

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HYPHANTRIA CUNEA GRANULOVİRÜS TÜRKİYE İZOLATININ
KARAKTERİZASYONU**

DOKTORA TEZİ

Zeynep BAYRAMOĞLU

**MAYIS 2018
TRABZON**



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /

Tezin Savunma Tarihi : / /

Tez Danışmanı :

Trabzon

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

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

Jüri Üyeleri

Başkan :

Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Hyphantria cunea Granulovirüs Türkiye İzolatının Karakterizasyonu” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ), Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda “doktora” tezi olarak hazırlanmıştır. Tez kapsamında Orta Karadeniz Bölgesi’nden bir granulovirüs tespit edilmiş, karakterizasyonu yapılmış ve insektisidal aktivitesi araştırılmıştır. Tez sonucunda oluşturulan bilgiler daha ileri çalışmalara temel teşkil etme niteliğindedir.

Tez süresince doktora tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmanın planlanmasından sonuçlandırılmasına kadar yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. İsmail DEMİR’e, çalışmam boyunca değerli fikirlerini ve yardımlarını benden esirgemeyen ve imkanları doğrultusunda her konuda yanımda bulunan Sayın Prof. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’na, tezin yönlendirilmesinde önerilerde bulunan tez izleme jürisi üyelerim Sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ ve Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU’na, KTÜ Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji grubu hocalarıma, tezimin başarıyla tamamlanması için gerekli alt yapı imkanlarından faydalanmama imkan veren Biyoloji Bölüm Başkanlığına teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım esnasında KTÜ Orman Fakültesi Araştırma ve Uygulama Serası imkanlarından yararlandığım Orman Fakültesi Dekanlığına, Sayın Dr. Öğr. Üyesi M. Mahmut BAYRAMOĞLU’na, sera çalışanlarına, Sayın Ayhan ÖĞRETEN’e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Arzu ÖZGEN’e, bana her zaman destek olan ve desteğini hep yanımda bulduğum eşim Miraç BAYRAMOĞLU’na ve oğlum Ömer Mete BAYRAMOĞLU’na ve bana her zaman inanan ve varlıkları ile her zaman güç veren, benden hiçbir imkanlarını esirgemeyen sevgili anneme ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora eğitimim süresince çalışmalarımın proje desteği veren KTÜ-BAP’a (FBA-2015-5173) teşekkür ediyorum.

Zeynep BAYRAMOĞLU
Trabzon 2018

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum ‘‘Hyphantria cunea Granulovirüs T¼rkiye İzolatının Karakterizasyonu’’ başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. İsmail DEMİR’in sorumluluğunda tamamladığımı, örnekleri kendim topladığımı, deneyleri ilgili laboratuvarlarda 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. 15/05/2018

Zeynep BAYRAMOğLU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER DİZİNİ	XIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Böcek Virüslerinin Genel Özellikleri	4
1.2.1. Bakülovirüsler.....	6
1.2.1.1. Bakülovirüslerin Taksonomisi	8
1.2.1.2. Bakülovirüs Genomu	10
1.2.1.3. Bakülovirüs Hayat Döngüsü	11
1.2.2. Bakülovirüslerin Morfolojik ve Genetik Karakterizasyonları	13
1.2.3. Bakülovirüslerin Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	15
1.2.4. Biyolojik Mücadelede Bakülovirüsler	17
1.2.5. Bakülovirüs Biyopestisitlerinin Avantajları ve Dezavantajları	18
1.3. Amerikan Beyaz Kelebeği (<i>Hyphantria cunea</i> , Lepidoptera: Arctiidae)	20
1.3.1. Yayılışı.....	20
1.3.2. Tanımı ve Biyolojisi.....	22
1.3.3. Zarar Şekli.....	24
1.3.4. Konukçuları.....	25
1.3.5. Mücadelesi	25
1.3.5.2. <i>Hyphantria cunea</i> Granulovirüs	26
1.4. Tezin Amacı.....	27
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	28
2.1. Böceklerin Toplanması ve Laboratuvarda Yetiştirilmesi	28
2.2. Virüs Taraması.....	29

2.2.1.	Örneklerin Hazırlanması	30
2.2.2.	Ölü Larvalarda Virüs Taraması.....	30
2.2.2.1.	Örneklerin Makroskobik İncelenmesi.....	30
2.2.2.2.	Örneklerin Mikroskobik İncelenmesi	30
2.2.2.3.	Örneklerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile İncelenmesi.....	30
2.3.	Virüs Suşlarının <i>H. cunea</i> 'da Çoğaltılması ve Saflaştırılması	32
2.4.	Virüs Tanımlanması.....	33
2.4.1.	Morfolojik Tanımlanma.....	33
2.4.1.1.	Virüs Suşlarının Işık Mikroskopisi	34
2.4.1.2.	Virüs Suşlarının Elektron Mikroskopisi	34
2.4.1.2.1.	Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)	34
2.4.1.2.2.	Transmisyon Elektron Mikroskopisi (TEM).....	35
2.4.2.	Virüs Suşlarının Moleküler Tanımlanması.....	35
2.4.2.1.	Genomik DNA'nın İzole Edilmesi ve Konsantrasyonun Belirlenmesi	35
2.4.2.2.	Restriksiyon Endonükleaz Analizi ve Agaroz Jel Elektroforezi.....	36
2.4.2.3.	Virüs Suşlarının <i>gran</i> , <i>lef-8</i> ve <i>lef-9</i> Gen Bölgelerinin Çoğaltılması	36
2.4.2.4.	Sekans Analizi ve Filogeni	37
2.5.	Virüs Suşlarının İnsektisidal Aktivite Çalışmaları	40
2.5.1.	Virüs Suşlarının <i>H. cunea</i> Larvaları Üzerindeki Doz Denemeleri.....	40
2.5.2.	Virüs Suşlarının <i>H. cunea</i> 'nın Larval Evreleri Üzerindeki Denemeleri.....	41
2.5.3.	Farklı Besinlerin İnsektisidal Aktivite Üzerindeki Etkilerinin Tespit Edilmesi	41
2.5.4.	HycuGV-Hc1 Suşunun Konak Spektrumlarının Belirlenmesi	41
2.5.5.	HycuGV-Hc1 Suşunun Alanda Saksı Denemeleri.....	42
2.5.6.	İstatistiksel Analizler.....	43
3.	BULGULAR.....	44
3.1.	Virüsün Taraması.....	44
3.1.1.	Larvaların Makroskobik İncelenmesi	44
3.1.2.	Larvaların Mikroskobik İncelenmesi.....	44
3.1.3.	Larvaların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Araştırılması	45
3.2.	Tespit Edilen Virüs Suşlarının Çoğaltılması ve Saflaştırılması.....	46
3.3.	Virüs Suşlarının Morfolojik Tanımlanması	47
3.3.1.	Işık Mikroskopisi	47

3.3.2.	Elektron Mikroskopisi.....	48
3.4.	Virüslerin Moleküler Tanımlanması.....	50
3.4.1.	Restriksiyon Endonükleaz Analizi.....	50
3.4.2.	Virüslerin <i>gran</i> , <i>lef-8</i> ve <i>lef-9</i> Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması ve Filogenisi	51
3.5.	Virüslerin İnsektisidal Aktivite Çalışmaları	59
3.5.1.	Virüslerin <i>H. cunea</i> Üzerindeki Doz Denemeleri.....	59
3.5.2.	Virüslerin <i>H. cunea</i> 'nın Farklı Larval Evreleri Üzerindeki Denemeleri	62
3.5.3.	Farklı Besinlerin İnsektisidal Aktivite Üzerindeki Etkilerinin Tespit Edilmesi	63
3.5.4.	HycuGV-Hc1 Suşunun Konak Dağılımlarının Belirlenmesi.....	63
3.5.5.	HycuGV-Hc1 Suşunun Alanda Saksı Denemeleri.....	65
4.	TARTIŞMA	68
5.	SONUÇLAR	80
6.	ÖNERİLER.....	81
7.	KAYNAKLAR	82
8.	EKLER.....	100
ÖZGEÇMİŞ		

Doktora Tezi

ÖZET

HYPHANTRIA CUNEA GRANULOVİRÜS TÜRKİYE İZOLATININ
KARAKTERİZASYONU

Zeynep BAYRAMOĞLU

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. İsmail DEMİR
2018, 99 Sayfa, 9 Sayfa Ek

Bu çalışmada, Orta Karadeniz Bölgesinin farklı tarım ve ormanlık alanlarında yayılış gösteren Amerikan beyaz kelebeği (Lepidoptera: Arctiidae) popülasyonlarına ait 73 kadavradan 7 granulovirüs (GV) tanımlandı. İzolatların tamamının polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve çoğaltılan dizilerin analizi ile *Hyphantria cunea* granulovirüs (HycuGV) olduğu belirlendi. Bütün izolatların karakterizasyonu yapıldı ve 3. evre *H. cunea* larvalarına karşı insektisidal aktiviteleri test edildi. Işık mikroskopunda parlak yapılar olarak görülen granulovirüslerin boyutları elektron mikroskopunda yaklaşık 318 - 546 nm × 174 - 240 nm olarak ölçüldü. Her bir granülün, ortalama büyüklüğü 35 - 51 nm × 202 - 341 nm olan tek bir çubuk şekilli virion içerdiği belirlendi. Restriksiyon endonükleaz analizi ile genomun yaklaşık 112 kbp büyüklüğünde olduğu hesaplandı. Granulin (*gran*), geç ekspresyon faktörü 8 (*lef-8*) ve geç ekspresyon faktörü 9 (*lef-9*) genlerinin kısmi sekanslarının filogenetik analizleri, viral izolatların, HycuGV'ler ile yakın ilişkili olduğunu ortaya koydu. HycuGV izolatları, aynı familyaya ait HycuGV A5-1, HycuGV A18-3 izolatları ile birlikte gruplaşma gösterdi. İnsektisidal aktivite çalışmalarında HycuGV-Hc1'in 3. evre *H. cunea* larvaları üzerindeki LC₅₀ değeri 2,6 × 10⁴ OB/ml olarak hesaplandı. HycuGV izolatlarının 2. ve 3. evre larvalar üzerinde yüksek ölüm oranı gösterdiği belirlendi. Saksı denemelerinde de HycuGV-Hc1'in 2. evre *H. cunea* larvaları üzerinde %80.7 ölüm etkisi meydana getirdiği gözlemlendi. Bu çalışma Türkiye'den ilk kez izole edilen HycuGV'nin, *H. cunea*'nın mücadelesi için etkili bir biyopestisit olarak önemli potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Hyphantria cunea*, granulovirüs, HycuGV, filogeni, biyolojik mücadele

PhD. Thesis

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF A HYPHANTRIA CUNEA GRANULOVIRUS FROM TURKEY

Zeynep BAYRAMOĞLU

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. İsmail DEMİR
2018, 99 Pages, 9 Pages Appendix

In this study, 7 granuloviruses (GVs) were identified from 73 cadavers belonging to the populations of the American white butterfly (Lepidoptera: Arctiidae) spreading in different agricultural and forest areas of the Central Black Sea Region. All of the isolates were identified as *Hyphantria cunea* granulovirus (HycuGV) by polymerase chain reaction and sequence analysis of these sequences. All isolates were characterized and tested against the third instar *H. cunea* larvae. The dimensions of the granuloviruses, which are seen as bright structures in light microscopy, were measured approximately as 318 - 546 nm × 174 - 240 nm at electron microscope. Each granule was found to contain a single rod-shaped virion with an average size of 35 - 51 nm × 202 - 341 nm. The genome was calculated to be ~112 kb in size by restriction endonuclease analysis. Phylogenetic analysis of partial sequences of granulins (*gran*), late expression factor 8 (*lef-8*) and late expression factor 9 (*lef-9*) genes showed that viral isolates are closely related to HycuGVs. HycuGV isolates were grouped together with HycuGV A5-1 and HycuGV A18-3 isolates of the same family. In the insecticidal activity studies, the LC₅₀ value of HycuGV-Hc1 from isolates was calculated as 2.6×10^4 OB/ml on the 3rd stage *H. cunea* larvae. HycuGV isolates showed high mortality on 2nd and 3rd instar larvae. It was observed that HycuGV-Hc1 caused 80.7% mortality against 2. instar *H. cunea* larvae in pot experiments. This study showed that HycuGV, isolated in Turkey for the first time, has significant potential as biopesticide against *H. cunea*.

Key Words: *Hyphantria cunea*, baculovirus, granulovirus, virus phylogeni, biological control

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Bakülovirüslerin morfolojisi	9
Şekil 2.	Tipik bir NPV'de tomurcuk virüs ve gömülü üretilen virüs yapısı	11
Şekil 3.	Bakülovirüslerin hayat döngüsü.....	13
Şekil 4.	<i>H. cunea</i> 'nın Dünya'daki dağılımı.....	21
Şekil 5.	<i>H. cunea</i> 'nın Türkiye'deki yayılışı	21
Şekil 6.	<i>H. cunea</i> 'nın biyolojisi.....	23
Şekil 7.	<i>H. cunea</i> 'nın zarar şekli	24
Şekil 8.	Arazi çalışmaları yapılan lokasyonlar	29
Şekil 9.	Viral suşların izolasyon ve saflaştırma aşamaları	33
Şekil 10.	Sera denemeleri.....	43
Şekil 11.	Mikroskopik incelemede GV'lerin görüntüsü	45
Şekil 12.	<i>H. cunea</i> ölü larvalarında PCR ile bakülovirüs tarama sonuçları	46
Şekil 13.	Enfeksiyon yapılan <i>H. cunea</i> larvası.....	46
Şekil 14.	HycuGV suşlarının faz-kontrast mikroskobu karanlık alan görüntüleri.....	47
Şekil 15.	Giemsa boyama sonucu HycuGV suşlarının faz kontrast mikroskobu görüntüleri.....	48
Şekil 16.	HycuGV Hc1 suşuna ait taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.....	49
Şekil 17.	HycuGV-Hc1 suşunun transmisyon elektron mikroskobu görüntüleri.....	49
Şekil 18.	HycuGV suşlarına ait <i>EcoRI</i> ve <i>HindIII</i> restriksiyon profilleri.....	50
Şekil 19.	HycuGV suşlarının PCR görüntüsü	52
Şekil 20.	HycuGV suşlarının <i>gran</i> genine ait filogenetik analizi	53
Şekil 21.	HycuGV suşlarının <i>lef-8</i> genine ait filogenetik analizi.....	54
Şekil 22.	HycuGV suşlarının <i>lef-9</i> genine ait filogenetik analizi.....	55
Şekil 23.	HycuGv-Hc1 izolatına ait <i>gran</i> DNA dizisi hizalaması	56
Şekil 24.	HycuGv-Hc1 izolatına ait <i>lef-8</i> DNA dizisi hizalaması.....	57
Şekil 25.	HycuGv-Hc1 izolatına ait <i>lef-9</i> DNA dizisi hizalaması	58
Şekil 26.	HycuGV suşlarının üçüncü evre <i>H. cunea</i> larvaları üzerindeki ölüm oranları	60
Şekil 27.	HycuGV larvası.....	60
Şekil 28.	HycuGV suşlarının 14. gündeki ölüm etkisini gösteren	

konsantrasyon etki eğrileri	61
Şekil 29. HycuGV suşlarının 2., 3., 4. ve 5. evre <i>H. cunea</i> larvaları üzerindeki ölüm oranları.	62
Şekil 30. Farklı besinlerin HycuGV-Hc1 suşunun enfeksiyonundaki etkisi.....	63
Şekil 31. HycuGV-Hc1 izolatu ile enfekte edilen konaklar.....	64
Şekil 32. HycuGV-Hc1 suşu ile enfekte <i>M. neustria</i> , <i>S. exigua</i> ve <i>H. armigera</i> larvalarından çoğaltılan granülin geninin PCR sonucu.....	64
Şekil 33. HycuGV-Hc1 suşunun <i>M. neustria</i> , <i>S. exigua</i> ve <i>H. armigera</i> larvaları üzerindeki insektisidal aktivitesi.....	65
Şekil 34. HycuGV-Hc1 suşu uygulanan dut fidelerinde <i>H. cunea</i> larvalarının 7. gündeki etkisi	66
Şekil 35. Saksı denemelerinde HycuGV-Hc1 suşunun <i>H. cunea</i> larvaları üzerindeki ölüm etkisi.....	67

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Böceklerden izole edilen virüslerin familyaları, genom özellikleri ve tespit edildikleri konukçu takımlar	5
Tablo 2. Bakülovirüs'lerin kullanıldığı çalışma sahaları	7
Tablo 3. Bazı ticari bakülovirüs biyopestisitlerinin örnekleri	18
Tablo 4. Arazi çalışmalarında <i>H. cunea</i> ile ilgili kaydedilen bilgiler.....	29
Tablo 5. Bakülovirüs taramasında kullanılan primerler	32
Tablo 6. Viral suşların gen bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan primerler	37
Tablo 7. Filogenetik analizde kullanılan referans türler.....	38
Tablo 8. HycuGV-Hc1 suşunun <i>EcoRI</i> ve <i>HindIII</i> restriksiyon endonükleaz analizine göre fragment sayısı ve genom büyüklüğü.....	51
Tablo 9. HycuGV suşlarının üçüncü evre <i>H. cunea</i> larvaları üzerindeki LC ₅₀ değerleri ve istatistik analiz sonuçları	61

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μm	: Mikrometre
nm	: Nanometre
ml	: Mililitre
μl	: Mikrolitre
PCR	: Polimraz Zincir Reaksiyonu
REN	: Restriksiyon Endonükleaz
OB	: Oklüzyon Yapı
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoxynucleotide Triphosphate
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
Na_2CO_3	: Sodyum Karbonat
HCl	: Hidroklorik asit
MgCl_2	: Magnezyum klorür
H_2O	: Su
dk.	: Dakika
sn.	: Saniye
M	: Molar
NaCl	: Sodyum klorür
EM	: Elektron mikroskobu
TAE	: Tris-Asetat EDTA
dsDNA	: Çift zincir deoksiribonükleikasit

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

İnsanlığın dünyadaki yaşamının sürdürülebilirliği için tarımsal üretim vazgeçilemez bir zorunluluktur. Özellikle bitkisel üretim tarımsal faaliyetleri içerisinde en önemli kısmı oluşturmaktadır. Sadece besin gıdası olarak değil aynı zamanda süs bitkileri ve ormanlık alanlardaki bitkilerin de insanlık için gerekli olduğu unutulmamalıdır. Bitkisel üretimin her aşamasında ürünlerin zarar görmesine neden olan birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler arasında böcekler önemli bir kısmı oluşturmaktadır. Yıllardır ürünlerin korunması amacıyla birçok yöntem böceklerle mücadelede uygulanmaktadır. Özellikle ikinci dünya savaşından sonra birçok kimyasal ilaç dünyada yoğun bir şekilde kullanılmaya başlamıştır. Kimyasal ilaçların kullanımı zararlılarla mücadelede oldukça etkili olmuştur. Ancak, bu ilaçların kalıntı bırakması, toprağı ve suyu kirletmesi, insanlar ve diğer canlılar ve yararlı organizmalar için tehlike oluşturması, böceklerin bu ilaçlara karşı direnç geliştirmesi gibi olumsuz etkileriyle beraber zararları görülmeye başlamıştır. Bu nedenle zararlılarla mücadelede kimyasal ilaçların olumsuz etkilerini ortadan kaldıracak, tarımsal üretimde çevreye zarar vermeyecek mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi ve kullanılması gerekmektedir. Böylece mücadele yöntemlerinin zararlıların belirli bir seviyede tutulması için kullanılan Entegre Mücadele Yöntemlerine (IPM) ek olarak biyolojik ve biyoteknik mücadele yöntemlerinin kullanılması için çalışmalara önem verilmelidir. Bu zamana kadar zararlılarla mücadele noktasında dünyada yapılmış bilimsel çalışmalara bakıldığında, biyolojik mücadele çalışmaları oldukça dikkat çekmektedir.

Biyolojik mücadele, hedeflenen bir zararlı böcek türüne karşı predatör, parazit ve patojen gibi doğal düşmanlar kullanılarak yapılan uygulamaları kapsamaktadır. Bu zamana kadar fungus, nematod, bakteri, protozoa ve virüsler birçok zararlı böcekte tespit edilmiştir. Bu etmenler hedeflenen zararlı böceklerin mücadelesinde önemli bir role sahiptir.

Bu etmenlerin birçoğı konak böceğı özgü olabilmektedir. Böylece ortamda bulunan diğer yararlı organizmalar bu etmenlerden etkilenmemekte, sadece mücadele edilmek istenilen organizmalar etkilenmektedir. Bu etmenler ekosistemde herhangi bir kirliliğe de

yol açmamaktadır. Bu sahadaki başarı ile gelecekte kimyasal insektisitlerin yerini bu mikrobiyal mücadele yöntemlerinin alacağı düşünülmektedir.

Zararlı böceklerle karşı mücadelede yaygın olarak kullanılan kimyasal insektisitlerin çevreye yapmış oldukları olumsuz etkilerden kurtulmak ve geleceğimizi güvence altına almak için biyolojik mücadeleye yönelim kaçınılmaz olmuştur. Biyolojik mücadelede kullanılan etmenlerden virüsler, zararlıların doğal düşmanları olup çoğunlukla sadece hedef zararlı üzerinde etkiye sahiptir. Böcek virüslerinin izole edilip geliştirilerek zararlı böceklerle mücadelede kullanılması, sürdürülebilir ürün üretiminde kimyasalların kullanımını büyük ölçüde sınırlayabilecektir.

Virüslerin biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılmalılarının pek çok faydası vardır. Bunlar arasında dar konak spektrumuna sahip olmaları yani doğrudan hedefledikleri organizmalar üzerinde etkili olmaları gelmektedir. Ayrıca, insanlarda hastalık oluşturmamaları oldukça dikkat çeken özellikleri arasındadır (Demirbağ ve Beldüz, 1997). Virüsler böceklerin doğal düşmanlarıdır. Bu doğal düşmanlar arasında özellikle bakülovirüsler yalnızca böceklerde hastalık oluşturdıklarından, diğer omurgalılarda enfeksiyon oluşturmadıklarından güvenli biyolojik mücadele materyalleridirler. Ayrıca, bu virüsler üzerinde genetik modifikasyonlar yapılarak sadece bir tür zararlı böceği öldüren etmenler geliştirilebilir. Yine amaca uygun olarak, birden fazla zararlı böcek, moleküler tekniklerle geliştirilen rekombinant bir virüs ile de öldürülebilir (Martens vd., 1990).

Virüsler birçok konukçu böcekten izole edilerek tanımlanmıştır. Bunların büyük bir çoğunluğu eklembacıklılardan izole edilen bakülovirüslerdir (Murphy vd., 1995). Bakülovirüsler birçok biyolojik mekanizmanın aydınlatılmasında yararlı olan araştırmalarda önemli materyaller olarak kullanılmaktadır (Bilimoria, 1991; Demir, 2004). Bu virüsler, biyolojik mücadelede birçok böcek zararlısına karşı tarım ve ormancılıkta yaygın kullanılan etmenlerdir (Flexner ve Belnavis, 2000; Harrison ve Bonning, 2000). Bakülovirüsler tıbbi, ekonomik ve endüstriyel bakımdan önemli, çeşitli proteinlerin üretildiği gen ekspresyon vektörleri olarak biyoteknolojide kullanılmaktadır (King ve Possee, 1992; Demirbağ vd., 1998; Demir vd., 2000; Beljelarskaya, 2002). Ayrıca, bu virüsler memeli hücre sistemlerine gen transferinde kullanılmalarıyla ilgili araştırmalarda gen terapi vektörleri olarak kullanılmaktadır (Ghosh vd., 2002; Hu, 2006). Bu virüslerin yeni izolatlarının veya yeni türlerinin keşfedilmesi daha verimli ve daha güvenilir materyallerin elde edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca, yeni izolatları ile birlikte yeni

moleküler mekanizmaların keşfedilmesi ve bu mekanizmaların çalışma sistemlerinin ortaya konulması da böcek virüslerinin bu alanlardaki kullanılabilirliğini arttırmaktadır.

