, 150.
- Uygun, N., Karaca, İ., Ulusoy, M. R. ve Satar, S., 2010. Meyve ve Bağ Zararlıları, 3. Bölüm Üzümsü ve Meyve Zararlıları, 135-137.

- Vail, P. V., Hostetter, D. L. ve Hoffmann, D. F., 1999. Development of the Multi-Nucleocapsid Nukleopolyhedroviruses (MNPVs) Infectious to Loppers (Lepidoptera, Noctuidae, Plussinae) as Microbial Control Agents, Int. Pest Manage. Rev., 4, 231-257.
- Varela, L. G, Cooper, M. L., Smith, R. J. ve Hoenisch, R. W., 2010, European grapevine moth, *Lobesia botrana*, in Napa Valley vineyards, Practical Winery & Vineyard, 1-5.
- Vega, F. E., Dowd, P. F., Lacey, L. A., Jackson, D. M. ve Klein, M. G., 2000. Dissemination of Beneficial Microbial Agents by Insects, In “Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests” (Lacey, L. A. ve Kaya, H. K., Eds.), 152-177, Kluwer Academic, Dordrecht.
- Vega, F. E., Dowd, P. F. ve Bartelt, R. J., 1995. Dissemination of Microbial Agents Using an Autoinoculating device and Several Insect Species as Vectors, Biol. Control, 5, 545-552.
- Woese, C., 1990. Prokaryote Systematics, The Evolution of a Science (second ed.), Prokaryotes., 3–18.

8. EKLER

Ek 1. Besiyeri, Ayıraç ve Boyaların Hazırlanışı

Ek 1. 1. Besiyerlerinin Hazırlanışı

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

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

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

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

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

MacConkey Agar (MCA): Ticari olarak satılan hazır besiyeri kullanıldı. Kullanılan marka: Merck, Katalog no: 1,05465,0500

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

Ek 1.2. Ayıraçlar ve Boyaların Hazırlanışı

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

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

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

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

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

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

Ek 1.3. Kimyasalların Hazırlanışı

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

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

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

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

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

Ek 2. API 20E panel test sistemi için kullanılan anahtar

Testler	Substrat	Belirlenen Reaksiyon	Negatif Sonuçlar	Pozitif Sonuçlar
ONPG	ONPG	Beta-galaktosidaz	Renksiz	Sarı
ADH	Arginin	Arginin dihidrolaz	Sarı	Kırmızı / Turuncu
LDC	Lisin	Lisin dekarboksilaz	Sarı	Kırmızı / Turuncu
ODC	Ornitin	Ornitin dekarboksilaz	Sarı	Kırmızı / Turuncu
CIT	Sitrat	Sitrat kullanımı	Açık yeşil / Sarı	Mavi-Yeşil / Mavi
H₂S	Na thiosulfate	H ₂ S üretimi	Renksiz / Gri	Siyah tortu
URE	Üre	Üre hidrolizi	Sarı	Kırmızı / Turuncu
TDA	Triptofan	Deaminaz	Sarı	Kahverengi / Kırmızı
IND	Triptofan	İndol üretimi	Sarı	Kırmızı (2 dk.)
VP	Na piruvat	Aseton üretimi	Renksiz	Pembe / Kırmızı (10 dk)
GEL	Kömür jelatin	Jelatinaz	Siyah tabaka dağılmamış	Siyah tabaka dağılmış
GLU	Glukoz	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi-Yeşil	Sarı
MAN	Mannitol	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
INO	İnositol	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
SOR	Sorbitol	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
RHA	Ramnoz	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
SAC	Sucrose	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
MEL	Melibiose	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
AMY	Amigdalin	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
ARA	Arabinoz	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı

Ek 3. API 50 CH panel test sistemi için kullanılan anahtar

Test	Adı	Test	Adı
GLY	Glycerol	CEL	D-celiobiose
ERY	Erythriol	MAL	D-maltose
DARA	D-arabinose	LAC	D-lactose(bovineorgine)
LARA	L-arabinose	MEL	D-melibiose
RIB	D-ribose	SAC	D-saccharose(sucrose)
DXYL	D-xylose	TRE	D-trehalose
LXYL	L-xylose	INU	İnulin
ADO	D-adonitol	MLZ	D-melezitoz
MDX	Methyl-βD-xylopyranoside	RAF	D-raffinose
GAL	D-galactose	AMD	Amidon(starch)
GLU	D-glucose	GLYG	Glycogen
FRU	D-fructose	XLT	Xylitol
MNE	D-mannose	GEN	Gentiobiose
SBE	L-sorbose	TUR	D-turanose
RHA	L-rhamnose	LYX	D-lyxose
DUL	Dulcitol	TAG	D-tagatose
INO	İnosidol	DFUG	D-fucose
MAN	D-mannitol	LFUC	L-fucose
SOR	D-sorbitol	DARL	D-arabitol
MDM	Methyl-αD-mannopyranoside	LARL	L-arabitol
MDG	Methyl-αD-glucoopyranoside	GNT	Potassium gluconate
NAG	N-asetylglucosamine	2KG	Potassium 2- ketogluconate
AMY	Amygdalin	5KG	Potassium 5- ketogluconate
ARB	Arbutin	SAL	Salisin
ESC	Esculin-ferric sitrate	CEL	D-celiobiose
SAL	Salisin		