Çoğu virüs böcekleri hastalandırarak böcek salgınlarını meydana getirmektedir (Steinhaus, 1956). Çiğneyici ağız yapısına sahip yaprak yiyen böcekler virüs enfeksiyonlarına karşı daha duyarlıdır. Örneğin yaprak yiyen Lepidoptera tırtılları ve Hymenoptera'nın yalancı tırtılları viral etmenlere karşı daha hassastır (Weiser, 1969). Bu virüsler genelde 2 – 3 yılda bir meydana çıkan epidemilerde artarak birçok larvayı öldürür ve böylece zararlarını ortadan kaldırır (Lipa, 1975). Virüsler birçok böcek takımıyla ilişkilidir. Buna ek olarak çoğunluğunu Lepidoptera (%83), Hymenoptera (%10) ve Diptera (%4) takımları oluşturmaktadır (Ignoffo, 1974).

Böceklerden izole edilen 16'dan fazla virüs familyası bulunmaktadır (Posse ve King, 2014). Bunlar arasında Baculoviridae, Nodaviridae, Picarnoviridae, Polydnviridae, Rhabdoviridae, Tetraviridae, Poxviridae, Ascoviridae, Reoviridae, Iridoviridae, Dicistroviridae ve Parvoviridae familyaları yaygın olarak bulunmaktadır (Fauquet vd., 2005). Bu böcek virüslerinden, Baculoviridae familyası yaygın olarak çalışılan böcek gruplarından biridir (Demirbağ ve Beldüz, 1997).

Bakülovirüsler, böcekleri hastalandıran faydalı viral patojenlerdir (Miller, 1997). Virüs familyaları arasında Baculoviridae familyasında yer alan Nükleopolihedrovirüs (NPV) ve Granulovirüs (GV) başlıca biyolojik mücadele etmenlerini oluşturmaktadır. Çoğu Lepidoptera ve Hymenoptera takımında bulunan 600'den fazla böcek türünün Bakülovirüs'lerin konukçusu olduğu rapor edilmiştir (Lacey, 2001; Rohrmann, 2013; Dhladhla, 2012). Bakülovirüsler yakın ilişkili böcek türlerinin dar bir yelpazesinde oldukça etkili olduğundan bu virüslerin enfekte ettiği böcek türlerinin sayısı Baculoviridae familyasının çeşitliliğine ve dağılımına dikkat çekmektedir (Lapied, 2009; Szewczyk vd., 2006; Cory ve Bishop, 1997; Moscardi vd., 1999). Ülkemizde bu zamana kadar nükleoplhedrovirüsler izole edilmesine (Toprak ve Gürkan, 2004; Demir vd., 2013; Demir vd., 2014; Bayramoğlu vd., 2018; Gencer vd, 2018) karşın granulovirüs izolasyonu yapılmamıştır.

Kuzey Amerika orijinli bir böcek olan Amerikan beyaz kelebeği (*Hyphantria cunea* Drury, Lepidoptera: Arctiidae) polifag bir zararlıdır. Dünyada 230 bitki türü üzerinde beslenerek geliştiği bilinen zararlının Türkiye'de 48 bitki taksonu üzerinde yaşadığı görülmüştür. Etkili olduğu konukçuları arasında çok sayıda orman, süs ve endüstriyel öneme sahip ağaç türleri bulunan *H. cunea*, ülkemizde en önemli fındık zararlılarından

biridir. Günümüze kadar, mekanik yöntemler, kimyasal uygulamalar, *Bacillus thuringiensis* preparatları ve kitin inhibitörü (diflubenzuron) kullanımı gibi yöntemlerden yararlanılarak zararlı ile mücadele edilmeye çalışılmıştır. Ancak, mevcut uygulamaların yeterli olmadığı ve zarar boyutunun gün geçtikçe arttığı görülmektedir. Bu durum yeni etmenlerin izole edilerek ilave mücadele tedbirlerinin acilen geliştirilmesine büyük ihtiyaç olduğunu ortaya koymaktadır.

1.2. Böcek Virüslerinin Genel Özellikleri

Böcek virüsleri böceklerden izole edilmiş en küçük formlardır. Bu virüsler, bir nükleik asit ve bunu içerisine alan protein bir örtüye (kapsid) sahiptir. Bazılarında da nükleik asit ve kapsidi çevreleyen lipit bir zarf bulunmaktadır. Bazı virüsler etraflarını kuşatan protein örtüden başka farklı bir protein yapı içine de gömülü halde olabilir. Bu yapı inklüzyon cisimciği olarak adlandırılır. Inklüzyon yapılar içerisine gömülü olarak bulunan virüsler gömülü virüsler (OB) şeklinde adlandırılır. Bu yapılar bu zamana kadar sadece Baculoviridae, Reoviridae ve Poxviridae gibi virüs familyalarında kaydedilmiştir (Hunter-Fujita vd., 1998). Böceklerden izole edilen virüslerin, genom özellikleri, kaydedildikleri konukçu takımları ve konukçularının biyolojik dönemleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Böceklerden izole edilen virüslerin familyaları, genom özellikleri ve tespit edildikleri konukçu takımlar*

Virüs Familyaları	Genom	Kaydedildiği Konukçu Takımlar	Genel Konukçu Dönemleri
Baculoviridae: NPV ve GV	dsDNA	Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Neuroptera, Siphonaptera, Thysanura, Trchoptera	Larva, bazen pupa veya ergin
Reoviridae: CPV	dsRNA	Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera	Larva, pupa, ergin
Entomopoxviridae: EPV	dsDNA	Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Orthoptera	Larva
Iridoviridae: IV	dsDNA	Hemen hemen tüm böcekler ve diğer omurgasız familyaları	Larva
Ascoviridae	dsDNA	Lepidoptera (sadece Noctuidae familyası)	Larva
Polydnaviridae	dsDNA	Parazitik Hymenoptera	Ergin
Parvoviridae: DNV	ssDNA	Diptera, Blattoidae, Lepidoptera, Odonata, Orthoptera	Larva, pupa, ergin
Birnaviridae	dsRNA	Diptera (sadece <i>Drosophila</i> cinsinde kaydedilmiş)	Ergin
Caliciviridae	ssRNA	Lepidoptera (sadece Noctuidae familyası)	Larva
Nodaviridae	ssRNA	Diptera, Coleoptera, Lepidoptera	Larva, ergin
Picornaviridae	ssRNA	Diptera, Lepidoptera, Orthoptera ve geniş böcek familyaları	Larva, ergin
Rhabdoviridae	ssRNA	Diptera	Ergin
Tetraviridae	ssRNA	Lepidoptera	Larva

*Çizelgenin orijinali Evans ve Shapiro (1997)'dan alınmıştır.

Özellikle bakülovirüsler, reovirüsler, entomopoksvirüsler ve iridovirüsler olmak üzere neredeyse bütün böcek virüsleri biyoteknolojik araştırmalarda kullanılmaktadır (Nalçacıoğlu, 2003; Demir, 2004; Sezen, 2004). Fakat şimdiye kadar en çok çalışılan ve biyoteknolojik olarak en yoğun kullanılan böcek virüsleri bakülovirüslerdir (Possee, 1997; Inceoğlu vd., 2001; Kost vd., 2005; Knipe vd., 2007).

Virüsler yeryüzünde canlı hayatın olduğu her yerde bulunan, muhtemelen en yaygın ve çeşitlilikte biyolojik varlıklar olarak bilinirler (Suttle, 2005a; Suttle, 2005b; Suttle, 2007). Çeşitlilikleri ve evrimsel süreçlerinin anlaşılmasına ek olarak aşağıdaki böcek virüslerini öne çıkarmaktadır.

- i. Faydalı böceklerin virüs enfeksiyonlarından korunması [Örneğin, bal arısı (*Apis mellifera* L.) ipek böceği (*Bombyx mori* L.)] (Maori vd., 2009)
- ii. İstilacı türleri de içeren zararlı böceklerin mücadelesinde böcek virüslerinin pratik kullanımı [Örneğin, elma iç kurdu (*Cydia pomonella* L.) ve fasulye tırtılımı (*Anticarsia gemmatalis*'i Hübner) içeren çeşitli lepidopter zararlılarına karşı çeşitli viral preparatların kullanılması] (Moscardi, 1999)
- iii. Böceklerde tanımlanan vektör virüslerinin insan, hayvan ve bitki sağlığı için önemi (Gray ve Banerjee, 1999)
- iv. Böcek virüslerinin protein ifadesi ya da gen susturma vektörü olarak kullanımı (Bonning, 2006; van Oers, 2011).

1.2.1. Bakülovirüsler

Bakülovirüsler, geniş bir virüs grubu olup, farklı takımlara ait çok sayıda zararlı ve hatta faydalı böceklerde de bulunur (Volkman vd., 1995). Ayrıca, çeşitli Crustacea (kabuklu) üyelerinde de tespit edilmişlerdir (Blissard vd., 2000). Konakları sadece omurgasızlarla sınırlı olduğundan, bakülovirüsler tek başına veya pestisitler ve diğer kimyasal etmenlerin birlikte kullanıldığı ekolojik zararlı mücadele programlarında, önemli tarım, orman ve süs bitkisi zararlılarının mücadelesi için potansiyel olarak kullanılan faydalı etmenlerdir (Moscardi, 1999).

Dar konak spektrumuna sahip olmaları, yani direkt hedeflendikleri organizmalar üzerinde etkili olmalarından dolayı bakülovirüsler biyolojik mücadelede yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, insanlar üzerinde etkili olmamaları ve çevreyi kirletici etkilerinin bulunmaması da bu virüslerin kullanımını açısından oldukça büyük önem taşımaktadır.

Rekombinant bakülovirüsler, farklı ökaryotik genleri araştırmak ve biyoteknolojik araştırmalar için böcek hücre kültürlerinde üretilir (Luckow, 1991; O'Reilly vd., 1992). Bu virüsler, günümüzde ihtiyaç duyulan bazı proteinlerin üretilmesinde ve çeşitli genlerin tanımlanmasında, oldukça geçerli olan ve etkili sonuçların alındığı biyoteknolojik çalışmalarda da önemli bir araştırma materyali haline gelmiştir (Ghosh vd., 2002). Bakülovirüs ekspresyon vektör sisteminin kullanılmasıyla, birçok hastalığa karşı tedavi amacıyla kullanılan proteinlerin üretilmesi, ilaç hammadde eksikliğinin giderilmesi (Vlak ve Keus, 1990) ve çeşitli organizmalara ait genlerin tanımlanması sağlanmıştır. Bakülovirüsler aracılığı ile insanlar dahil birçok memeli organizmaya ait hücrelere gen transferi yapılabilmektedir. Öte yandan, tıbbi ve endüstriyel açıdan önemli olan çeşitli prokaryotik, ökaryotik, viral ve fungal genlerin bu virüsler aracılığıyla ekspres edilmeleri, bu virüsleri biyoteknolojide önemli kılmaktadır (Demirbağ vd., 1998; Beljelarskaya, 2002) (Tablo 2).

Bakülovirüsler prokaryotik ve ökaryotik organizmaların genomlarına yapı ve gen düzeyleri açısından kısmen benzerlik gösterdiğinden, moleküler biyoloji ve rekombinant DNA araştırmaları için de iyi bir model olarak görülmektedir (Blissard ve Rohrmann, 1990).

Tablo 2. Bakülovirüs'lerin kullanıldığı çalışma sahaları

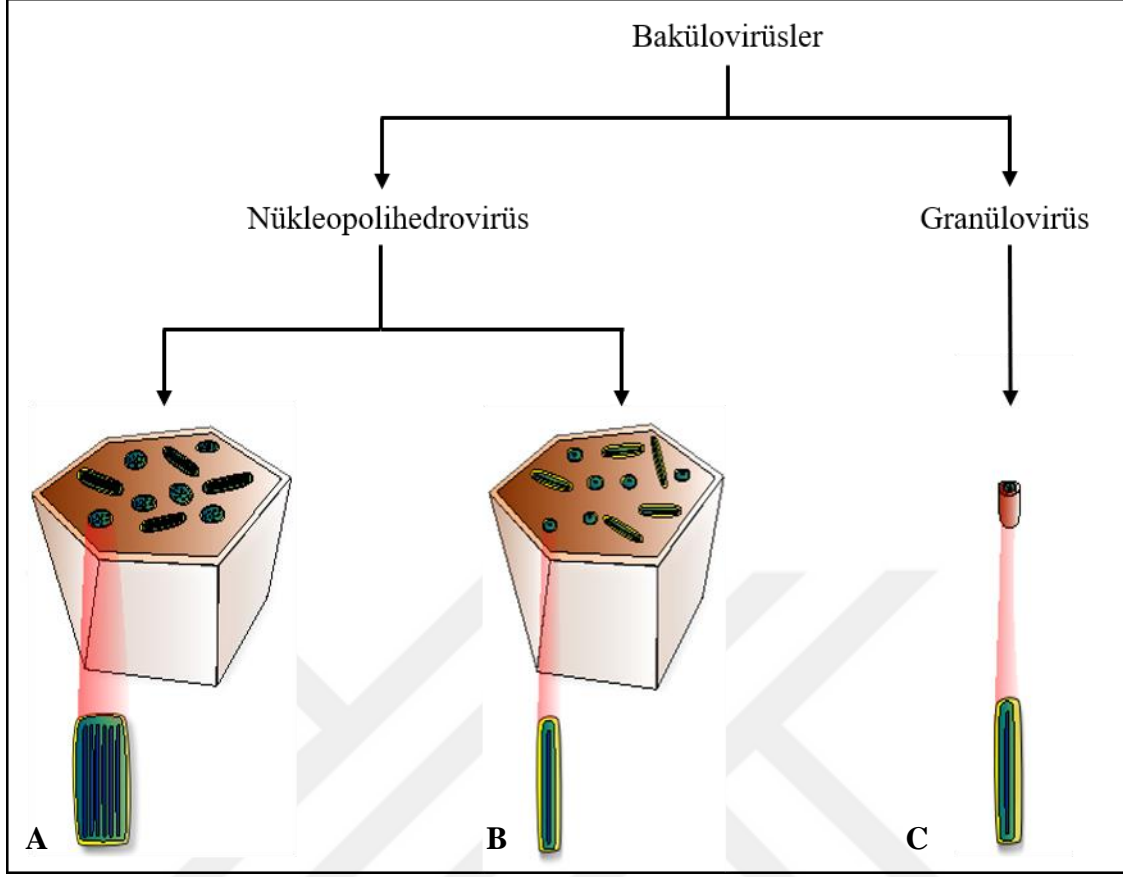
	Kullanılan saha	Kullanım şekli
	Biyolojik mücadele	Tarım ve orman zararlılarına karşı tek başına ya da diğer etmenlerle birlikte
	Moleküler biyoloji	Ökaryotik hücrelere benzedikleri için moleküler biyoloji ve rekombinant DNA çalışmalarında model olarak
Bakülovirüs'ler	Gen ekspresyonu	Tıbbi, endüstriyel ve zirai mücadelede ilgi duyulan gen ürünlerinin üretilmesi için ekspresyon vektörü olarak
	Gen tedavisi	Kusurlu genlerin normal genlerle yer değiştirilmesi, kusurlu gen işlevlerinin geri dönüşümünün sağlanması ve belirli genleri regülasyonlarının uyarılması şeklinde hastalıkların tedavisinde gen tedavi vektörü olarak

1.2.1.1. Bakülovirüslerin Taksonomisi

Bakülovirüs izolatları izole edildikleri konak türlere ve gömülü yapı tipine bağlı olarak ilk olarak nükleopolihedrovirüs veya granulovirüs ile ilişkilendirilerek adlandırılırlar (Hunter-Fujita vd., 1998).

Bakülovirüsler, nükleopolihedrovirüs (NPV) ve granulovirüs (GV) olarak farklı gömülü yapılardaki morfolojilerine bağlı olarak iki cinse ayrılarak gruplandırılmaktadır. Son zamanlarda, Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (ICTV), DNA dizi verilerine göre *Baculoviridae* için yeni bir sınıflandırma kabul etmiştir. Bu hem gömülü yapı morfolojisi hem de konak taksonomi sınıflandırması ile ilişkileri korumaktadır. Yeni sınıflandırmada *Baculoviridae* familyası 4 cinse bölünmüştür: Alfabakülovirüsler (lepidopterden izole edilen nükleopolihedrovirüsler), Betabakülovirüsler (lepidopterden izole edilen granulovirüsler), Gamabakülovirüsler (hymenopteradan izole edilen nükleopolihedrovirüsler) ve Deltabakülovirüsler (dipteradan izole edilen nükleopolihedrovirüsler) (Jehle vd., 2006).

Nükleopolihedrovirüslerde bulunan başlıca protein, enfeksiyonda çok geç ifade edilen polihedrindir. Çok katlı gömülü yapı partiküllerinin her biri bir çokgen içerisinde gömülüdür ve bir veya birden fazla nükleokapsid içerebilirler. Bu gözlem virion başına birçok zarflı nükleokapsid içeren çoklu nükleopolihedrovirüsler (MNPV'ler) (Şekil 1A) ve bir nükleokapsid içeren tek nükleopolihedrovirüsler (SNPV'ler) (Şekil 1B) olarak NPV'lerin gruplaşmasına neden olmaktadır. Diğer önemli bakülovirüs cinsi olan GV'ler ana protein bileşeni olarak granülün ile ovoidal (oval şekilli) granüller olarak görünen karakteristik gömülü yapılara sahiptir. Genellikle GV'ler tek bir nükleokapsid ile gömülü yapı başına tek bir virion içermektedir (Şekil 1C) (Funk vd., 1997).



Şekil 1. Bakülovirüslerin morfolojisi. A: Çoklu nükleokapsidli NPV; B: Tekli nükleokapsidli NPV; C: Granülovirüs (Haase vd. 2013).

Granülovirüsler her koruyucu gömülü kristalde normal olarak tek viriyona sahip olmaları bakımından NPV'lerden biraz farklıdır. Granül ya da kapsül olarak isimlendirilen kristaller polihedralardan daha küçük, yuvarlak uçlu çubuk şeklindedir. Işık mikroskobu altında 1000X'lik büyütmede granüllerin boyutları 0.2 – 0.4 μm parlak oval kristaller olarak görülmektedir (Rohrmann, 2013). Her granül içerisindeki tek bir virion kimyasal olarak 25 – 30 kilodalton (kDa)'luk polipeptitten oluşan NPV'nin polihedrinine çok benzeyen bir kristal protein matriks tarafından çevrelenmiştir. GV'deki bu protein granülün olarak isimlendirilmektedir.

Yüz elliden fazla böcek türünün (lepidopterler) GV'lere duyarlı olduğu bilinmektedir (Rohrmann, 2013). GV'ler genellikle NPV'lerin etkisine benzer şekilde orta bağırsak epitel hücreleri vasıtasıyla böcekleri enfekte etmektedir. Kapsüller orta bağırsağın alkali koşullarında çözündüğünde orta bağırsak epitel hücrelerini istila eden virionlar salınır. Bu hücrelerde virüsler çoğalır ve önemli hedef organ olan yağ dokularını enfekte etmek için viriyonlar üretilir. GV'lerin bazı türleri de hipodermal ve trakeal dokulara saldırabilir. Yağ

dokunun işgal edildiği yerde ana enfeksiyon belirtileri büyüme oranını azaltır. Bazı türlerde büyüme normal larva ömrünün ötesine geçebilir ve hatta enfekte olmamış larva boyutundan daha büyük larva oluşturabilir. Bu larvalar giderek daha zayıf ve halsizleştikten sonra ölümler ve morfolojik olarak benekli veya diğer renk değişikliklerini gösterirler. Bu enfeksiyonlar NPV'lerinkinden çok daha yavaş (genellikle ölümler 20 - 30 gün sürmekte) olmaktadır. Yağ doku dışındaki diğer dokulara saldırı yapan GV türlerinde belirtiler 4 - 7 gün ile sonuçlanan ölümler ile NPV'lere benzerdir. Enfekte olan larvaların cildi solgun halde ve sonraki aşamada kopma eğilimi gösteren çok kırılğan bir şekildedir.

Bağda üzüm yaprak zararlısı olan *Harrisina brillians* (Lepidoptera: Zyganenidae)'ı etkileyen bir GV, enfeksiyon ve virüs replikasyonunu sadece orta bağırsak dokusunda sınırlamaktadır. Bu larvalar solmuş ve sıkça büzüşmüş ve koyulaşmış renkli olurlar. Bağırsaktan boşalan bir dışkı yaygın olarak birçok enfektif GV kapsülü içermektedir.

Sonuç olarak, yağ dokudan başka dokulara saldıran GV'ler hızlı ölüme neden olduklarından mikrobiyal insektisitler olarak dikkat çekicidirler. Bunlardan *Cydia pomonella* GV elma iç güvesi (*C. pomonella*)'nin mücadelesi için ticari olarak mevcuttur. *Pieris rapis* GV ve *Plutella xylostella* GV gibi diğer GV'ler de ticari öneme sahiptir.

1.2.1.2. Bakülovirüs Genomu

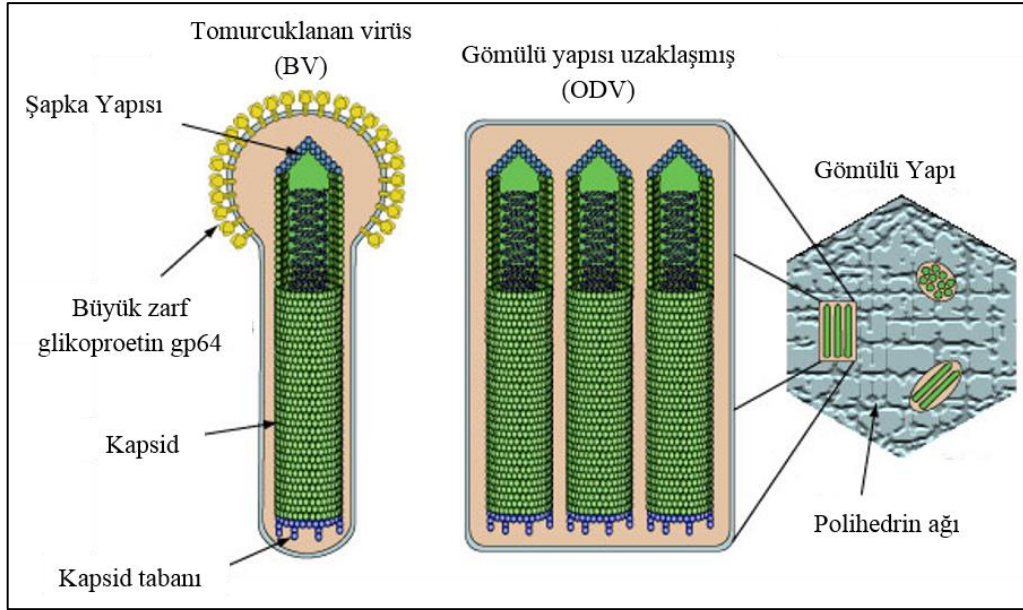
Bakülovirüsler 200-400 nm uzunlukta, 36 nm genişlikte çubuk şeklinde olan bir virüs partikülünde 80-180 kb arasında değişen kapalı, dairesel, çift zincir DNA genomuna sahiptir (Funk vd., 1997). Bakülovirüs genomları bazı önemli biyolojik fonksiyonlarda rol oynayabilen ve virüs familyasının ayırt edici bir özelliğini temsil eden temel genler olarak bilinen 31 geni kodlamaktadır (Miele vd., 2011). Temel genler işlevlerine göre; replikasyon, transkripsiyon, paketleme, hücre döngüsü durdurma ve ağızdan bulaşıcılık gibi fonksiyonlarına göre sınıflandırılmaktadır. Bu virüslerin ayırıcı patojenitesi ile ilişkili olabilen NPV'lerde olmayan, yalnızca GV'lerde mevcut olan bazı genler de vardır. Bakülovirüs genom yapısı tanımlandığı için bir model olarak sıkça kullanılan ve yonca böceği türlerini enfekte eden *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) en fazla çalışılan bakülovirüs genomudur (Possee ve Rohrmann, 1997; Friesen, 2007). Günümüzde 40'dan daha fazla bakülovirüs genom sekansından dört bin civarında genin bulunduğu bir veri tabanı mevcuttur (NCBI, GenBank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Otuz bir temel genin, dizi analizi yapılmış tüm genomlarda korunmuş olduğu rapor edilmiştir (Ferelli vd., 2012).

Bu durum bu genlerin bakülovirüs yaşam döngüsünde önemli rollere sahip olduklarını göstermektedir (Hiscock ve Upton, 2000; McCarthy ve Van Beek, 2008).

Günümüze kadar 200'den fazla bakülovirüs tanımlanmış ve veri tabanlarında kaydedilmiştir (NCBI, GenBank). Özellikle son yıllarda artan bir şekilde bakülovirüslerin tüm genom sekans analizi yapılmaktadır (Willis vd., 2005; Ikeda vd., 2006; Jakubowska vd., 2006; Harrison ve Popham, 2008; Cuartas vd., 2015).

1.2.1.3. Bakülovirüs Hayat Döngüsü

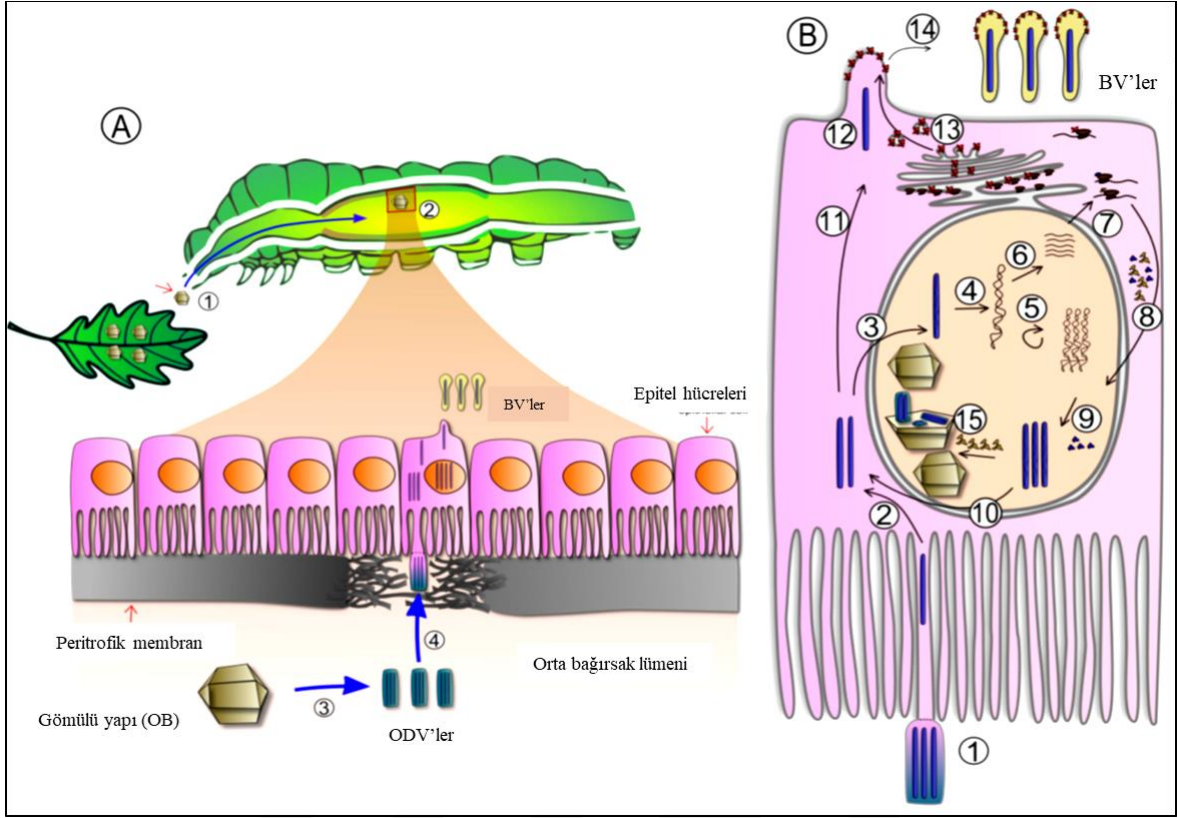
Bakülovirüsler hayat döngüleri sırasında iki farklı virion fenotipi üretir (Şekil 2). Tomurcuk Virüs-Budded Virus (BV) enfekte hücrelerde erken görülen ve böcek vücudunda hastalığın yayılmasından sorumludur. İkinci virion, gömülü virüs (OV) bir böcekten diğerine virüsün yatay iletilmesinden sorumludur. Polihedrin/granülün proteinini olarak bilinen bu protein enfeksiyonda çok geç safhada üretilir (Bergold, 1963). Bu gömülü yapılar viral hayat döngüsünde virionları abiyotik faktörlerden korur (Ferelli vd., 2012).



Şekil 2. Tipik bir NPV'de tomurcuk virüs ve gömülü üretilen virüs yapısı (Slack ve Arif, 2006).

Gömülü yapılar besin ile birlikte duyarlı konak tarafından yutulduğunda bakülovirüs enfeksiyonu başlar. Böcek sindirim sisteminin yüksek alkali koşullarında OB'nin koruyucu proteini çözünür ve gömülü yapısı çıkarılmış enfektif virionlar (ODV) serbest kalır (Pritchett vd., 1984; Rohrmann, 2013) (Şekil 3). Bu ODV'ler bağırsak peritrofik membrandan geçer ve kolumnar epitel hücrelerdeki mikrovilluslarla kaynaşır (Faulkner vd., 1997; Haas-Stapleton vd., 2004) (Şekil 3A). Stoplazmaya girip çekirdeğe göç edecek nükleokapsidler serbest kalır. Bu, bağırsak hücreleriyle sınırlı olan virüsün ilk replikasyon döngüsünü başlatır. Çözümlerden sonra virüs replikasyonu başlar (Friesen, 1997; O'Reilly vd., 1992). Enfekte olan hücrenin çekirdeği yeni virüsler üretilmeye başlandığında enfeksiyondan 8 saat sonra şişmiş ve genişlemiş olur. Bu yeni virüs parçacıkları tomurcuk virüsdür ve çıplak nükleokapsidlerden oluşur. Hücre dışına çıktıkları yerde bir zarf ve hücreyi terk etmeden önce virionun bir ucunda özel bir 64 kDa protein içeren peplomerler denen protein yapıları kazanırlar (Washburn vd., 2003). Bu noktada viral replikasyonun birinci aşaması tamamlanır ve bunu diğer vücut dokularında enfeksiyonun ikinci aşaması takip eder.

Bir böcek larvasından diğerine enfeksiyonun taşınması için oluşturulan virüs formu olan OB gibi BV enfeksiyonun bağırsakta başladığı ilk yerden diğer dokulara yayılan virüs formudur. Bağırsak döngüsünden sonra BV partikülleri hemolenfe vücut boyunca yayılır ve konakta diğer dokuları enfekte eder (Harrap, 1970; Washburn vd., 2003). Bu dokularda enfeksiyonda ikinci bir döngü oluşur ve OB'ler üretilir. Nükleokapsidler nüklear membrandan zarflarını kazanır. Enfeksiyonun sonraki bir evresinde polihedrin/granülün sentezlenir ve yeni OB'leri oluşturmak için nükleokapsid gömülü halde kristallerden oluşarak yoğunlaşır ve böylece döngü tamamlanır. Yüksek miktarlarda OB içeren hücreler patlar ve parçalanır ve OB'lerin üretimi beraberinde vücudun kitlesel yıkımı sonunda böceği öldürür (Şekil 3B). OB'ler konağın besinleri üzerine yayılır ve viral hayat döngüsü tekrar başlar. Virüs herhangi bir viral belirti göstermeden de konukçuda mevcut olabilir.



Şekil 3. Bakülovirüslerin hayat döngüsü. A: Bir böcek larvasının kesit şeması. Bulaşık bir besin ile alınan gömülü yapı (OB) yeni bir enfeksiyon döngüsünü başlatır (1). OB'lerin protein kılıfları orta bağırsakta çözünür (2) ve gömülü yapı uzaklaştırılmış virüs (ODV) salınır (3). Peritrofik membran virüs tarafından parçalanır ve ODV'ler hücre içine girer (4). B: Virüs çoğaltma döngüsü şeması. ODV'ler hücre içerisine girer (1) ve stoplazma içine nükleokapsid (NC) salınır (2). NC nükleusa girebilir (3), genomu serbest bırakabilir (4). Daha sonra erken genler kopyalanır (6) ve ifade edilir (7). Proteinlerin bazıları çekirdeğe geçer (8), genomun transkripsiyon/replikasyonunda, NC ve virionun birleşmesinde yer alır (9). Viral enfeksiyonun ilk evrelerinde NC sitoplazmaya taşınır (10), hücre membranına yaklaşır (11) ve tomurcuklanan virüs (BV) olarak (12) viral zarf proteininin bulunduğu yerlerde ortaya çıkar (14), salgı yolunu kullanarak birikir (13). Enfeksiyonun çok geç evrelerinde, NC'ler çekirdekte zarflanır ve polihedral şekilli protein matrisle (OB) kaplanır (15) (Haase vd., 2013).

1.2.2. Bakülovirüslerin Morfolojik ve Genetik Karakterizasyonları

Bakülovirüsler tarafından enfekte edilen böceklerde, patojenin özelliğine bağlı olarak bazı karakteristik hastalık belirtileri görülür. Bu belirtileri çoğu kez makroskopik olarak gözlemlemek mümkündür. Bu belirtiler; renk değişimleri, fiziksel değişiklikler ve davranış anormallikleri olarak görülebilmektedir.

Renk değişimleri, enfeksiyonlu böceklerin belirlenmesiyle ilgili olarak en kolay gözlemlenebilecek hastalık belirtilerindedir. Bakülovirüslerle enfekte olan çoğu Lepidoptera larvalarının renkleri beyaz, kahverengi ya da sarıya dönüşür.

Bakülovirüslerin etkisiyle enfekte olmuş böceklerde bazı fiziksel değişimler görülebilir. Enfeksiyon sonucu ölmüş böceklerin kadvraları çoğu kez mumyalaşır, yumuşar, sıvı hale geçer, katılaşır veya kurur. Virüs enfeksiyonları sonucu birçok anatomik bozukluk ortaya çıkabilir. Ayrıca, entomopatojenlerle enfekte olan böceklerde bazı davranış bozuklukları gözlemlenebilir. Bu bozukluklar arasında çok obur olan böceklerin beslenmeyi bırakması, agresiflik, alışılmadık yayılış ve çiftleşme davranışları sayılabilir (Eberle vd., 2012). Örneğin; bakülovirüsler tarafından enfekte edilen bazı böcekler konak bitkinin en yüksek noktasına tırmanır ve arka bacaklarından asılarak ölürler (Lacey ve Brooks, 1997).

Arazi çalışmalarında canlı, hastalıklı veya ölü böcekler toplanırken bu semptomlar göz önünde bulundurulmalı ve not edilmelidir. Çoğu durumda bu makroskobik incelemeler hastalığın doğru teşhisini yapmak için gerekli bilgiyi vermektedir (Lipa, 1975). Makroskobik incelemenin sonuçlandırılmasından sonra mikroskobik incelemeye başlanır. Virüslerin neden olduğu enfeksiyonlarda, bozulma ve hücre dağılması hipodermiste kolaylıkla görülebilir. Yağ dokularında kristale benzer inklüzyon yapıların varlığı bir viral hastalığın olduğunu gösterir. Çeşitli viral hastalık tipleri, farklı inklüzyon yapıların varlığı ile karakterize edilir. Gömülü yapıdaki virüslerin büyüklükleri 0.5 ile 15 µm arasındadır ve ışık mikroskobu altında görülebilirler. Gömülü virüsler ışık mikroskobu altında incelenirken, böcek dokularında bulunan ve organik olmayan kristallerin varlığı unutulmamalıdır. Bu kristaller şekil ve hacim olarak gömülü virüslere benzerler ve yanlış teşhislere yol açabilirler. Bu durumda en iyi metot hücre sitoplazmasını ve çekirdeğini incelemektir. Enfekte edilmiş hücre çekirdekleri önemli bir şekilde genişler. Viral hastalıkların en sık gözlendiği yağ dokusundaki hücre bölünmesinde artış meydana gelir (Lipa, 1975).

Viral bir hastalıktan şüphelenildiğinde uygulanılması gereken diğer bir yöntem de boyamadır. Giemsa boyama yöntemi, kolay uygulanabilirliği bakımından tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntem bakülovirüs enfeksiyonları için negatif bir yöntemdir. Yani ışık mikroskobu altında bakülovirüslerin polihedraları giemsa ile boyanmaz (Lacey ve Brooks, 1997).

Transmission elektron mikroskobu (TEM) ve Taramalı elektron mikroskobu (SEM) tanı için çok faydalı araçlardır. Virüslerin, özellikle GV'lerin ışık mikroskopunda ayırt edilmeleri zor olduğundan SEM ve TEM'de kolayca gözlemlenebilirler. TEM ile incelemede tabaka üzerindeki virion katmanlarını direkt olarak veya ultra ince bölümlerin kullanımı ile virion yapısının tanımlanması sonucu virüs taksonu için önemli bilgileri sağlar.

Işık ve elektron mikroskobu kullanarak virüslerin yapısının aydınlatılması yapılabilmeye rağmen, bunların kesin gruplarının belirlenebilmesi için moleküler tekniklere ihtiyaç vardır. Bu teknikler virüsün restriksiyon kesim (REN) haritasının çıkarılması, dizi analizinin yapılması, filogenetik analizler gibi tekniklerdir. Aynı familyadaki virüslerin morfolojik ve immünolojik özelliklerinin daha hassas ayırt edilmesinden dolayı genotipik özellikleri esas alan analitik yöntemler tür ve suş seviyelerinin bilinen en güçlü virüs tanımlanması olmuştur. Çift zincir DNA'ya sahip bakülovirüsler için, agaroz jel elektroforezi ile REN kesim kombinasyonu, bakülovirüs izolatlarının ayırt edilmesinde ve tanımlanmasında hızlı ve güvenilir olması için seçilen bir metottur (Goto vd., 1992). Bu teknik aynı zamanda genom büyüklüğünün tahmin edilmesine izin verir.

Virüs tanımlaması için REN analizindeki sınırlamaları aşmak için, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile korunmuş olan gen bölgelerinin çoğaltılması, devamında bu bölgelerin dizilenmesi ve filogenetik analizlerinin son derece etkili ve yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Bakülovirüsler için geliştirilen, diğer virüs familyalarının üyeleri için de ilke olarak kabul edilebilir (Lange vd., 2004; Jehle vd., 2006).

Geleneksel olarak virüs izolasyonu, enfeksiyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkan anormal fenotipe sahip böceklerden gerçekleştirilmektedir. Bakülovirüsler gibi bazı böcek virüsleriyle enfeksiyonda semptomlar açıkça görülür, hatta bu enfeksiyonlar çoğunlukla ölümle sonuçlanır.

1.2.3. Bakülovirüslerin Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Biyolojik deneyler doz-ölüm ve ölüm-zaman ilişkilerinin tahmin metotlarıdır (Finney, 1971). Bu deneyler virüs izolatlarının öldürme hızlarını ve virülanslarını belirlemek için gereklidir. Doz-ölüm deneyleri test böcek popülasyonunun %50'sini öldürmek için gerekli konsantrasyon olan medyan öldürücü konsantrasyonu (LC₅₀)

belirlemek için yapılır. Bu deney aynı zamanda belirli bir test böcek popülasyonunun %50'sini öldürmek için gerekli doz olan medyan öldürücü dozu (LD₅₀) tahmin etmek için de kullanılabilir. Larva tarafından yutulan kesin doz belirlenmesi mümkün olmadığı hallerde LC₅₀ hesaplanır. Ayrıca, formüle edilecek virüs miktarının belirlenmesinde LC₅₀ değerinin LD₅₀ değerinden daha önemli olduğu düşünülmektedir (Moore, 2002).

Bir biyotest kurgulanırken hedef böcek için belirli bir konsantrasyonda etmenin (virüs gibi) uygulanmasını ve hem ölüm hem de büyüme tepkisini gözlemlemeyi kapsamaktadır (Finney 1971). Böcek üzerindeki etkinliğin belirlenmesi için kullanılan metotlar, yüzey dozlama, damlacık beslenme, yapay besinle birleşme, parça diyet ve yumurta daldırma biyotestlerini içeren teknikleri kapsayan uygulamalardır (Hunter-Fujita vd. 1998; Jones 2000).

Yüzey dozlama testi için, bilinen bir virüs konsantrasyonu yaprak yüzeyine ya da yapay bir besin üzerine eşit bir şekilde yayılır. Virüs uygulanan besin belirli bir süre için larva beslenmeden önce havada kurumaya bırakılır. Viral besinle beslenen larvaların pupa olana kadar davranışları gözlemlenir. Bu test sonucunda sadece LC₅₀ değeri belirlenebilir. Bu metot böceklerin doğal beslenme alışkanlığını yansıtır (Moore, 2002).

Hazır besinle karıştırma, bilinen bir virüs konsantrasyonu yapay besin ile karıştırılır. Larvalar tepki verene ya da pupa olana kadar virüslü besin ile beslenir ve LC₅₀ belirlenir. Bu yöntem, yüzey yerine besine karıştırılmış olan virüs haricinde yüzey dozu metodu ile benzerdir (Hunter-Fujita vd., 1998; Jones, 2000).

Damlacık yedirme denemelerinde yeni doğan larvalar damlacıklar olarak uygulanan belirli bir konsantrasyondaki virüs süspansiyonu ile beslenir. Virüs süspansiyonu, bağırsak renklendirilmesinde virüslü besini yutan larvaları belirlemek için gıda boyası ile karıştırılır (Hunter-Fujita vd., 1998). Larvalar virüs olmayan besin ortamına aktarılır ve pupa olana kadar larvaların davranışları gözlemlenir. Öldürücü doz-LD bu yöntem kullanılarak hesaplanabilir. LD değeri, her larva tarafından alınan virüs miktarı hesaplanabilir olduğu için farklı deneylerle karşılaştırma için daha uygundur.

Bir yumurta daldırma testinde, yumurtalar belirli bir zaman periyodunda bilinen bir virüs konsantrasyonuna daldırılır ve havada kurumaya bırakılır. Yumurtadan çıkan larvalar taze besin malzemesi üzerine aktarılır ve pupa olana kadar davranışları gözlemlenir. Öldürücü konsantrasyon, bu yöntem kullanılarak hesaplanabilir (Jones, 2000).

Parça diyet denemelerinde virüs süspansiyonunun bilinen bir konsantrasyonu belirli bir periyot içerisinde test larva tarafından tüketilebilen besinin küçük bir bölümü üzerine

eşit olarak yayılır. Besin tüketiminden sonra larvalar taze besin üstüne aktarılır ve pupa olana kadar davranışları gözlemlenir. Bu metot ile hem öldürücü konsantrasyon hem de öldürücü zaman (LT) hesaplanabilir (Hunter-Fujita vd., 1998; Jones, 2000).

1.2.4. Biyolojik Mücadelede Bakülovirüsler

Bakülovirüsler, zararlılarla mücadelede kendi potansiyelleri açısından böcek virüslerinin oldukça faydalı bir familyasıdır (Funk vd., 1997). Bakülovirüs orjinli çeşitli ürün, farklı zararlıların mücadelesi için ticari olarak geliştirilmiştir (Szewczyk vd., 2011) (Tablo 3). Hem NPV'ler hem de GV'ler pestisit olarak kullanılmaktadır. Fakat, NPV formülasyonlarının sayısı GV'lerden daha fazladır (Szewczyk vd., 2011). Cryptogran® ve Cryptex® gibi bazı formülasyonlar, aynı bakülovirüs türlerinin farklı izolatlarını içermekte ve farklı ticari isimler altında satılmaktadır.

Güney Afrika'da kullanılan başlıca bakülovirüs biopestisit ürünleri Cryptogran® (River Bioscience, Güney Afrika), Cryptex® (Andermatt, İsviçre), Helicovir™ (River Bioscience), Bolldex®, Madex® (ikisi de Andermatt) ve Carpovirusine® (Arysta LifeScience, Fransa)'dır. Cryptogran® ve Cryptex® aktif bileşen olarak *Cryptophlebia leucotreta granülovirus* (CrleGV) Güney Afrika izolatu ile oluşturulmuştur. Ürünler Güney Afrika'da en önemli narenciye zararlısı olan *Thaumatotibia leucotreta*'nın mücadelesi için kullanılmaktadır. Moore vd. (2004a) Cryptogran® ile uygulama sonrası 7 haftalık bir periyot içerisinde *Thaumatotibia leucotreta* istilasında %70'lik bir azalma olduğunu kaydetmişlerdir. Helicovir™ ve Bolldex®, pamuk, turunçgiller, buğday, domates, mısır ve süpürge darısı gibi ekonomik açıdan önemli bitkilerde zararlı olan *Helicoverpa armigera*'nın mücadelesi için kullanılan Güney Afrika'da geliştirilmiş biopestisitlerdir. Helicovir™ *Helicoverpa armigera* NPV Güney Afrika izolatu ile formüle edilmiştir. Doğu Cape'deki HearNPV ile alan denemeleri ürün zararında %84 azalma ve ihracat fazlalığında %96'lık bir azalma göstermiştir (Moore vd., 2004b). Helicovir™ formülasyon ürünü ile iki alan çalışması uygulama yapılmamış ağaçlarla karşılaştırıldığında verimin %67 ve %99 arttığı ortaya çıkmıştır (Moore ve Kirkman, 2010). Madex® ve Carpovirusine® elma, armut, ceviz, kayısı ve şeftalinin önemli bir zararlısı olan *Cydia pomonella*'nın mücadelesi için kullanılmaktadır.

Tablo 3. Bazı ticari bakülovirüs biyopestisitlerinin örnekleri (Moscardi vd., 2011).