Ek 4. Elde Edilen İzolatların 16S rRNA Gen Sıraları

4.1. Lb4 Bakteriyal İzolatın 16S rRNA Gen Dizisi

GNNGNCGNCGNTCGNTGACGANACGNTTNCNNGTTCGAACGCTTCTTTCCTCCCG
 AGTGCTTGCCTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG
 TAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAA
 CAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGA
 TGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGAT
 GCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCG
 AGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAG
 AAGAACAAGGACGTTAGTAACGTAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCC
 ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG
 GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
 CCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAG
 GAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCA
 GTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGG
 AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGT
 GTTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTG
 GGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAG
 CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGA
 CATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGT
 GGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACG
 AGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGC
 CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGA
 CCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGG
 TCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTG
 CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACCGTNGATGTGAANAACCT
 CTGCGGCNNGNNNN

4.2. Lb6 Bakteriyal İzolatın 16S rRNA Gen Dizisi

NNTNNNNCNNNACGCCNATNTANGCNNTGCNGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCT
 TGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGAT
 GGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACC
 AAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCT
 GGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGAT
 GACCAGCCACACTGGAACGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
 GGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAG
 AAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTGAGGTTAATA
 ACCTCATCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCA
 GCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC
 ACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTG
 CATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAG
 CGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGG

ACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACC
 CTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCCGTG
 GCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTA
 AAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
 CGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTTCCAGAGA
 TGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTC
 GTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTG
 CCAGCGGTTAGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAG
 GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTA
 CAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAG
 TATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCT
 AGTAATCGTAGATCAGAATGTATATNGNGANTANATNNTGACTTCANCNNNNNN

4.3. Lb12 Bakteriyal İzolatın 16S rRNA Gen Dizisi

NNNGTTCNNNACGGCTATNNTNNACATGCAGTCGAGCGGTAGCGGAGGTGCCTTG
 CTACTTTGCCGGCGAGCGGCGGAGGGGTGAGTAGTGTGGGGGAAAGTGCCTGATG
 GGGGGGATAACTAGTGGAAGGGGTAGCTAATACCGCATAGCGTCGCAAGACCA
 AAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCCTCATATGTGCCCATATGGGATTAGCTA
 GTAGGTGGGGTAACGGCTCCCCTACGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATG
 ACCCCCCACACTGGAACCTGACACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
 GGAATATTGCACAATGGGCGCAACCCTGATGCCCCCGTGCCGCGTGTATGAAAAA
 GGCCTTCGGGTTGTAAAGTTCTTTCCGCGGGGAAGAAGGTGTTGAGGTTAATAAC
 CTCAGCTATTGACGTTCCCCGCAAAAAAAGCCCCGGCTATCTCCGTGCCAGCCCCC
 GCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCAGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAC
 GCGGGCGGTCTGTCAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACCTGCA
 TTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCG
 GTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGAC
 AAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCT
 GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGC
 TTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAA
 ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCG
 ATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATG
 CTTTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG
 TTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCA
 GCGGTCCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTG
 GGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAA
 TGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGC
 GTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGT
 AATCGTAGATCAGAATGCTATCGTAGAATAACNTNNNNACGCAACGNNCTNN

4.4. Lb13 Bakteriyal İzolatın 16S rRNA Gen Dizisi

GTTCNNNACGGCTATNNTNNACATGCAGTCGAGCGGTAGCGGAGGTGCCTTGCTA
 CTTTGCCGGCGAGCGGCGGAGGGGTGAGTAGTGTGGGGGAAAGTGCCTGATGGG
 GGGGGATAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCC

GGAATTACTGGGCGTAAAGAGTTCGTAGGCGGTTTGTTCGCGTCGTTTGTGAAAAC
 CAGCAGCTCAACTGCTGGCTTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGG
 GAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACC
 GGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAACGAAAGCGTGG
 GTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAG
 GTGTGGGTTCCCTTCCACGGAATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCT
 GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
 GCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTG
 ACATATACCGGAAAGCTGCAGAGATGTGGCCCCCTTGTGGTCCGTATACAGGTG
 GTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA
 GCGCAACCCCTATCTTATGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTCGTAAGAGACT
 GCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTAT
 GTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCCAGTACAGAGGGGCTGCGAGACCGTGA
 GGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCTGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGA
 CCCCCTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGTANGCNTNNTAGT
 ACTT

4.5. Lb15 Bakteriyal İzolatın 16S rRNA Gen Dizisi

NNGGGTNCNGNCGCGAGGTAATATGCAGTCGAGCGGTAACACAGAGAGC
 TTGCTACTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTG
 ATGGAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGA
 CCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAG
 CTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGG
 ATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
 GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGA
 AGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCGTTAAGGTTAA
 TAACCTTAGCGATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAG
 CAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGC
 GCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTAACCTGGGAAC
 TGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGT
 AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCT
 GGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA
 CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCG
 TGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT
 TAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA
 ATTCGATGCAACGCGAAGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGC
 AGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTAACCTGGGAACCTGCATT
 CGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGT
 GAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAA
 AGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGG
 TAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTC
 CGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAAAACCT
 CAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATG
 CAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTT
 TGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTG

TGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCG
 ATTCGGTCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGG
 ATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGG
 CATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTC
 GTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT
 CGTAGATCAGAATGCTATCGGTGAATACGTNCCCGANNNGNNN

4.6. Lb17 Bakteriyal İzolatın 16S rRNA Gen Dizisi

NNNNGTTCGTNCACNCGGATATTNGCNATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAG
 CTTGCTGCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCT
 GATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTTCGCAAG
 ACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGATGGGATTA
 GCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAG
 GATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
 AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATG
 AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATAAAGGTTA
 ATAACCTTGTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCA
 GCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
 GCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGA
 ACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGT
 GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCC
 CTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
 TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGG
 CGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
 GTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
 AATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTCCA
 GAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCA
 GCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTT
 GTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAG
 GAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGT
 GCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCAT
 AAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCTGGAA
 TCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCNNGGACTACAGCTGATGCATCGTNNNN
 N

4.7. Lb21 Bakteriyal İzolatın 16S rRNA Gen Dizisi

GNGANNGATCNTCTAGNACCATATTCTAGTCGTAGCGGTAGCACAGGGGAGCTTG
 CTCCCTGAGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGAT
 GGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTTCGCAAGACC
 AAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCT
 AGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGAT
 GACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
 GGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAG
 AAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAACCTTAATA

CGTTCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC
ACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTAACCTGGGAACTG
CATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGG
ACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACC
CTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTG
GCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTA
AAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
CGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGA
TGCTTTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
TGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGC
CAGCGGTTTCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGG
TGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTAC
AATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGT
ATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCCAATTGTTAGTACGAGATA
TTCATCATTAATCATAACATCACGGTACCATATCTAGANTGANANGTNATNNT

ÖZGEÇMİŞ

1964 yılında İran'ın Urmieh şehrinde doğdu. İlkokulu Genc-e Daniş İlkokulu'nda, Ortaokulu Şehriyar kız okulu'nda ve liseyi Zehre Kız Lisesi'nde tamamladı. 1984 yılında Urmia Üniversitesi biyoloji bölümünde teknisyen olarak çalışmaya başladı. 1987 Eğitim-Öğretim yılında Tahran Şehit Beheşti Üniversitesinde Gıda bilimlerini kazandı fakat Urmia Üniversitesi Tıp Fakültesinde Radyoloji teknisyenliğine yatay geçiş yaptı. 1990 yılında tekrar Urmia Üniversitesi Tıp Fakültesinde tıbbi labratuar bölümünde öğrenimine başladı ve aynı zamanda Tebriz Üniversitesi Tıp Fakültesinde lisans eğitimine devam etti. 2005-2006 Eğitim-Öğretim yılında Urmia Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Aynı zamanda, Urmia Üniversitesi Sosyal Bilimleri Enstitüsü Spor ve Beden Eğitimi Anabilim Dalında açık Öğretimde Yüksek Lisans öğrenimini devam etti. 2009 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Doktora eğitimine başladı. Aynı zamanda, Urmia Üniversitesi biyoloji bölümü mikrobiyoloji labratuarında laborant olarak çalışmaktadır. Ana dili Azeri, milli dili Farsça ve İyi derecede Türkçe ve İngilizce bilmektedir. Evli ve bir çocuk annesidir.