Konak Böcek	Bakülovirüs	Ürün Adı	Kaynaklar
<i>Adoxophyes orana</i>	GV	Capex® 2	Cunningham (1995); Erlandson (2008)
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	NPV	Coopervirus®	Moscardi (1999, 2007)
<i>Cydia pomonella</i>	GV	Madex®, Virosoft®	Vincent vd. (2007)
<i>Cryptophlebia leucotreta</i>	GV	Cryptex®, Cryptogran®	Kessler ve Zingg (2008); Moore vd. (2004a)
<i>Helicoverpa zea</i>	NPV	Elcar™, GemStar®	Moscardi (1999); Erlandson (2008)
<i>Helocoverpa armigera</i>	NPV	Helicovir™	Moore ve Kirkman 2010
<i>Lymantria dispar</i>	NPV	Gypcheck®	Erlandson (2008)
<i>Neodiprion abietis</i>	NPV	Abietiv®	Lucarotti vd. (2007)
<i>Phthorimaea operculella</i>	GV	Matapol®	Moscardi (1999)
<i>Spodoptera exigua</i>	NPV	Spod-X®, Ness-A®	Erlandson (2008)

1.2.5. Bakülovirüs Biyopestisitlerinin Avantajları ve Dezavantajları

Bakülovirüslerin konak özgüllüğü, hedef olmayan organizmalara tehdit oluşturmadığından IPM programları için onların kullanımını güvenli hale getirir. Bakülovirüsler en güvenli biyolojik mücadele etmenleri arasında olarak Avrupa Birliği tarafından kabul edilmiştir (Black vd., 1997). Güvenli olduklarını belirlemek için hedef olmayan organizmalara karşı birçok bakülovirüs test edilmiştir ve herhangi bir yan etki rapor edilmemiştir (McWilliam, 2007). Bakülovirüsler spesifik böceklerle mücadele edilebilir olduğundan ve faydalı böceklerin sağlam kalmasına izin verdiklerinden zararlı yönetimi için işe yarar araçlardır.

İkinci olarak, bakülovirüsler çevrede kullanılmak için güvenlidir. Çünkü, onlar çevreye toksik kalıntılar bırakmaz (Szewczyk vd., 2011). Bu, insanlar ve diğer faydalı organizmalar için zararlı olabilen ürünlerde ve alanda aktif kimyasal kalıntı bırakan kimyasal pestisitlerle karşılaştırıldığında önemli bir avantajdır.

Bakülovirüslerin diğeri bir avantajı, virüs partiküllerini etkilememesi nedeniyle diğeri pestisitler ile birlikte kolayca uygulanabilir olmasıdır. Araştırmalar, çoğu diğeri pestisitlerle karıştırıldığında konak üzerinde bakülovirüslerin viral aktivitesinin daha az olduğunu göstermiştir (Moscardi ve Sosa-Gomez, 1992). Bu yaklaşım direnç yönetimi ve IPM programları için önemlidir. Bakülovirüslerin kimyasal pestisitler ile karıştırılması bu kimyasalların çevrede zararlı etkilerini azaltacaktır. Çünkü, kullanılan kimyasalların konsantrasyonları azalacaktır. Diğeri yandan, bakülovirüs biyopestisitlerinin dezavantajları geniş spektrumlu bir mücadele etmeni isteyen çiftçiler için onların kabul edilebilirliğini sınırlayan dar konak aralığı içermeleridir (Szewczyk vd., 2011). Bu faktör de bazı viral pestisitlerin satışını ve üretime yatırımını özel şirketler için zorlaştırmaktadır (Cunningham, 1995). Ayrıca, gerekli olan büyük bir böcek kolonisinin sağlanması için iş gücünün yüksek maliyetinden ve böylece nihai ürünün pahalı hale gelmesinden dolayı biyopestisitlerin üretim maliyeti gelişmiş ülkelerde pahalıdır. Bu faktör, biyopestisitlerin kimyasallarla maliyet bakımından rekabetine izin vermez (Black vd., 1997). Bakülovirüslerin diğeri sınırlılığı sadece larval evrelerde enfekte edici ve birinci evreye karşı hedefleyici olmasıdır çünkü büyük larvalar etkili olması için yüksek konsantrasyonlara gerek duymaktadırlar (Washburn vd., 2003). Ortamda virüs partiküllerinin sürekliliğinin kısa olması bir dezavantaj olarak da dikkate alınmaktadır çünkü çiftçiler alanda uzun süre için sürekli olabilen bir mücadele etmeni isteyebilir. Virüs partikülleri solar radyasyon tarafından çoğunlukla alanlarda hızlı bir şekilde bozulmaktadır (Moscardi, 1999). Virüs partiküllerinin yarı ömrü ortamda 2-5 gün arasındadır (Jaques, 1985). Shapiro (1986) tarafından yapılan bir çalışma bakülovirüslerin 280-310 nm dalga boylarında ultraviyole radyasyon tarafından inaktif olduğunu göstermiştir. Güneş ışığı tarafından peroksit, hidroksil ve tek oksijen gibi yüksek ölçüde aktif radikallerin oluşturulması, çevrede virüs partiküllerinin bozulmasında katkı sağladığı görülmüştür (Ignoffo ve Gracia, 1994). Son olarak, yavaş öldürme hızı bakülovirüslerin büyük eksikliklerinden biri olarak kabul edilir (Ignoffo ve Gracia, 1992). Enfekte larva enfeksiyon süreci boyunca bitki üzerinde beslenmeye devam etmekte ve bu nedenle bitkinin gördüğü zarar sürmektedir.

1.3. Amerikan Beyaz Kelebeği (*Hyphantria cunea*, Lepidoptera: Arctiidae)

Amerikan beyaz kelebeği (*H. cunea* Drury) birçok tarımsal ürün bitkisinin yanı sıra ss ağaçları ve alılarda da önemli bir zararlıdır. Larvalar, gruplar halinde beslenmekte ve ağaç ve çalıların tamamen yapraksız kalmalarına neden olmaktadır. Kuzey Amerika yerlisi olan bu tür, Avrupa ve Asya'ya yayılan zararlı türlerden biri olduğu için bilim dünyası tarafından incelenmeye alınmıştır.

Bu tür Türkiye'de yılda 2 dl vermesine rağmen, ABD'nin bazı güney eyaletlerinde 4 dl verebilmektedir. Dl sayısı bölgenin sıcaklığına ve gün uzunluğuna göre değişir. Anavatanı ABD'de, siyah ve kırmızı başlı olmak üzere 2 tırtıl tipi vardır. Türkiye de sadece siyah başlı larvalara rastlanmaktadır. Popülasyon düşük olduğunda ilk dl fark edilmeyebilir. Ancak, 2. dölden itibaren popülasyon artar ve dikkat çekici hale gelir. Amerikan beyaz kelebeği %70-80 civarındaki nem ve 22-25 C arasındaki sıcaklıklarda daha iyi gelişmektedir. Ülkemizde hemen her 4-6 yılda bir salgın yapmaktadır.

1.3.1. Yayılışı

Amerikan beyaz kelebeği aslen Kuzey Amerika'da Güney Kanada sınırı boyunca bulunmaktadır (Morris, 1963). Amerika yerlisi olan bu böcek kazayla Avrupa ve Asya'nın birçok bölgesinde yayılmış ve ciddi bir zararlı haline gelmiştir (Warren ve Tadic, 1970; Deseo vd., 1986; Johnson ve Lyon, 1988; Gomi ve Takeda, 1996; Park vd., 2000; Li vd., 2001; Kiyota vd., 2011). *H. cunea* 1940'larda Yugoslavya'da ortaya çıkmış ve o zamandan beri Avrupa'nın çoğu yerini istila etmiştir. Daha sonra in ve Kuzey Kore'de yaşamaya başlamış ve Japonya'da da bulunmuştur (şekil 4). Bu türün Amerika'dan ticari mallarla Macaristan'a taşınarak 1940 yılında Budapeşte civarında görüldüğü ve daha sonra Avrupa'ya yayıldığı bildirilmiştir (Bovey, 1954). Kuzey yarım kürede 50-55° enlemlere kadar yayılabilmektedir.



Şekil 4. *H. cunea*'nın Dünya'daki dağılımı

Türkiye'de ilk kez 1975'de Edirne, İstanbul (Çatalca, Silivri) ve Tekirdağ'da görülmüş olan *H. cunea* daha sonra Marmara ve Karadeniz bölgeleri ile Kuzey Ege'de yayılım göstermiştir (Şekil 5). Zararlı Türkiye'deki yayılış alanlarında 2 döl vermektedir. Ülkemizde 1982 yılında Orta Karadeniz Bölgesi'nde fındık alanlarında yoğun olarak görülmekle birlikte nerdeyse bütün meyve ağaçlarının önemli bir zararlısı haline gelmiştir (Özay, 1997; Selek, 1998; Baş, 1982; Tuncer ve Kansu, 1994). *H. cunea*'nın İstanbul, Kocaeli ve Sakarya'da söğüt türlerinde, Sakarya ve Kocaeli'nde ise kavak türleri üzerinde zarar yaptığı tespit edilmiştir (Özay, 1997; Selek, 1998).



Şekil 5. *H. cunea*'nın Türkiye'deki yayılışı

1.3.2. Tanımı ve Biyolojisi

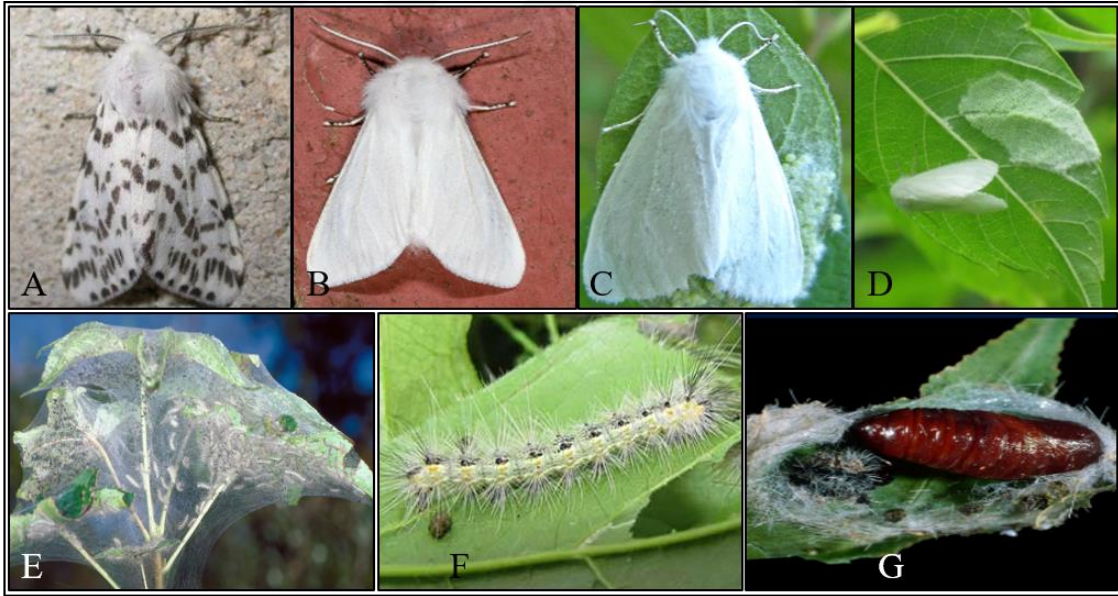
Ergin, kelebek formundadır ve kanat açıklığı 25-30 mm kadardır. Ergin vücut uzunluğu ortalama olarak erkeklerde 11, dişilerde 15 mm'dir. Erkeklerin üst kanatları tamamen beyaz veya siyah lekelerle bezenmiş durumundadır. Üst kanatları siyah lekeli olan erkekler genellikle ilk baharda (Şekil 6A), lekesiz beyaz kanatlılar ise yazın görülür (Şekil 6B). Antenler kirli beyaz, ince ve kısa tüylerle kaplıdır. Birinci dölün erginleri Mayıs-Haziran, ikinci dölün erginleri Temmuz-Ağustos arasında pupadan çıkmaktadır. Pupadan ilk çıkanlar erkekler olup, bunu 2-3 gün ara ile dişiler izlemektedir. Dişi kelekler tamamen beyazdır (Şekil 6C). Kanatlar üzerinde nadiren siyah lekeler bulunabilir. Dişi karnı yumurtlamadan önce açık yeşil renktedir ve üzeri beyaz kıllarla kaplıdır. Bu kılları daha sonra yumurtaların üzerini örtmede kullanırlar.

Çiftleştikten sonra yumurtalarını yaprakların alt ya da üst yüzlerine tek tabakalı küme görünümünde olmak üzere yan yana diziler halinde bırakırlar (Şekil 6D). Yumurta kümeleri yeşil renktedir ve beslendiği bitkiye bağlı olarak 400-2500 yumurta içermektedir. Yumurtaların üzeri dişi tarafından karın sonundaki kıllarla kısmen gizlenmeye çalışılır. Erkek erginler çiftleştikten, dişiler ise yumurta koyduktan sonra ölürlür. *H. cunea*'nın yumurta süresi birinci dölde 10-14, ikinci dölde 7-9 günde tamamlanmaktadır.

Yumurtadan çıkan larvalar, ipeğimsi iplik şeklinde bir salgı salgılayarak yumurta kümesinin bulunduğu yaprakta ağ görünümünde bir yuva yapmakta ve söz konusu yuvanın içinde toplu olarak yaşamaktadır (Şekil 6E). Larvalar genellikle kahverengimsi gri renktedir. Son döneme ulaştığında boyu 2.5-3.5 cm'ye ulaşır. Larvaların vücudunda farklı boyutta, siyah ve her halkasında dörder adet olmak üzere portakal renkli benek ve bu beneklerden çıkan kıllar bulunmaktadır. Tırtılın sırt kısmında koyu renkli, yan kısımlarda ise sarı renkli boyuna şeritler bulunmaktadır (Şekil 6F). Larvalar ilk yaprağı yedikten sonra komşu yapraklara geçer. Bu arada yuvalarını, dallardaki yaprakların bazılarını içine alacak biçimde olmak üzere büyütürler. Larvaların toplu yaşamı 3. larva evresinin ortasına kadar devam eder. Bundan sonra larvaların bir kısmı yuvayı terk etmekte, bir bölümü de 1-2 gün daha yuvada kalmaktadır. Dördüncü larva dönemi başında yuvada hiçbir larva kalmamakta ve larvaların tümü ağacın diğer kısımlarındaki yapraklarla tek tek beslenmektedir. Larva yumurtadan yeni çıktığında 1-2 mm kadardır ve rengi daha açıktır. Olgun larva oldukça kıllıdır. Larva rengi beslendiği bitkiye ve mevsime göre değişebilir. İlkbaharda renk daha açık iken sonbahara doğru renk koyulaşır.

Ağ görünümündeki, yuvaların içinde yaklaşık 180-500 adet larva bulunmaktadır. Larva evresinin ilerlemesiyle larvaların besin ihtiyacı artar, bunun sonucu olarak konukçu bitkilerin yapraklarındaki zarar da artar. Larvalar gelişimlerini 35-50 günde tamamlar.

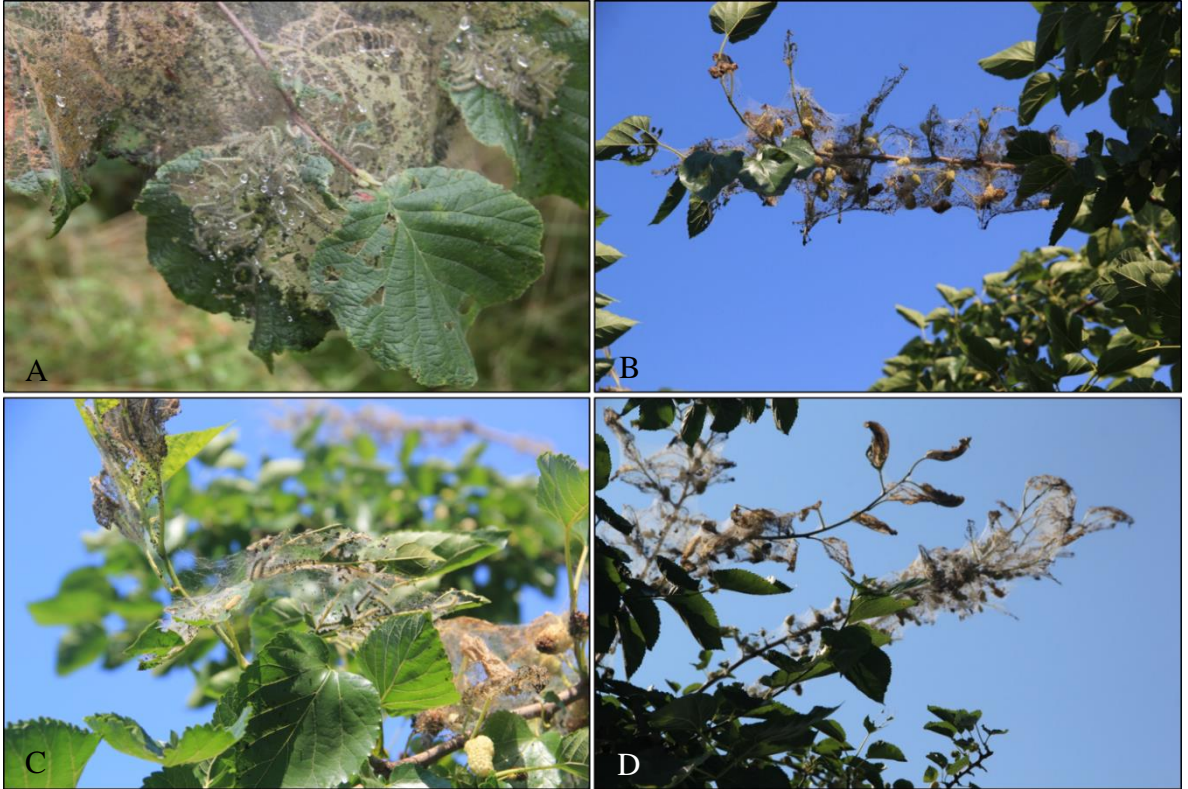
Pupa mumya pupa tipinde koyu kahverengidir (Şekil 6G). Boyu 10-15 mm'dir. Dişi pupalar erkeklerden daha büyük ve daha ağırdır. Kışı pupa halinde geçirir. Zarar görmüş ağaçların toprak ile birleştiği yerlerde, ağaç kabuklarında, ağaçların kovuklarında, binaların çatı saçaklarında, konukçularının altında bulunan çalı tabakasının toprağa yakın kısımlarında, toprağın ve ölü örtünün 5 - 6 cm aşağısında ve kayaların altında tek tek veya toplu olarak pupa olurlar. Birinci dölün pupaları 10-13 günde olgunlaşır. Fakat, ikinci dölün pupaları kışı pupa halinde geçirir. Kışlayan pupalardan çıkan kelebeklerin uçuşu, Mayıs'ın ilk haftası ile üçüncü haftasında, ikinci dölle ait kelebek çıkışları ise Temmuz'un üçüncü haftasında gerçekleşir. Her iki dölün kelebek uçuş süresi 24-33 gün sürmesine karşılık, ergin ömrü 4-15 gündür.



Şekil 6. *H. cunea*'nın biyolojisi. A: Birinci dölden çıkan erkek; B: İkinci dölden çıkan erkek; C: Dişi; D: Yumurta; E: Ağ içerisinde beslenen *H. cunea* larvaları; F: Larva; G: Pupa (URL-1, 2018; URL-2, 2018; URL-3, 2018).

1.3.3. Zarar Şekli

Yılda birden fazla döl oluşturması, dişilerinin çok sayıda yumurta üretmesi, cinsiyet oranının 1/1 civarında bulunması ve larvaların oldukça polifag olması bakımından, bu türün önemli bir tarım ve orman zararlısı olduğu anlaşılmaktadır. Birinci dölde larva sayısı daha az olduğu için asıl zararı 2. döldeki larvalar oluşturmaktadır. Genç larvalar yaprakların sadece parankima dokusunu yiyerek yaprağın yeşil rengini kaybetmesine ve kahverengi renk almasına neden olurlar. Larvalar 2. ve 3. gelişme dönemlerinde epidermis ve mezofil tabakalarıyla yaprakların ikincil damarlarını da tüketirler. Daha sonra büyüyen larvalar damar aralarını da yemeye başlar. Bu dönemde zarar gören yapraklar tül gibi delik deşik olur (Şekil 7). Son larva döneminden itibaren tırtıllar ana damar ve sap hariç bütün yaprağı yiyebilir hale gelir. Böyle yapraklarda sadece yaprak sapı, orta ve yan damarlardan kalın olanları kalır. Özellikle Eylül ayından itibaren zarar gören ağaçlar tamamen yapraksız kalabilir. Salgın yıllarında ise özellikle dut ve akçağaçlar haziran ayında bile yapraklarını tamamen kaybedebilirler.



Şekil 7. *H. cunea*'nın zarar şekli. A: Fındıktaki zararı; B, C ve D: Dut ağacındaki zararı

1.3.4. Konukçuları

Amerikan beyaz kelebeği oldukça polifag olan zararlı bir böcektir. Meyve ağaçları, orman ve süs bitkileri ile bazı otsu bitkiler dahil olmak üzere 600'den fazla bitki üzerinde beslenmektedir. En tercih edilen konukçu bitkiler dut ve akçaağaçtır. Ayrıca fındık, elma, armut, ayva, erik, kiraz, ceviz, kızılığaç, kavak gibi diğer bitkilerde de çok sık rastlanır. Bu türün larva dönemi konukçu bitkilerin geniş bir yelpazesinde mükemmel bir gelişme yeteneğine sahiptir. Türkiye ve Gürcistan'da daha çok fındık bahçelerinin önemli bir zararlısı konumundadır. Türkiye'de Karadeniz Bölgesi'nde genellikle bahçe içlerindeki dut ağaçları ile yol kenarlarındaki akçaağaçlar önemli bulaşma kaynağı durumundadır. İlk larval koloniler genellikle bu bitkilerde görülür. Karadeniz bölgesinde olduğu gibi bitkisel çeşitlilik, çok fazla bitki çeşidi ile beslenen bu böcek için bir avantaj sağlar. Üreme gücünün yüksekliği ve polifag oluşu, böceğin popülasyonunu artırmaktadır.

1.3.5. Mücadelesi

Amerikan beyaz kelebeğinin mücadelesinde mekanik, kimyasal ve biyolojik mücadele dikkat çekmektedir. Mekanik mücadelede çok yüksek olmayan ağaçlardan ve fındık ocaklarından larvaların bulunduğu keseler toplanarak imha edilmelidir. Amerikan beyaz kelebeği popülasyonları belirli dallarla sınırlı olduklarından pek çok durumda kolonilerin bulunduğu dalların budanması ya da tahrip edilmesi uygun bir seçenek haline gelmektedir (Johnson ve Lyon, 1988). Zamanında yapıldığında bu yöntem oldukça etkilidir. Yüksek ağaçlar için teleskobik budama makasları kullanılabilir. Bu iş haziran ve ağustos başı ve ortalarında tekrar edilerek yapılmalıdır. Amerikan beyaz kelebeği larva ağları metrelerce uzaktan rahatlıkla görülmektedir. Bu durum mekanik mücadeleyi kolaylaştırmaktadır. Dördüncü evreden sonra larvalar dağılmaya başlar. Bu nedenle bu zamandan sonra mekanik mücadele güçleşir ve zaman alır.

Kimyasal mücadelede bu türün larvaları mümkün olduğunca erken tespit edilerek ağaçlar ilaçlanmalıdır. Kimyasalın püskürtme zamanı oldukça önemlidir. Genç larva dönemi daha hassas olduğu için mücadele etkinliğinde erken dönemde uygulama yapılmalıdır. Tercih edilmemekle beraber zararlı popülasyonunun yoğun olduğu ya da epidemiy yaptığı yıllarda kimyasal ilaçlarla mücadele önemli olmaktadır.

Bu türün, aralarında kuşların da bulunduğu oldukça fazla sayıda parazitoit ve predatör gibi doğal düşmanları bulunmaktadır. Avcı arılar, örümcekler ve kuşlara ilave olarak değişik asalak ve avcı böcekler bu tür üzerinde beslenmektedir. Parazitoitleri Hymenoptera ve Diptera takımına ait familyalarda bulunur. Predatörleri ise *Arma custos* (Fabr.) (Hem: Pentatomidae), *Chrysoperla carnea* (Steph.) (Neur: Chrysopidae), *Rhinocerus iracundus*, *Dermestes lardarius*, örümcek, karınca ve kuşlardan oluşmaktadır. Predatörler arasında Ichneumonidae, Braconidae, Pteromalidae, Torymidae, Trichogrammatidae, Tachinidae ve Sarcophagidae familyalarına mensup birçok tür bu böceğin doğal düşmanları olarak kaydedilmiştir. Bunlardan bazıları *Pimpla hypochondriaca* (Retz.), *P. turionella* L., *Theronie atalantae* (Poda), *Psychophagus omnivorous*, *Chouioia cunea*, *Conomorium amplum*, *Pales pavidia* ve *Exorista lavorum* gibi türleri içermektedir.

Entomopatojen bakteri olan *Bacillus thuringiensis* özellikle larvalar genç iken oldukça etkilidir. Bütün bitkiyi ilaçlama yerine sadece kolonilerin bulunduğu dallar ilaçlanmalıdır. Ülkemizde yapılan denemeler biyopestisitlerin oldukça etkili olduğunu ortaya koymuştur. Dipel, Delphin WG, Foray, Rebound gibi *B. thuringiensis* preparatları ile havadan uygulamalar yapılmaktadır. Amerikan beyaz kelebeği popülasyonları ayrıca bakülovirüsler (Nükleopolihedrovirüs-NPV ve Granulovirüs-GV) tarafından da kontrol altına alınmaktadır (Boucias ve Nordin, 1977; Kaya, 1977).

1.3.5.2. Hyphantria cunea Granulovirüs

Hyphantria cunea granulovirüs (HycuGV) ilk kez 1958'de izole edilmiştir (Schmidt ve Philips, 1958). Bu granulovirüsün etiyolojisi, belirti ve bulguları ve epidemiyolojisi çalışılmasına rağmen, ayrıntılı tanımlama çalışmaları henüz yapılmamıştır (Kovacevic, 1958; Weiser, 1958; Hukuhara ve Hashimoto, 1966; Hukuhara vd., 1969). HycuGV, Yugoslavya'da (Vasiljévic, 1968) ve Çekoslovakya'da (Weiser, 1962) *H. cunea*'nın alan popülasyonları üzerinde baskın bir faktör olmuştur. Zararlı, Amerika'da ise düşük bir etkinliğe sahiptir (Oliver, 1964).

Bu virüsün morfolojik tanımlanmaları ile ilgili çalışmalar 1970'li yıllarda yapılmıştır. Moleküler tanımlanma ile ilgili çalışmalara bakıldığında, Jehle vd. (2006)'nin HycuGV'nin Rusya izoaltına ait *lef-8*, *lef-9* ve *granülin* gen bölgelerine ait diziler (NCBI) ve Choi vd. (2012)'nin HycuGV komple genom dizileme çalışması bulunmaktadır. Fakat,

bu genom dizisi verileri GenBank'ta bulunmamaktadır. Sadece poster özeti olarak yayınlanan bu çalışma verilerine ulaşım sağlanamamıştır.

Amerikan beyaz kelebeğinin biyolojik mücadelesine yönelik çalışmalar Riley (1887), Baird (1916), Tothill (1922) ve Tadic (1958 ve 1960) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalardaki mücadele etmenleri predatörleri, parazitleri, hastalıkları ve çevre koşullarını kapsamaktadır. HycuGV'nin zararlı üzerindeki etkinliğinin araştırılmasına yönelik birçok çalışma yapılmıştır (Oliver 1964; Hukuhara vd., 1969; Hukuhara, 1975; Boucias ve Nordin 1977; Boucias ve Nordin 1978; Hukuhara vd., 1978). Bu virüsle enfekte olan bir larva az ya da çok şişmekte ve enfeksiyonun ileri evresinde larvanın alt kısmı sarımsı bir renge dönüşmektedir. Ağır hastalıklı larvalarda vücut sıvısı süt rengine dönüşmekte ve bol miktarda kapsül içermektedir

1.4. Tezin Amacı

Böcek virüsleri çevresel, zirai, moleküler ve tıbbi biyoteknolojideki önemleri bakımından bütün dünyada yoğun olarak çalışılan araştırma materyalleri haline gelmiştir. Bu virüslerin yeni izolatlarının veya yeni türlerinin keşfedilmesi daha verimli ve daha güvenilir materyallerin elde edilmesini sağlamaktadır. Yeni tanımlama tekniklerinin kullanılacak olması ve buna bağlı olarak biyolojik çeşitliliğe katkılar sağlanması da bu çalışmaların önemini arttırmaktadır. Ayrıca, yeni izolatlar ile birlikte yeni moleküler mekanizmaların keşfedilmesi ve bu mekanizmaların çalışma sistemlerinin ortaya konulması da böcek virüslerinin bu alanlardaki kullanılabilirliğini arttırmaktadır.

Ülkemizin kuzey kısmında yaygın olarak bulunması ve meydana getirdiği zararlar göz önüne alındığında, Amerikan beyaz kelebeği (*Hyphantria cunea* Drury, Lepidoptera: Arctiidae)'nde yeni virüslerin tespit edilmesi, bunların karakterizasyonlarının yapılması ve bu virüslerin zararlının biyolojik mücadelesinde kullanılmasını önemli kılmaktadır.

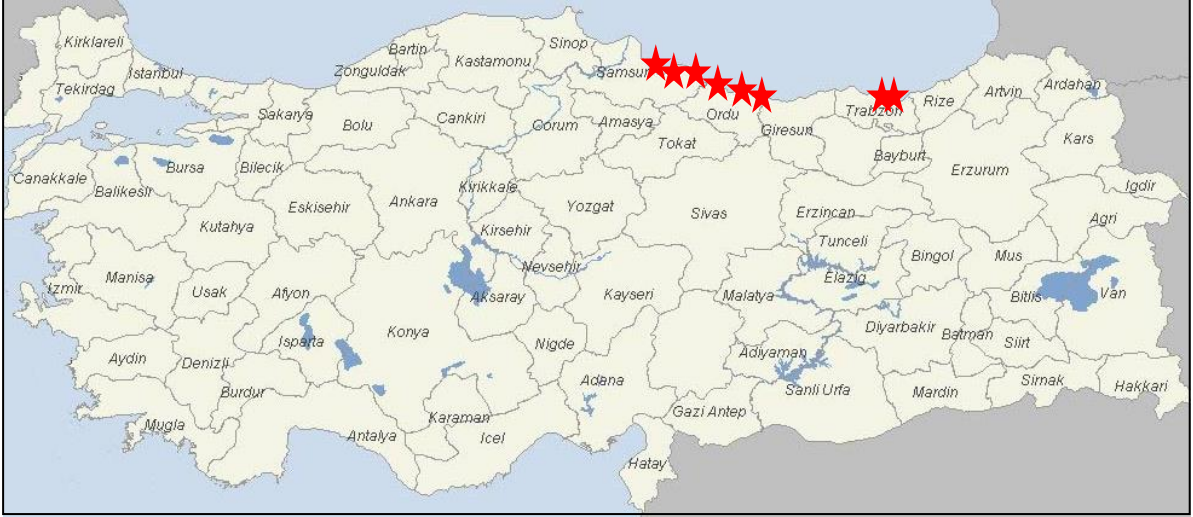
Bu çalışmada, Orta Karadeniz Bölgesi'nden toplanan Amerikan beyaz kelebeği (*Hyphantria cunea*) larval popülasyonlarında güncel teknikler kullanılarak tespit edilen *Hyphantria cunea* granulo virüs (HycuGV) suşlarının biyolojik özelliklerinin belirlenmesi ve bunların biyolojik mücadelede kullanılma potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Böceklerin Toplanması ve Laboratuvarında Yetiştirilmesi

Bu çalışma için gerekli olan *Hyphantria cunea* larvaları, 2014-2017 yılları arasında haziran ve temmuz ayında Trabzon, Samsun/Çarşamba ve Ordu illerinden farklı konukçu bitkiler üzerinden toplandı (Şekil 8) (Tablo 4). Bu zararlı yumurtadan çıktıktan sonra pupaya girene kadar larval dönemlerde zarar verdiği için bu çalışmada larvalar kullanıldı. Larvalar özellikle dut ağaçları başta olmak üzere akçaağaç, fındık, erik, ceviz, elma ve ayva ağaçlarından keseleri ile birlikte bitki kısmı da beraberinde alınarak havalandırması olan kutulara yerleştirilerek laboratuvara getirildi. Arazi çalışmaları sırasında ölü ya da hastalıklı olan larvalar ayrı ayrı tüplerde toplandıkları yer ve tarih not edilerek muhafaza edildi. Laboratuvara getirilen larvalar her gün taze besin ile (dut ve akçaağaç) beslenilerek takip edildi. Ölen larvalar daha sonra virüs taraması yapılmak üzere tüplere konularak – 20 °C’de muhafaza edildi.

Laboratuvara getirilen birinci kuşak *H. cunea* larvaları taze besinle beslendi ve her gün temizlenerek uygun koşullarda (26 ± 1 °C, 12:12 gece ve gündüz, $\%50 \pm 10$ nem) pupaya girmeleri sağlandı. Pupalar yaklaşık 10 – 14 günde olgunlaşmaya başladı ve ergin kelebekler görüldü. Ergin kelebeklerin çiftleşip yumurta bırakması sağlandı. Kelebekler yumurtalarını yaprakların alt ya da üst yüzeylerine bıraktıkları için kabın içerisine uygun kağıtlar yerleştirildi. Kelebeklerin beslenmesi için ortama su ile nemlendirilmiş pamuk konuldu. Yumurta bırakılan kağıtlar iki günde bir değiştirildi. İkinci kuşak larvalar yaklaşık 7 – 9 gün içerisinde yumurtalardan çıkmaya başladı. Laboratuvarında yetiştirilen ikinci kuşak larvalar izole edilen virüslerin çoğaltılması ve biyolojik aktivite deneyleri için kullanıldı.



Şekil 8. Arazi çalışmaları yapılan lokasyonlar (★: örnek toplanan noktalar)

Tablo 4. Arazi çalışmalarında *H. cunea* ile ilgili kaydedilen bilgiler

İstasyon sayısı	Alındığı yer	Doğada ölü	Laboratuvarda ölü	Alındığı tarih	Alındığı Konukçu Bitki
6	Samsun / Çarşamba	9 larva	-	Temmuz 2014	Dut, Fındık, Akçaağaç
22	Ordu, Samsun / Çarşamba	5 larva	59 larva	Temmuz 2015	Dut, Fındık, Ceviz, Elma, Erik, Akçaağaç, Ayva
8	Ordu, Samsun / Çarşamba	-	-	Temmuz 2016	Dut, Akçaağaç, Fındık
2	Trabzon	-	-	Haziran 2017	Dut, Akçaağaç, Ihlamur

2.2. Virüs Taraması

Virüs taraması Ordu ve Samsun il/ilçelerinde toplanan *H. cunea* larvalarında yapıldı (Tablo 4). Ölü larvalardan bakülovirüs taraması yapıldı.

2.2.1. Örneklerin Hazırlanması

Arazide toplanan larvalar toplandıkları istasyonlara göre numaralandırılarak ayrı tüplerde muhafaza edildi. Arazi sırasında ayrı olarak saklanan ölü larvalar ve laboratuvarında ölen larvalarla toplamda 73 adet örnekte virüs tarama yapıldı (Tablo 4). Örnekler steril dH₂O ile birlikte ezilerek böcek dokularının dağılması sağlandı. Homojen bir şekilde ezilen örnekler virüs taraması için kullanıldı.

2.2.2. Ölü Larvalarda Virüs Taraması

2.2.2.1. Örneklerin Makroskopik İncelenmesi

Mikroorganizmalar tarafından enfekte edilen böceklerde, patojenin özelliğine bağlı olarak bazı karakteristik hastalık belirtileri görülür. Renk değişimleri, enfeksiyonlu böceklerin belirlenmesiyle ilgili olarak en kolay gözlemlenebilecek hastalık belirtileridir. Bu belirtileri çoğu kez makroskopik olarak gözlemek mümkündür. Bu çalışmada ölü larvalarda renk değişimi gözlemlendi. Fiziksel olarak larvaların sıvılaşarak akışkan bir hal alıp almadığı kontrol edildi. Larvaların boyları ve davranışları incelendi.

2.2.2.2. Örneklerin Mikroskopik İncelenmesi

Gömülü yapıdaki virüsler faz-kontrast ya da karanlık alan mikroskopunda görülebilmektedir. Makroskopik incelemelerden sonra örneklerde mikroskopik gözlem yapılarak gömülü yapı olup olmadığı kontrol edildi. Larvalar disekte edildikten sonra steril dH₂O damlatılan lam üzerine bir miktar larval doku aktarıldı. Lamel kapatıldıktan sonra bir süre bekletildi. Faz kontrast ve karanlık alan mikroskoplar altında incelemeler yapıldı. Örneklerde parlak kristal yapılar arandı ve kayıtları tutuldu.

2.2.2.3. Örneklerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile İncelenmesi

Örneklerde bakülovirüs taraması yapılması için Tablo 5'de bulunan primerler kullanıldı. Bakülovirüs taramasında DNA izolasyonu için DNeasy Tissue Kit (QIAGEN)

kullanıldı. Örnekler ezilerek homojenize edildikten sonra $6000 \times g$ 'de (8000 rpm) 5 dk. santrifüj edildi ve üst faz uzaklaştırıldı. Pellet üzerine yaklaşık 400 μ l dH₂O eklendi, vorteksle karıştırıldı. Bu karışımdan 50 μ l eppendorf tüpe aktarıldı. Bunun üzerine 5 μ l 0.1 M NaOH (pH 12.5) eklendi ve oda sıcaklığında 30 dk. bekletildi. Daha sonra üzerine 5 μ l 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) eklenerek nötralize edildi. Gömülü yapıdaki virüsler için bu ön uygulamadan sonra kit talimatlarına göre işleme devam edildi. Prosedüre göre 60 μ l'lik viral örnek üzerine 180 μ l Buffer ATL ve 20 μ l Proteinaz-K (20 mg/ml) eklendi, karışım gece boyu 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 15 sn vorteks edildi ve üzerine 200 μ l Buffer AL eklenerek karıştırıldı. Karışım 70 °C'de 10 dk. bekletildi. Üzerine 200 μ l etanol (%96 – 100) aktarıldı ve alt üst edildi. Karışım spin kolona aktarıldı ve $6000 \times g$ 'de 1 dk. santrifüj edildi. Toplama tüpü uzaklaştırıldı. Kolona 500 μ l Buffer AW1 eklendi ve $6000 \times g$ 'de 1 dk. santrifüj edildi. Toplama tüpü uzaklaştırıldı. Kolona 500 μ l Buffer AW2 eklendi ve $20000 \times g$ 'de 3 dk. santrifüj edildi. Kolon temiz bir eppendorf tüpe aktarıldı. Kolon üzerine 200 μ l Buffer AE bırakıldı ve oda sıcaklığında 1 dk. bekletildi. Daha sonra $6000 \times g$ 'de 1 dk. santrifüj edilerek izolasyon tamamlandı. İzole edilen DNA'lar + 4 °C'de bir gece bekletilerek nanodrop-spektrofotometre (Thermo Scientific, NanoDrop 2000) miktarı ölçüldü.

İzole edilen DNA'lardan bakülovirüs için polihedrin/granülün (*polh/gran*) ve geç ekspresyon faktör 8 (*lef-8*) gen bölgesini çoğaltacak dejenerat primerler kullanılarak PCR yapıldı (Tablo 5). PCR reaksiyonları hazırlanırken *polh/gran* için sonuçlara göre BGHrev primeri de kullanıldı. Bakülovirüslerin taramasında, PCR reaksiyonu karışımı 1 μ l DNA süspansiyonu (40-50 ng), 10 μ l (5X) PCR tamponu, 3 μ l MgCl₂ (25mM), 1.5 μ l dNTP karışımı (her birinden 10 mM), her bir primerden 1.5 μ l (500 nM), 0.25 μ l GoTaq G2 FlexiDNA polimeraz (5U/ μ l) ve ddH₂O ile son hacim 50 μ l'ye tamamlanarak hazırlandı. PCR koşulları 95 °C'de 2 dk. denatürasyondan sonra 95 °C'de 30 sn., 53 °C (*polh/gran*) ve 48 °C (*lef-8*)'de 1 dk. ve 72 °C'de 1 dk. şeklinde 35 döngü halinde tamamlandı. Son olarak 72 °C'de 5 dk. bekletilerek eksik kalan hibridizasyon reaksiyonlarının tamamlanması sağlandı (Phan vd., 2005). PCR ürünleri, %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve jel görüntüleme sistemi (Gel Logic; Kodak) ile görüntüledi. Pozitif kontrol olarak bakülovirüs için laboratuvarında önceki çalışmalarda izole edilen *Malacosoma neustria nucleopolihedrovirüs* kullanıldı (Demir, vd. 2013). Örnekler DNA dizi analizi için MacroGen (Amsterdam,

Netherlands) firmasına gönderildi. Elde edilen sekans verileri GenBank (NCBI) verileri ile karşılaştırıldı.

Tablo 5. Bakülovirüs taramasında kullanılan primerler (Herniou, 2003; Lange vd., 2004; Jehle vd., 2006).

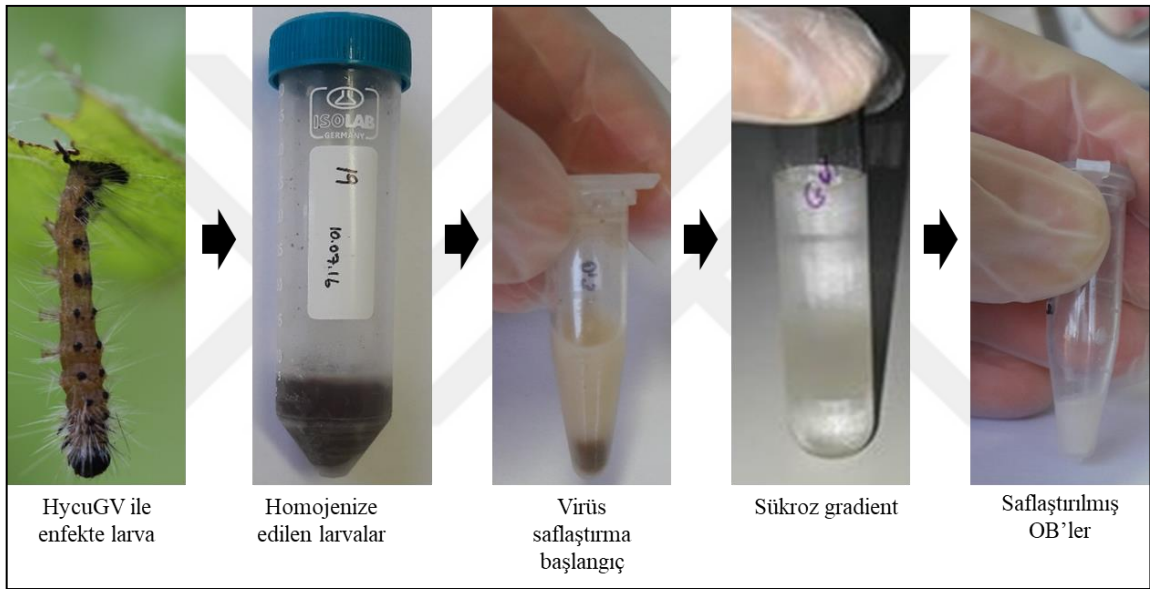
Gen	bp	Baz Sırası
<i>Polh/gran</i>	510	Fw: TGTAACGACGGCCAGTNRC
		Rv: CAGGAAACAGCTATGACCDGG
		BHHrev: TAGAAGGCACAGTCGAGGNRC
<i>Lef-8</i>	800	Fw: GTAAACGACGGCCAGTTYTTYCAYGGNGA
		Rv: AACAGCTATGACCATGGNAYRTANGGRTCY

2.3. Viral Suşların *H. cunea*'da Çoğaltılması ve Saflaştırılması

Bakülovirüs primerleri ile yapılan PCR sonucunda pozitif bant gözlemlenen 7 örneğin ayrıntılı tanımlamalarının yapılmasına başlandı. Öncelikle bu örneklerdeki virüslerin çoğaltılması için 3. evre *H. cunea* larvaları bu örneklerle ayrı ayrı enfekte edildi. Bunun için larvalar 20'şerli gruplar halinde plastik kutulara aktarıldı ve enfeksiyondan önce yaklaşık 4 saat aç bırakıldı. Enfeksiyon için dut yaprakları üzerine virüs olduğu tespit edilen örneklerden alınarak bulaştırma yapıldı. Daha sonra viral örnek bulunan yapraklar larvaların bulunduğu kutulara aktarıldı. Yaprakla beslenen larvalar takip edildi ve ölü larvalar alınarak steril tüplerde muhafaza edildi.

Elde edilen enfekte böcek larvalarından virüslerin izolasyonu için enfekte larvalar steril dH₂O ile homojenize hale getirildi. İyice ezilen larvalar 1000 × g'de 30 sn santrifüj edildi. Üst faz alınarak temiz bir tüpe aktarıldı ve 5000 × g'de 10 dk. santrifüj edildi, üst faz uzaklaştırıldı. Pellet %0,1'lik SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) ile iyice çözüldü ve 5000 × g'de 10 dk. santrifüj edildi. Aynı şekilde üst kısım uzaklaştırılarak pelletin 0.5 M NaCl ile çözülmesi sağlandı ve 5000 × g'de 10 dk. santrifüj edildi. Üst faz uzaklaştırıldı ve pellet 500 µl dH₂O ile çözüldü. Bu şekilde virüs izolasyonu gerçekleştirildi. Bu aşamadan sonra virüsün saflaştırılması için %30, %50 ve %70 konsantrasyonlarda sükröz çözeltisi

hazırlandı. Ultrasantrifüj tüplerine en yoğun olandan başlayarak virüs miktarının 3 katı olacak şekilde sürozlar aktarıldı. Aralarındaki yoğunluk farkı bant şeklinde gözlemlendi. İzole edilen virüsler en son olarak yavaş bir şekilde sürozun üzerine aktarıldı ve $96000 \times g$ 'de 1 saat $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de ultrasantrifüjde santrifüj edildi. Yoğunluk olan kısım pipetörle dikkatli bir şekilde alındı ve temiz ultrasantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine steril dH_2O ilave edildi ve aynı koşullarda tekrar ultrasantrifüj yapıldı. Üst kısım uzaklaştırılarak pellet steril dH_2O ile çözüldü ve mikroskopta incelendi. Saflaştırılan virüsler $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi (Şekil 9).



Şekil 9. Viral suşların izolasyon ve saflaştırma aşamaları

2.4. Virüs Tanımlanması

2.4.1. Morfolojik Tanımlanma

Tespit edilen, çoğaltılan ve saflaştırılan viral suşların mikroskopik çalışmaları yapıldı. Viral suşların ışık, taramalı ve transmisyon elektron mikroskobu ile morfolojik tanımlamalarına yönelik çalışmalar yürütüldü.

2.4.1.1. Viral Suşların Işık Mikroskopisi

Bakülovirüslerin ışık mikroskopisinde incelenmesinde faz kontrast ve karanlık alan mikroskopları yaygın olarak kullanılmaktadır (Hunter-Fujita vd., 1998). Fakat NPV'lerden küçük oldukları için GV'lerin karanlık alan mikroskopisinde gözlemlenmesi daha zordur. Bu mikroskopi deneyim gerektirir ve zaman alıcıdır (Hunter-Fujita vd., 1998). Safılaştırılan virüslerden hem lam-lamel arası preparat hazırlanarak hem de Giemsa ile boyama yapılarak virüs gömülü yapıların varlığına bakıldı. Saf virüs süspansiyonunda 10 µl alınarak lam üzerine bırakıldı. Üzeri lamel ile kapatılarak süspansiyonun dağılması için bir süre bekletildi. Daha sonra mikroskop (Nikon Eclipse LH-M100C-1) altında gömülü yapılar incelendi. Giemsa için 10 µl virüs süspansiyonu lam üzerine aktarıldı ve yayıldı. Açık havada kuruması sağlandı. Daha sonra metanol içerisinde 2 dk. bekletilerek fikse edildi. Suyla yıkandıktan sonra 1 saat boyunca %15'lik Giemsa boyasında bekletildi. Preparat tekrar suyla yıkanarak kuruması sağlandı. Mikroskop (Nikon Eclipse LH-M100C-1) altında immersiyon yağı kullanılarak 1000X'lik büyütmede incelendi. Mikroskop görüntüleri dijital kamerada kaydedildi (Nikon Coolpix 5000).

2.4.1.2. Viral Suşların Elektron Mikroskopisi

Elektron mikroskobu (EM), yüksek çözünürlüklü görüntüleme için önemli bir platform sağlamanın yanında böcek virüsleri de dahil olmak üzere biyolojik sistemlerin morfolojisini incelemek için tıp ve biyoloji bilimlerinde kapsamlı bir şekilde kullanılmaktadır. İki tür elektron mikroskobu vardır. Bunlar, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM)'dir.

2.4.1.2.1. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

SEM dokular, hücreler, virüsler ve diğer bileşenler gibi biyolojik materyalleri, metallerin yüzeylerini veya topolojilerini görüntülemek için kullanılmaktadır. Safılaştırılmış virüs süspansiyonu yuvarlak lamel üzerine yerleştirildi ve havada kurumasına izin verildi. Numune, püskürtmeli bir kaplayıcıda (Quorum Technology SC7620-CF) altın püskürtülerek kaplandı ve taramalı elektron mikroskobu (Zeiss EVO LS10) kullanılarak incelemeler yapıldı (büyütme gücü: 13,95 KX ve 16,25 KX).

2.4.1.2.2. Transmisyon Elektron Mikroskopisi (TEM)

Transmisyon elektron mikroskobu, biyolojik materyal kesitlerindeki küçük yapıların incelenmesinde kullanılır. Saflaştırılmış virüs gömülü yapılarını içeren pellet Karnovsky fiksatifinde (0.05 M pH 7.2’de kakodilat tamponda %2 glutaraldehit, %2 paraformaldehit + 0.001 M CaCl₂ / kalsiyum klorür) 2 saat boyunca fikse edildi. Fiksasyondan sonra aynı tamponda %1’lik OsO₄ (osmiyum tetroksit) ile 1 saat boyunca fikse edildi ve rezine gömüldü. Bloklar Leica Ultracut UCT ultra mikrotomda kesitlendirildi ve %3’lük sıvı uranil asetat Reynold’un kurşun sitratı ile boyandı. Zeis EM 99 transmisyon elektron mikroskobunda 80kV’de çalışıldı. Gömülü yapıların (30 tane OB) çapları SmartSEM programı kullanılarak ölçüldü (büyütme gücü: 20 KX ve 60 KX).

2.4.2. Viral Suşların Moleküler Tanımlanması

Restriksiyon endonükleaz (REN) analizi, seçilen viral genlerin çoğaltılması ve dizilimine ek olarak tüm genom dizilimi gibi virüslerin genetik olarak karakterize edilmesi için çeşitli yöntemler kullanılabilir. Genomik DNA'nın REN analizi, üretilen DNA profillerinin gözlemlenmesi ve karşılaştırılması yoluyla virüs izolatları arasında genetik farklılıkların belirlenmesi amacıyla kullanılan uygun bir yöntemdir.

2.4.2.1. Genomik DNA’nın İzole Edilmesi ve Konsantrasyonun Belirlenmesi

Saflaştırılmış virüs OB’lerinden genomik DNA izolasyonunda MasterPure™ DNA Purification Kit (Epicentre, Illumina® Company) kullanıldı. Bakülovirüs DNA izolasyonuna başlamadan önce gömülü yapıların çözünmesi için 150 µl vortekslenmiş saf virüs süspansiyonundan alınarak tüpe aktarıldı. Üzerine 15 µl 0.1 N NaOH (pH 12.5) eklendi. İyi karıştırılarak 37 °C’de ~ 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 15 µl Tris-HCl (pH 8.0) eklenerek nötralizasyon sağlandı ve kit talimatlarına göre DNA izolasyonuna başlandı. İlk olarak gömülü yapıdan arındırılmış çıplak virionların bulunduğu tüpler – 70 °C’de donması için bekletildi. Sonraki aşamada kullanılmak üzere her bir örnek için 2XT & C Lysis Solution’dan 150 µl temiz bir tüpe alındı ve üzerine 1 µl Proteinaz K (50 µg/µl) ilave edildi. Bu karışım donan örnek üzerine aktarıldı ve 65 °C’de

15 dk. (her 5 dk.'da bir vorteks yapıldı) bekletildi. Sonrasında örnekler alındı ve soğumaları için beklendi. Soğuyan örnekler (37 °C) 1 µl RNaz A (5 µg/µl) eklendi ve yavaşça karıştırıldı. Devamında 37 °C'de 30 dk. inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda örnekler 3 – 5 dk. buzda bekletildi. Ardından MPC Protein Precipitation Reagent adındaki reaktiften (~ 300 µl örneğe) örnek üzerine 175 µl aktarıldı ve 10 sn. vorteks edildi. Örnek 4 °C'de $\geq 10000 \times g$ 'de 10 dk. santrifüj edildi. Üst faz alındı temiz bir tüpe aktarıldı. Üzerine 500 µl izopropanol eklendi ve 30 – 40 kez alt üst edildi. Aynı koşullarda tekrar santrifüj edildi. İzopropanol dikkatlice uzaklaştırıldı. İki kere %70'lik etanol ile temizleme yapıldı. Kalan alkoller pipetle dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Tüpteki DNA 35 µl TE Buffer ile çözüldü. İzole edilen DNA'lar + 4 °C'de bir süre bekletilerek nanodrop-spektrofotometre (Thermo Scientific, NanoDrop 2000) ile miktarı ölçüldü.

2.4.2.2. Restriksiyon Endonükleaz Analizi ve Agaroz Jel Elektroforezi

Viral DNA'ların restriksiyon enzim kesim reaksiyonu 30 µl toplam hacimde, 4 µl 10X restriksiyon enzim tamponu, *EcoRI* (12 U/µl) ve *HindIII* (10 U/µl) (Promega, USA) enzimleri, 10 µl genomik DNA (~1 – 2 µg) ve 14 µl ddH₂O olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyonlar kısa bir santrifüjden sonra 4 saat boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında reaksiyonların içerisine yürütme boyası (6X DNA Loading Dye) eklenerek 15 dk. 65 °C'de bekletildi. Hazırlanan %0.6'lık agaroz jelde 1X TAE tamponunda (40 mM Tris-asetat, 20 mM asetik asit, 1mM EDTA) 30 V'de 16 saat boyunca yürütüldü ve etidyum bromürde (EtBr) bekletildikten sonra jel görüntüleme sistemi (Gel Logic 200 Imagine System; Kodak) görüntülendi. Kodak Molecular Imaging Software 4.0.5 programı kullanılarak kesim sonucundaki bantların moleküler ağırlıkları hesaplandı.

2.4.2.3. Viral Suşların *gran*, *lef-8* ve *lef-9* Gen Bölgelerinin Çoğaltılması

Gran, *lef-8* ve *lef-9* genleri ilgili primerler kullanılarak PCR ile çoğaltıldı (Tablo 6). PCR reaksiyonu için karışım 1 µl DNA süspansiyonu (40 – 50 ng), 10 µl (5X) PCR tamponu, 3 µl MgCl₂ (25mM), 1.5 µl dNTP karışımı (her birinden 10 mM), her bir primerden 1.5 µl (500 nM), 0.25 µl GoTaq G2 FlexiDNA polimeraz (5U/µl) ve ddH₂O ile

son hacim 50 µl'ye tamamlanarak hazırlandı. PCR koşulları 95 °C'de 2 dk. denatürasyondan sonra 95 °C'de 30 sn., 48 °C (*lef-8*) / 49 °C (*lef-9*) / 53 °C (*polh/gran*)'de 1 dk. ve 72 °C'de 1 dk. şeklinde 35 döngü tamamlandı. Son olarak 72 °C'de 5 dk. bekletilerek eksik kalan reaksiyonların tamamlanması sağlandı (Phan vd., 2005). PCR ürünleri, %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve jel görüntüleme sistemi (Gel Logic; Kodak) ile görüntülendi. Pozitif kontrollerde bakülovirüs için laboratuvarında önceki çalışmalarda izole edilen ManNPV kullanıldı. Örnekler DNA dizi analizi için Macrogen (Amsterdam, Netherlands) firmasına gönderildi. Elde edilen sekans verileri GenBank (NCBI) verileri ile karşılaştırıldı.

Tablo 6. Viral suşların gen bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan primerler (Herniou, 2003; Lange vd., 2004; Jehle vd., 2006).

Genin adı	Fonksiyonu	Baz Sırası
<i>Polihedrin/Granulin</i>	Yapısal gen, protein matriksinin bir parçasını oluşturur	Fw: TGTAACGACGGCCAGTNRC Rv: CAGGAAACAGCTATGACCDGG BGHrev: TAGAAGGCACAGTCGAGGNRC
<i>Late expression factor 8 / geç ekspresyon faktörü 8 (lef-8)</i>	Transkripsiyonel gen, viral DNA'nın geç transkripsiyonunda yer alır	Fw: GTAAACGACGGCCAGTTYTTY CA YGGNGA Rv: AACAGCTATGACCATGGNAYRT AN GGRTCY
<i>Late expression factor 9 / geç ekspresyon faktörü 9 (lef-9)</i>	Transkripsiyonel gen, viral DNA'nın geç transkripsiyonunda yer alır	Fw: TGTAACGACGGCCAGTTTGT CD CCR Rv: CAGGAAACAGCTATGACCAARA AY GGITA

2.4.2.4. Sekans Analizi ve Filogeni

Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan viral gen bölgeleri sekansa gönderilmek üzere hazırlandı. Çoğaltılan PCR örnekleri NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kiti kullanılarak saflaştırıldı. Jelde yürütülen örnekler jelden kesilerek temiz tüplere aktarıldı ve kit talimatlarına göre saflaştırma yapıldı. Kesilen örnek hacminin 2 katı olacak şekilde NTI Buffer eklenerek 50 °C'de 5 – 10 dk. bekletildi. Arada alt üst edilerek jelin erimesi

sağlandı. Daha sonra kitle bulunan örnek toplama tüpünün içerisine koyulan “NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up” kolonuna aktarıldı. Kolonlar 11000 × g’de 30 sn. santrifüj edildi. Toplama tüpü boşaltıldı. İki kere kolonlara 700 µl NT3 Buffer ilave edildi ve aynı şartlarda santrifüj işlemi tekrarlandı. Daha sonra 11000 × g’de 1 dk. ek bir santrifüj yapıldı. Kolonlar yeni santrifüj tüplerine alındı ve kolonların üzerine 15 – 30 µl Buffer NE eklenerek oda sıcaklığında 1 dk. bekletildi. Son olarak 11000 × g’de 1 dk. santrifüj yapıldı ve temiz PCR örnekleri elde edildi. Örnekler DNA dizi analizi için Macrogen (Amsterdam, Netherlands) firmasına gönderildi. Elde edilen sekans verileri GenBank (NCBI) verileri ile karşılaştırıldı. Diziler GeneDoc programında düzenlendi. Daha sonra bu spesifik gen bölgelerin filogenetik analizi BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999) ve MEGA 7 (Tamura vd., 2007) programları kullanılarak tespit edildi ve bootstrap ağaçlar oluşturuldu. HycuGV-Hc1 izolatına ait üç gen bölgesi ayrı ayrı çoklu dizi hizalama yapılarak diziler arasındaki farklılıklar analiz edildi. Bu hizalamalar www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/ adresinde Multiple Sequence Alignment kullanılarak çoklu hizalama yapıldı. Analizde GenBank karşılaştırmasında yakın benzerlik bulunan türler kullanıldı (Jehle vd., 2006; Lange vd., 2004) (Tablo 7). Bu türler, HycuGV A5-1 ve A18-3 izolatları, EsacGV, *Choristoneura murinana* GV ve *Pandemis limitata* GV (*gran*/AY519246, *lef-8*/AY519247 ve *lef-9*/AY519248)’dir.

Tablo 7. Filogenetik analizde kullanılan referans türler (Jehle vd., 2006).

Virüs Adı (Kısaltma)	Konak Familyası	Acc. no. <i>polh/gran</i>	Acc. no. <i>lef-8</i>	Acc. no. <i>lef-9</i>	İzolat Adı
<i>Euxoa ochrogaster</i> GV (EuocGV)	Noctuidae	AY70666 6	AY70655 0	AY70661 5	A24-1
<i>Scotogramma trifolii</i> GV (SctrGV)	Noctuidae	AY70667 6	AY70658 3	AY70664 8	A26-3
<i>Peridroma morpontora</i> GV (PemoGV)	Noctuidae	AY70667 2	AY70657 3	AY70663 8	A25-3
<i>Spodoptera frugiperda</i> GV (SpfrGV)	Noctuidae	AY70667 7	AY70658 4	AY70664 9	A12-4
<i>Cydia pomonella</i> GV (CpGV)	Tortricidae	AY70666 7	AY70655 6	AY70662 1	A6-4
<i>Cydia pomonella</i> GV (CpGV)	Tortricidae	AY70666 8	AY70655 7	AY70662 2	M39-1
<i>Cydia pomonella</i> GV (CpGV)	Tortricidae	AY70667 0	AY70656 1	AY70662 6	A11-2

Tablo 7'nin devamı

<i>Adoxophyes orana</i> GV (AdorGV)	Tortricidae	AY70665 8	AY70653 0	AY70659 5	S45
<i>Adoxophyes orana</i> GV (AdorGV)	Tortricidae	AY70665 7	AY70652 9	AY70659 4	A6-5
<i>Andraca bipunctata</i> GV (AnbiGV)	Bombycidae	AY70666 2	AY70653 8	AY70660 3	S48
<i>Erinnyis ello</i> GV (ErelGV)	Sphingidae	AY70666 5	AY70654 8	AY70631 3	M34-4
<i>Pieris brassicae</i> GV (PbGV)	Pieridae	FJ151541	-	-	S1
<i>Pieris rapae</i> GV (PiraGV)	Pieridae	AY70667 3	AY70657 5	AY70664 0	S55
<i>Clostera anachoreta</i> GV (ClanGV)	Notodontidae	AY70666 4	AY70654 4	AY70660 9	S49
<i>Agrotis exclamationis</i> GV (AgexGV)	Noctuidae	AY70665 9	AY70653 1	AY70659 6	S46
<i>Agrotis segetum</i> GV (AgseGV)	Noctuidae	AY70666 1	AY70653 4	AY70659 9	S47
<i>Agrotis segetum</i> GV (AgseGV)	Noctuidae	AY70666 0	AY70653 3	AY70659 8	A17-5
<i>Estigmene acrea</i> GV (EsacGV)	Arctiinae	DQ23525 0	-	DQ23525 1	M30-3
<i>Hyphantria cunea</i> GV (HycuGV)	Arctiidae	AY70666 9	AY70655 9	AY70662 4	A5-1 / A18-3
<i>Spodoptera androgea</i> GV (SpanGV)	Noctuidae	-	DQ23524 8	DQ23524 7	A25-7
<i>Choristoneura murinana</i> GV (ChmuGV)	Tortricidae	AY70666 3	AY70654 3	AY70660 8	A11-1 M50-3
<i>Autographa biloba</i> NPV (AbNPV)	Noctuidae	AY73772 4	AY73772 2	AY73772 3	A23-1
<i>Autographa gamma</i> NPV (AgNPV)	Noctuidae	JN674788	JN674649	JN674812	474
<i>Hyphantria cunea</i> NPV (HycuNPV)	Arctiidae	AY70670 0	AY70656 0	AY70662 5	S27
<i>Lymantria monacha</i> NPV (LymoNPV)	Lymantriidae	AY70670 2	AY70656 3	KF69507 1	463
<i>Lymantria xyliana</i> NPV (LyxyNPV)	Lymantriidae	AY70670 3	AY70656 4	KF69506 8	3061
<i>Lymantria dispar</i> NPV (LdNPV)	Lymantriidae	AF49968 7	KF69506 3	KF69506 6	3152

2.5. Viral Suşların İnsektisidal Aktivite Çalışmaları

Biyolojik testlerde uygulanacak etmenlerin konsantrasyonlarının doğru bir şekilde hesaplanması elde edilecek sonuçların değerlendirilmesi bakımından oldukça önemlidir. Bakülovirüslerde mikroskop altında OB'lerin sayılması ile virüs konsantrasyonları hazırlanmaktadır. Saflaştırılan virüs izolatlarının stok konsantrasyonları hemoaitometre kullanılarak hesaplandı. Sayım için 10 µl virüs süspansiyonu kullanıldı. Bir kareye 100 – 200 OB gelecek şekilde süspansiyon seyreltildi. OB'lerin sayımı çapraz beş büyük kare üzerinden yapıldı. Aynı seyreltik, tekrar sayıldı. Daha sonra aynı stoktan tekrar seyreltik hazırlanarak işlem ikinci kez tekrarlandı. Stok virüs konsantrasyonu 10⁹ OB/ml olarak hazırlandı. Her viral izolat için doz denemelerinde; 1 × 10³, 1 × 10⁴, 1 × 10⁵, 1 × 10⁶ ve 1 × 10⁷ OB/ml konsantrasyonları olacak şekilde dilüsyonlar yapıldı. Deneylerde kullanılan *H. cunea* larvaları laboratuvarında yetiştirilen 1. dölden elde edilen yumurtalardan çıkan 2. döl larvalarla yapıldı.

2.5.1. Viral Suşların *H. cunea* Larvaları Üzerindeki Doz Denemeleri

Literatürdeki çalışmalara bakıldığında doz-ölüm ilişkileri ile ilgili denemelerde uygulama metodu hazır besin kullanılarak yapılmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesi arazi koşulları dikkat alındığında geçersiz olabilmektedir (Bianchi vd, 2001). Denemelerde *H. cunea*'nın doğal konukçularından biri olan dut (*Morus sp.*) bitkisinin yapraklarının kullanılmasının uygun olacağı düşünüldü.

Tüm viral izolatlar için hazırlanan (HycuGV-Hc1 – Hc7) 1 × 10³, 1 × 10⁴, 1 × 10⁵, 1 × 10⁶ ve 1 × 10⁷ OB/ml konsantrasyonlarındaki virüs süspansiyonları *H. cunea* 3. evre larvaları üzerinde 25 ± 2 °C'de laboratuvar koşullarında test edildi. Taze dut yaprakları öncelikle saf suyla silinerek temizlendi. Deney düzeneği her bir izolat için 3 tekrarlı olacak şekilde 30'arlı gruplar halinde (toplamda 90 larva) hazırlandı. Larvalar enfeksiyon öncesinde ~ 5 saat kadar aç bırakıldı. Taze dut yapraklarının her iki yüzeyine de ddH₂O ile hazırlanan virüs süspansiyonu iyice yayıldı ve yaprakların kuruması sağlandı. Virüs bulaştırılmış dut yaprakları kaplara bırakıldı ve larvalar bu kaplardaki taze dut yapraklarının üzerine aktarıldı. Kontrol grubu olarak dut yaprağına steril ddH₂O yayılarak kaplara koyuldu. Yaprakla beslenen larvalar takip edildi ve 1. günün sonunda ölen larvalar kaplardan uzaklaştırılarak kaydedildi. Kalan canlı larva sayısı esas alınarak deney

sonuçları hesaplandı. Deney farklı zamanlarda 3 kez tekrarlandı ve veriler larvalar pupaya girinceye kadar (17 – 21 gün boyunca) kaydedildi.

2.5.2. Viral Suşların *H. cunea*'nın Larval Evreleri Üzerindeki Denemeleri

Amerikan beyaz kelebeğinden izole edilen viral suşların (HycuGV-Hc1 – Hc7) bu böceğin farklı larval evreleri üzerindeki insektisidal etkisini araştırmak amacıyla deney düzeneği hazırlandı. Bu test düzeneğinde tüm viral izolatlar için 1×10^7 OB/ml dozu ve kontrol grubunda ise sadece ddH₂O kullanıldı. Deney kaplarına virüs bulaştırılmış dut yaprakları koyularak toplu dozlama olacak şekilde 2., 3., 4. ve 5. evre *H. cunea* larvaları 30'arlı gruplar halinde 3 tekrarlı bir şekilde bırakıldı. Bu çalışma farklı zamanlarda 3 kez tekrarlandı. İlk gün ölü larvalar uzaklaştırıldı ve canlı larva sayısı hesaplamalarda esas alındı. Deney larvalar pupaya girene kadar (15 – 21 gün boyunca) takip edilerek kaydedildi.

2.5.3. Farklı Besinlerin İsektisidal Aktivite Üzerindeki Etkilerinin Tespit Edilmesi

Farklı besinlerin Amerikan beyaz kelebeğinden izole edilen virüsün insektisidal aktivite üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla deney düzeneği hazırlandı. Deneylerde HycuGV-Hc1 suşu kullanıldı. Bu test düzeneği için 1×10^7 OBs/ml dozu ve kontrol grubunda ise sadece ddH₂O uygulandı. Deney kaplarına virüs bulaştırılmış dut, elma, ceviz, fındık ve ıhlamur yaprakları koyularak 3. evre *H. cunea* larvaları 30'arlı gruplar halinde 3 tekrarlı bir şekilde bırakıldı. Bu çalışma farklı zamanlarda 3 kez tekrarlandı. İlk gün ölü larvalar uzaklaştırıldı ve canlı larva sayısı hesaplamalarda esas alındı.

2.5.4. HycuGV-Hc1 Suşunun Konak Spektrumlarının Belirlenmesi

Amerikan beyaz kelebeğinden izole edilen HycuGV-Hc1 suşunun *Malacosoma neustria*, *Spodoptera exigua* ve *Helicoverpa armigera* 3. evre larvaları üzerindeki insektisidal etkisi araştırıldı. Deneylerde kullanılan *M. neustria* larvaları Haziran 2017

tarihinde böcek istilasına uğramış kuşburnu bitkilerinden toplanarak laboratuvara getirildi. *S. exigua* ve *H. armigera* ise laboratuvar kültürlerinden sağlandı.

Bu test düzeneği için 1×10^7 OB/ml dozu ve kontrol grubunda ise sadece ddH₂O kullanıldı. Deney kaplarına *M. neustria* için virüs bulaştırılmış berberis (Kadın tuzluğu-Hanım tuzluğu) bitkisinin yaprakları, *S. exigua* ve *H. armigera* için virüs bulaştırılmış marul yaprakları kullanıldı. Daha sonra aç bırakılan larvalar 30'arlı gruplar halinde 3 tekrarlı olarak kaplara bırakıldı. Her deney farklı zamanlarda 3 kez tekrarlandı. İlk gün ölü larvalar uzaklaştırıldı ve canlı larva sayısı hesaplamalarda esas alındı. Deney, larvalar pupaya girene kadar (15 – 21 gün boyunca) takip edilerek kaydedildi. Ölü larvalar morfolojik ve moleküler olarak incelenerek ölümlerin HycuGV-Hc1 suşundan kaynaklı olup olmadığı teyit edildi.

2.5.5. HycuGV-Hc1 Suşunun Alanda Saksı Denemeleri

H. cunea'dan izole edilen HycuGV-Hc1 suşunun *H. cunea* larvalarının dut fidelerinde neden olduğu beslenme hasarını azaltma potansiyelini değerlendirmek için sera çalışmaları yapıldı (Şekil 10). Deneyde kullanılacak dut fideleri (*Morus sp.*) Nisan 2017 tarihinde Karadeniz Teknik Üniversitesi Orman Fakültesi sera alanında saksılara (45 cm derinlik, 30 cm çap) dikildi (Şekil 10A). Temmuz 2017 tarihine kadar fidelerin yeşillenmesi sağlandı (Şekil 10B).

Deneyde kullanılan *H. cunea* larvaları 4 Temmuz 2017 tarihinde Trabzon'da böcek istilasına uğramış dut ağaçlarından toplanarak laboratuvara getirildi. Deneylerde laboratuvarda açılan yumurtalardan çıkan larvalar kullanıldı. Uygulama için 50'şer adet 2. evre ve 4. evre *H. cunea* larvaları seçildi. Bu test düzeneği için HycuGV-Hc1 suşu 1×10^9 OBs/ml dozunda kullanıldı. Kontrol grubunda ise sadece ddH₂O kullanıldı. Deneylerde yaklaşık olarak aynı ebattaki yeşillenen fideler seçildi ve uygulama 8 yaprak (yaklaşık 14 cm²) üzerinde yapıldı. Yapraklara 10 ml 1×10^9 OB/ml HycuGV-Hc1 suşundan püskürtüldü (Şekil 10C). Kontrol grubuna ise sadece steril su uygulandı. Yaprakların kurumamasından sonra önceden seçilerek ayrı kutulara bırakılan 50'şer adet 2. ve 4. evre *H. cunea* larvaları ayrı ayrı uygulama yapılan yapraklara bırakıldı. Uygulamalar tül keselerle sarılarak kontrol altına alındı (Şekil 10D). Fidelerdeki yaprakların beslenme hasarını ve yeşillik korumasını göstermek amacıyla uygulamadan 7 gün sonra fotoğraflama yapıldı. Toplanan canlı larvalar ayrı ayrı kaplara aktarıldı ve taze dut yapraklarıyla beslenerek

deney devam ettirildi. Larvalar pupaya girinceye (10 – 15 gün boyunca) kadar her gün ölü olup olmadığı kontrol edilerek kaydedildi. Her iki evre için deneyler 3 kez tekrarlandı.



Şekil 10. Sera denemeleri. A: Fidelerin saksılara dikilmesi (Nisan 2017); B: Fidelerin yeşillenmesi (Temmuz 2017); C: Deney gruplarının uygulamaların yapılması; D: Dut yapraklarının uygulama sonrası tüllerle sarılması

2.5.6. İstatistiksel Analizler

Ölüm oranları Abbott formülüne göre (Abbott, 1925) hesaplandı. Tüm insektisidal aktivite çalışmaları sonucunda kaydedilen veriler ToxRat Professional Yazılım programı (version 3.2.1.) kullanılarak probit ve tek-yönlü ANOVA ile analiz edildi. İstatistiksel analizlerde tüm deneylerde 14. gündeki ölümler dikkate alınarak sonuçlar değerlendirildi.

3. BULGULAR

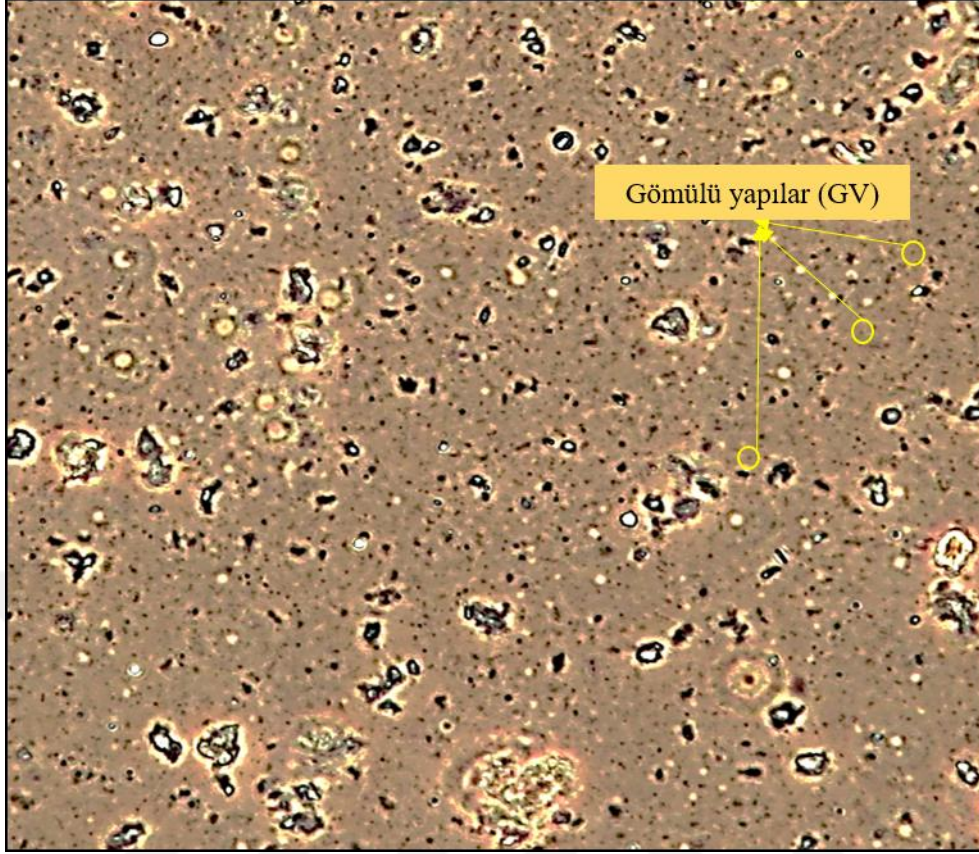
3.1. Virüs Taraması

3.1.1. Larvaların Makroskobik İncelenmesi

Arazi çalışmalarında konukçu bitki üzerinde ölü olarak bulunan larvaların yaprağa yapışmış ve renklerinin koyu olduğu gözlemlendi. Ölü olarak bulunan larvaların özellikle erken evre *H. cunea* larvaları olduğu, bunun yanında laboratuvara getirildikten sonra ölen larvaların ise birçoğunda renk değişikliği olduğu ve daha çok geç evrelerdeki larvaların enfekte olduğu tespit edildi. Bu larvaların ölmeden önce beslenmelerinde azalma meydana geldiği ve hareketlerinin yavaşladığı gözlemlendi. Genel olarak ölen larvalarda turuncukahvemsî ve siyahımsî renklenmenin olduğu belirlendi. Larvalarda vücut dokusunun yumuşadığı sıvı ya da akışkan bir hal aldığı görüldü.

3.1.2. Larvaların Mikroskobik İncelenmesi

Çeşitli viral hastalık tipleri, farklı inklüzyon yapıların varlığı ile karakterize edilir. NPV ve GV bir protein matrix içerisine gömülü yapıya sahiptir. Bu gömülü virüslerin büyüklükleri 0.5 ile 15 µm arasındadır ve ışık mikroskobu altında görülebilirler. Mikroskobik incelemede örneklerden hazırlanan preparatlar incelendi ve gömülü yapıların varlığı araştırıldı. Viral yapıları içeren bazı örneklerden dijital kamera ile görüntü alındı (Şekil 11). Makroskobik olarak bakülovirüs ile enfekte olduğu belirlenen larvalardan hazırlanan lam-lamel arası preparasyonun incelenmesinde farklı dokular arasında granulovirüs benzeri küçük kristaller gözlemlendi.

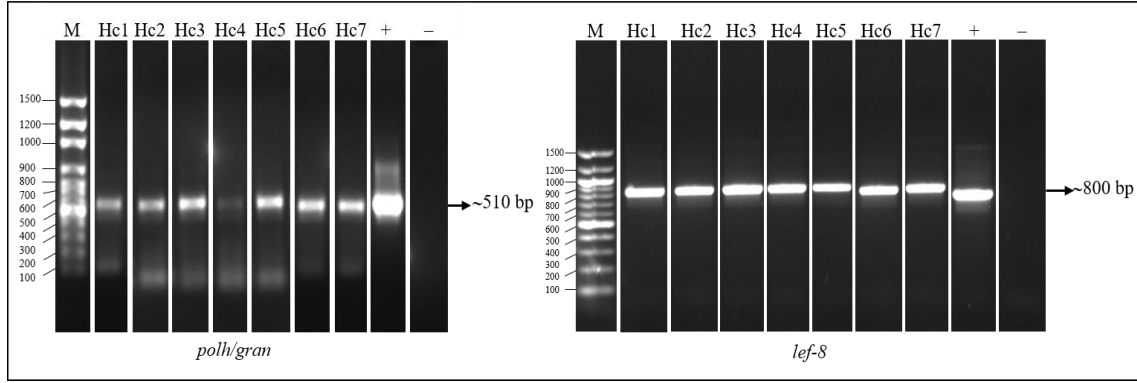


Şekil 11. Mikroskopik incelemede GV'lerin görüntüsü (400X)

3.1.3. Larvaların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Araştırılması

Bakülovirüs için kullanılan gen bölgelerini çoğaltan *polh/gran* ve *lef-8* primerleriyle yapılan PCR sonuçlarında, tarama yapılan ölü larva örneklerinin 7 tanesinde agaroz jel üzerinde bant gözlemlendi (Şekil 12). Kontrol olarak kullanılan ManeNPV DNA'sında aynı büyüklükte bant tespit edildi. Negatif kontrolde bant gözlenmedi.

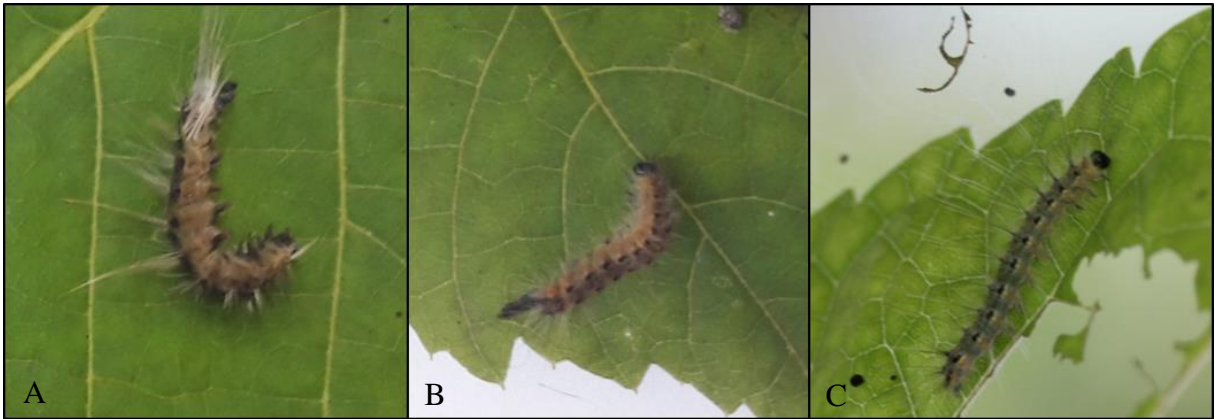
PCR çalışmaları sonucunda pozitif bant tespit edilen örneklerin dizi analizleri yapıldı. GenBank (NCBI)'ta yapılan karşılaştırma çalışmaları sonucunda 7 örneğin de %99 – 100 oranlarında *Hyphantria cunea* granulovirüs (HycuGV) A5-1 (*gran*) ve A18-3 (*lef-8*) izolatlarına benzerlik gösterdiği belirlendi. Kullanılan bu primerler ile yapılan bakülovirüs taraması sonucunda elde edilen granulovirüs ile çalışmalara devam edildi.



Şekil 12. *H. cunea* ölü larvalarında PCR ile bakülovirüs tarama sonuçları. *polh/gran* ve *lef-8*'e ait çoğaltılan bölgelere ait %1'lik agaroz jel görüntüleri. M: 1 kb markır, +: ManeNPV, -: negatif kontrol

3.2. Tespit Edilen Viral Suşların Çoğaltılması ve Saflaştırılması

Virüs tespit edilen örneklerden izole edilen HycuGV suşları ayrı ayrı *H. cunea* 3. evre larvalarında çoğaltıldı. Virüslerle enfekte edilen larvaların beslenmesinde enfeksiyondan 5 gün sonra azalma olduğu gözlemlendi. Turuncu-kahverengi olan ölü larvalar toplanarak $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı (Şekil 13). Daha sonra sukroz gradienti ile saflaştırılan virüs suşları sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

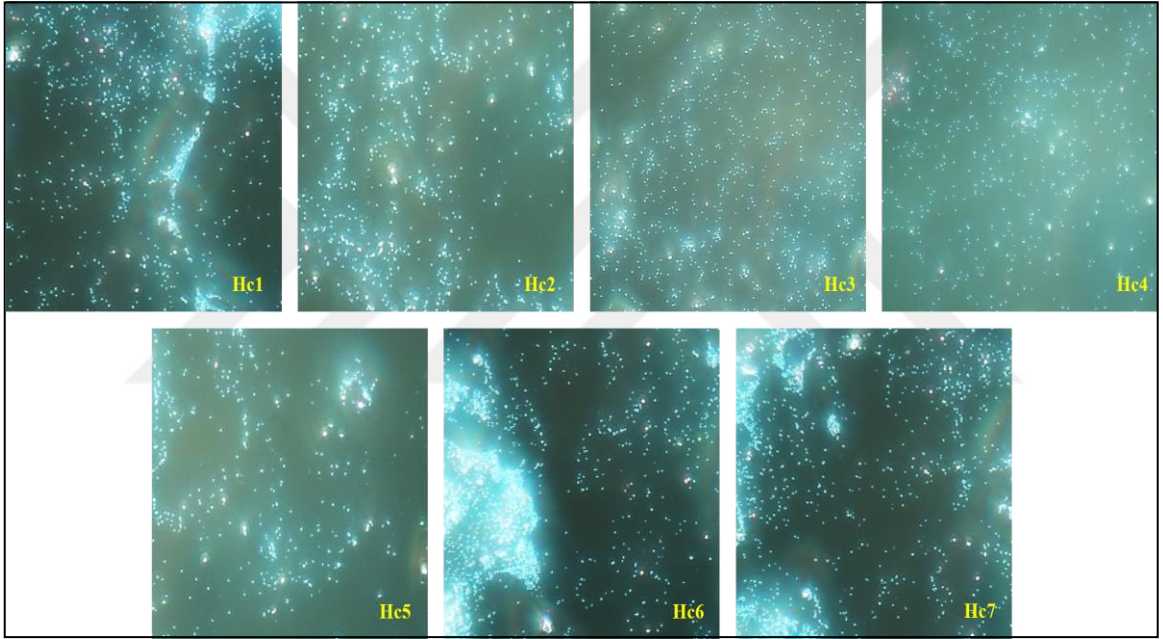


Şekil 13. Enfeksiyon yapılan *H. cunea* larvası. A ve B: Virüsle enfekte olan larva; C: Virüs uygulaması yapılmamış sağlıklı larva

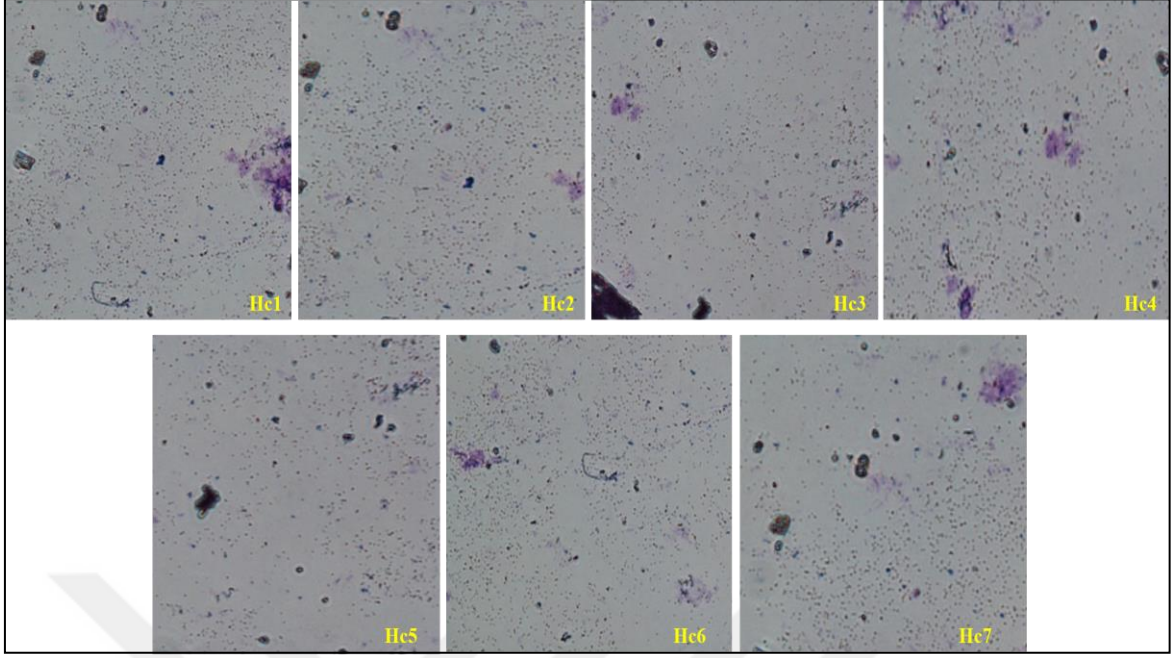
3.3. Viral Suşların Morfolojik Tanımlanması

3.3.1. Işık Mikroskopisi

HycuGV suşlarının karanlık alan faz-kontrast mikroskopunda incelemeleri sonucunda, karanlık alanda GV'ler parlak kristal yapılar olarak görüldü (Şekil 14). Bu yapıların lam-lamel arası preparatın her alanında yoğun bir şekilde olduğu gözlemlendi. Aynı viral suşların giemsa boyaması sonucunda preparatın her alanında koyu renkli nokta şeklinde viral yapılar görüldü (Şekil 15).



Şekil 14. HycuGV suşlarının faz-kontrast mikroskopu karanlık alan görüntüleri (1000X)

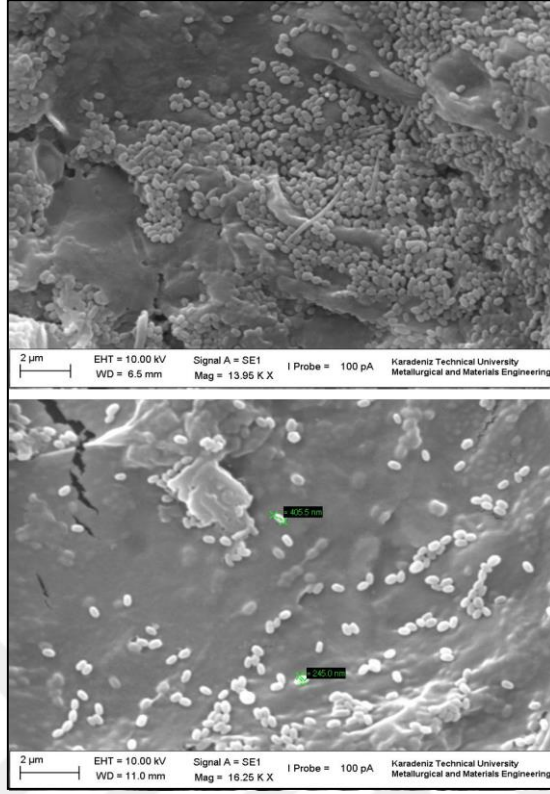


Şekil 15. Giemsa boyama sonucu HycuGV suşlarının faz kontrast mikroskobu görüntüleri (1000X)

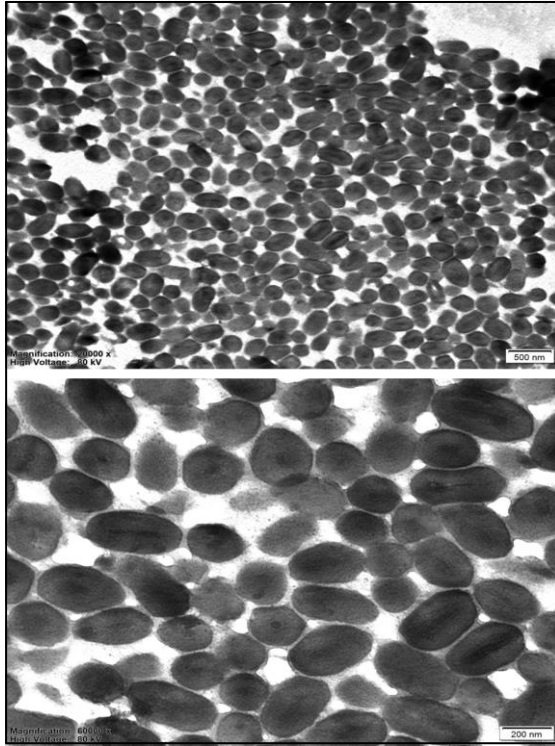
3.3.2. Elektron Mikroskopisi

HycuGV-Hc1 suşunun taramalı elektron mikroskobu incelemeleri sonucunda, viral partiküllerin oval şekilde olduğu belirlendi (Şekil 16). Görüntülerde elips şeklindeki viral yapıların granulovirüs morfolojisine benzer şekilde olduğu belirlendi. Böylece izole edilen suşların GV olduğu teyit edildi. Transmisyon elektron mikroskobu incelemeleri sonucunda ise her virüs partikülünün oval bir matriks içerisinde çomak şeklinde bir virion içerdiği tespit edildi (Şekil 17).

TEM sonuçlarına göre gömülü yapıların boyutlarının ortalama 368 nm (318-546 nm) boyunda ve 201 nm (174-240 nm) eninde olduğu belirlendi. Virüs partiküllerinin içerdiği çubuk şeklindeki kapsüllerin 43 µm çapında 250 nm uzunlukta olduğu hesaplandı. Kapsüllerin çapları 35-51 nm ve uzunlukları 202-341 nm arasında değişmektedir.



Şekil 16. HycuGV-Hc1 suşuna ait taramalı elektron mikroskobu görüntüleri

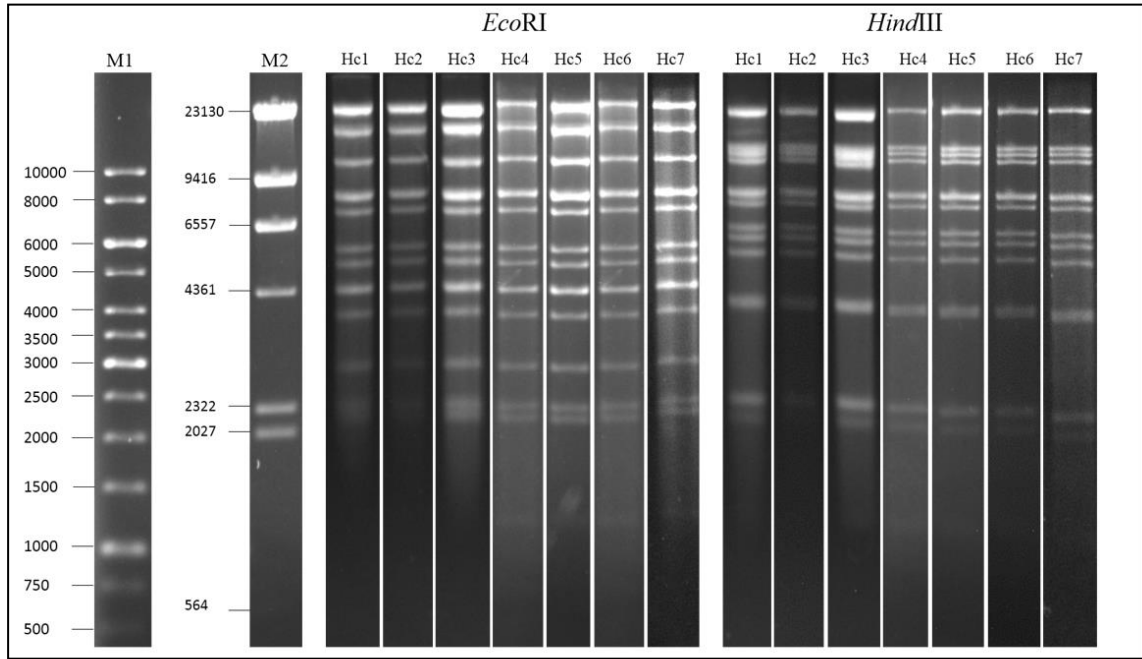


Şekil 17. HycuGV-Hc1 suşunun transmisyon elektron mikroskobu görüntüleri

3.4. Virüslerin Moleküler Tanımlanması

3.4.1. Restriksiyon Endonükleaz Analizi

Bu çalışmada izole edilen 7 granulovirüs suşunun DNA'larıyla *EcoRI* ve *HindIII* enzimleri kullanılarak kesim reaksiyonu hazırlandı. Enzimle kesilen DNA'lar agaroz jelde yürütüldü ve görüntüldü (Şekil 18). Her iki enzim ile kesim haritalarına bakıldığında 7 izolat arasında farklılık olmadığı belirlendi. *EcoRI* enzimi ile kesim sonucunda 14 fragment oluşurken, *HindIII* kesiminde 13 fragment olduğu tespit edildi. Bantların büyüklükleri Lambda DNA/*HindIII* markır ve 1 kb'lik markır esas alınarak hesaplandı. Hesaplamalar sonucunda viral genom büyüklüğü 112 kb olarak belirlendi (Tablo 8).



Şekil 18. HycuGV suşlarına ait *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon profilleri. M1: 1 kb markır, M2: Lambda DNA/*HindIII*

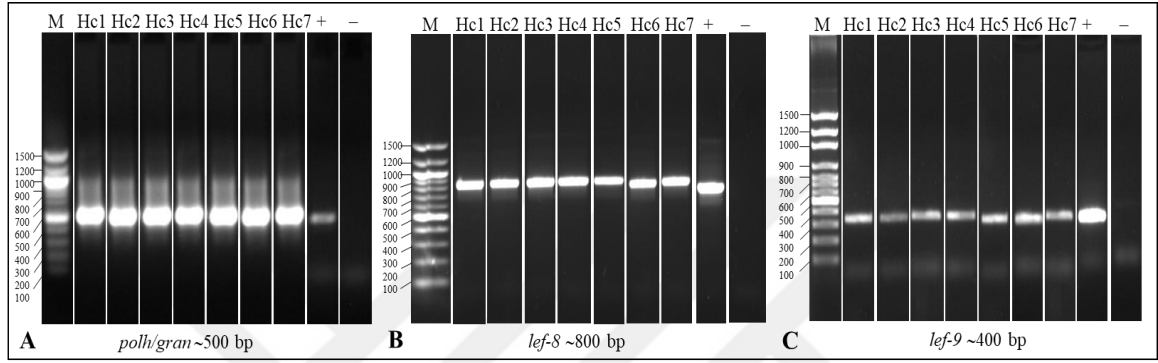
Tablo 8. HycuGV-Hc1 suşunun *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleaz analizine göre fragment sayısı ve genom büyüklüğü

Fragmentler	<i>EcoRI</i> (bp)	<i>HindIII</i> (bp)
1	27188,5	23312,9
2	21011,4	15181,6
3	13821,6	14353,0
4	8621,8	13073,1
5	7615,9	8057,2
6	5973,5	7721,4
7	5461,6	6325,5
8	4569,2	5970,7
9	4569,2	5436,8
10	4124,1	4050,2
11	3142,5	4050,2
12	2412,6	2367,1
13	2256,4	2129,1
14	1269,8	-
Toplam	112038	112028

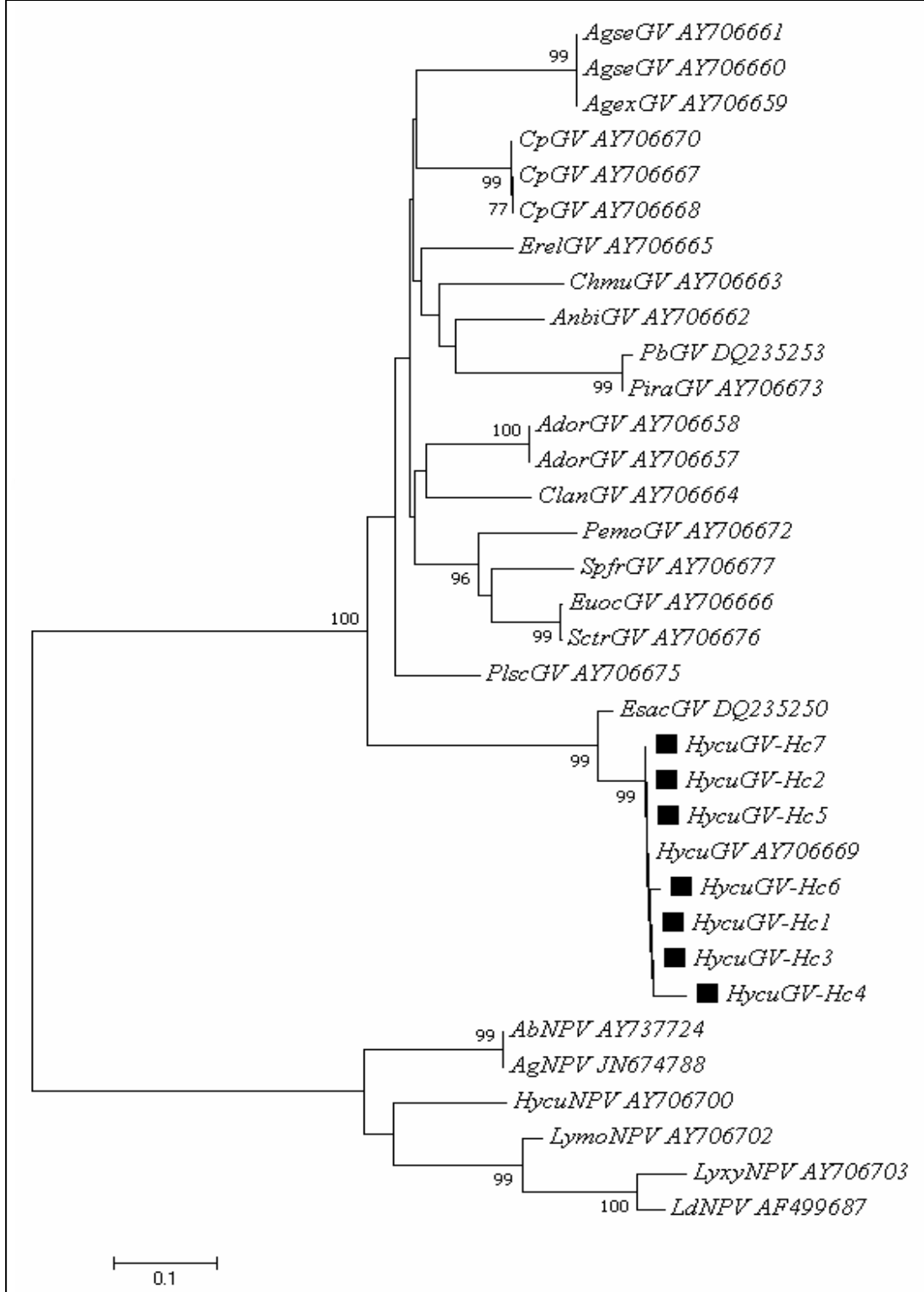
3.4.2. Viral Suşların *gran*, *lef-8* ve *lef-9* Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması ve Filogenisi

Granulovirüs olduğu tespit edilen suşların *gran*, *lef-8* ve *lef-9* gen bölgeleri PCR ile çoğaltıldı ve agaroz jelde yürütüldü (Şekil 19). Her suştan sırasıyla kullanılan genlere uyan yaklaşık 510, 800 ve 400 bp büyüklüğünde bantlar tespit edildi. DNA dizi analizi yapılan ilgili genlere ait diziler GenBank sıraları ile karşılaştırıldığında, çalışmada elde edilen suşlara ait *gran* ve *lef-9*'un HycuGV A5-1 izolatına benzediği, *lef-8*'in ise HycuGV-A18-3 izolatına %99 - 100 benzerlik gösterdiği belirlendi. Sekans sonuçları GenBank'daki verilerle karşılaştırıldığında HycuGV-Hc1 izolatının *gran* sekansı 457 bp iken, A5-1 izolatı 461 bp uzunlukta diziye sahip olduğu görüldü. Aynı şekilde *lef-8* için 837 bp (HycuGV-Hc1)'e karşı 742 bp (A18-3) ile *lef-9*'a karşı 284 (HycuGV-Hc1)'e karşı 266 bp (A5-1) uzunlukta olduğu belirlendi. Bu sekans dizileri her üç gen bölgesi için de karşılaştırıldığında HycuGV-Hc1 izolatı ile HycuGV-A5-1 ve A18-3 izolatlarında 4 – 11 nükleotid farklılık ile %99 – 100 oranında yakın benzerlik gösterdiği görüldü. Aynı izolatın *gran* ve *lef-9* sekans dizilerinin EsacGV izolatının 27 ve 23 nükleotid farkla %94 – 95 benzerlik gösterdiği tespit edildi.

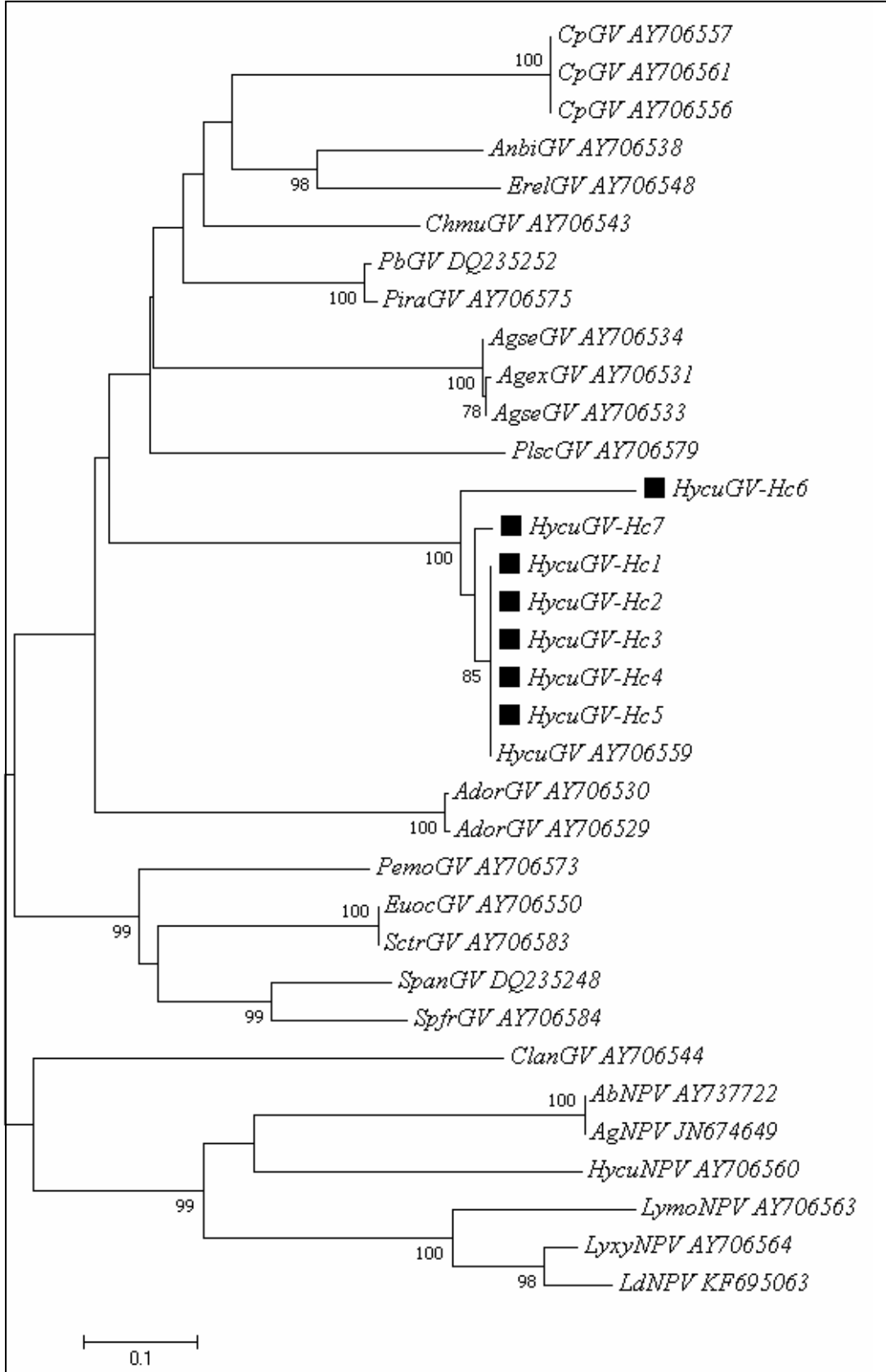
DNA dizi analizleri yapılan, granulovirüs izolatlarının *gran*, *lef-8* ve *lef-9* gen bölgeleri esas alınarak MEGA 7 filogenetik ağaç programı ile referans bakülovirüs dizileriyle karşılaştırılarak filogenetik analiz yapıldı (Şekil 20, 21 ve 22). Elde edilen veriler sonucunda *H. cunea* granulovirüs izolatlarının HycuGV izolatları (HycuGV A5-1 ve A18-3) ile yakın ilişki gösterdiği belirlendi. Çoklu hizalama yapılan HycuGv-Hc1 izolatının HycuGV izolatları ile benzer olduğu desteklendi (Şekil 23, 24 ve 25).



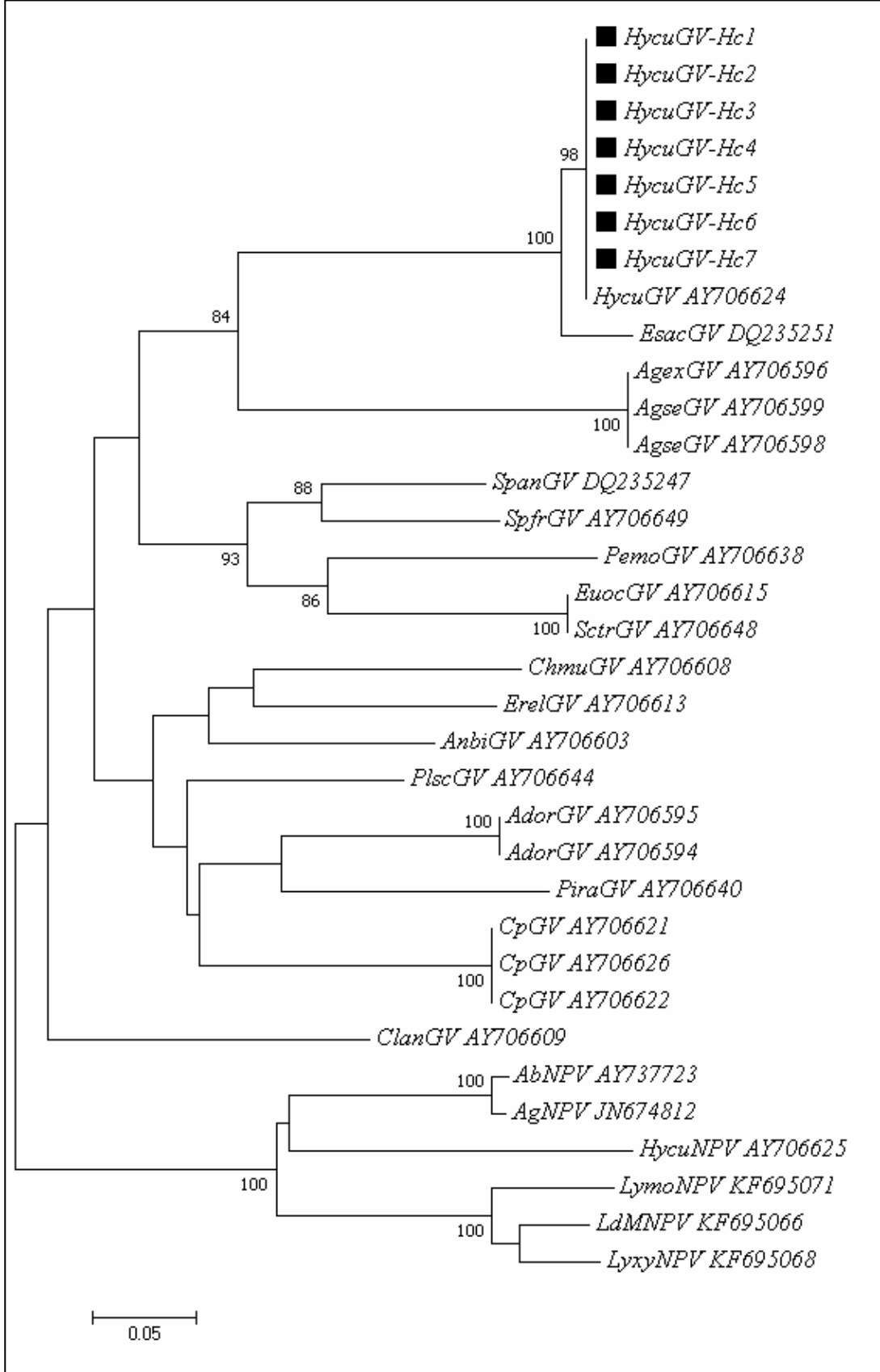
Şekil 19. HycuGV suşlarının PCR görüntüsü. A: *gran* gen bölgesine ait jel görüntüsü; B: *lef-8* gen bölgesine ait jel görüntüsü; C: *lef-9* gen bölgesine ait jel görüntüsü. M: 100 bp'lik markır. +: ManeNPV, -: negatif kontrol



Şekil 20. *HycuGV* suşlarının *gran* genine ait filogenetik analizi



Şekil 21. HycuGV suşlarının *lef-8* genine ait filogenetik analizi



Şekil 22. HycuGV suşlarının *lef-9* genine ait filogenetik analizi

Hc1-KX156845	GCAGACGTGGCGGTAAAAATTTTTTTGTGCCACAACACCACGTTACCTGACGTGAATTAC	60
A18-3-AY706559	-----GCCACGTTACCTGACGTGAATTAC	24
ChmuGV-AY706543	--AGTAGCGGGTAAAAAATTTTTCTTGTGCCACAACATTGTTTTACCCGATGTCGATTAT	58
PaliGV-AY519247	---GTAGCGGGCAAAGAGTTTTCTTGTGCCACAACATTGTTTTACCCGATGTCGATTAT	57
	***** ** ** *	
Hc1-KX156845	AAACATGTTAACGAGCTGTTTCACTTATTAATAAAATAAAAAATTTGTTATTTAACAAATAAA	120
A18-3-AY706559	AAACATGTTAACGAGCTGTTTCACTTATTAATAAAATAAAAAATTTGTTATTTAACAAATAAA	84
ChmuGV-AY706543	AAACGCGTCGCAGATTTGTTTAGACATCTCATAAATTCACGATTGTTATTTGATATAAAT	118
PaliGV-AY519247	AAACGCGTCGCAGATTTGTTCAAACACCTCATAGATTCAACAATTATTATTGAT-----	111
	**** * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Hc1-KX156845	ACCAACGATACCTGTGAAAATGCGACCAAGATTTAATTGTAATTCTGATCCGGCAGAA	180
A18-3-AY706559	ACCAACGATACCTGTGAAAATGCGACCAAGATTTAATTGTAATTCTGATCCGGCAGAA	144
ChmuGV-AY706543	TCTACAA-----AA	127
PaliGV-AY519247	TTTACAA-----AA	120
	* * * * *	
Hc1-KX156845	AAATCTTTTTTAAAAATTATAATTTGCACAATATCGAGCCCAAATTAACAAAAGAC	240
A18-3-AY706559	AAATCTTTTTTAAAAATTATAATTTGCACAATATCGAGCCCAAATTAACAAAAGAC	204
ChmuGV-AY706543	AAT---GAGTGCAGATAAAAGACCAAATAATTTGGAATAATACCAATAAACTC	184
PaliGV-AY519247	AAT---GAGTGCAGATGAAAGACCAAATAATTTGGAATAATACCAATAAACTC	177
	** * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Hc1-KX156845	CCGACCCGCAAGCTTTTAGTGTCTTTAACAAATAGGCCAACAATTTTGGTGCACCCAG	300
A18-3-AY706559	CCGACCCGCAAGCTTTTAGTGTCTTTAACAAATAGGCCAACAATTTTGGTGCACCCAG	264
ChmuGV-AY706543	GCACCTATAAACATGCTTTGCTTTTAACAATCGTCCGACTAAGTATTATTGCGATAAA	244
PaliGV-AY519247	GCACCTATGACCATGCTTTGCTTTCAACAATCGTCCGACTAATAATTATTGCGATAAG	237
	* * * * * * * * * * * * * * * * *	
Hc1-KX156845	TCGAATGTTTGCCGAATTTATTATTACGTTAAACGAAACATGTCCCGAGTTGAGGTTAAA	360
A18-3-AY706559	TCGAATGTTTGCCGAATTTATTATTACGTTAAACGAAACATGTCCCGAGTTGAGGTTAAA	324
ChmuGV-AY706543	AGTAATTTGTACGACATTTATTACATTTGAAAAGAAATCGTTCTCCGATCGAAATAAAA	304
PaliGV-AY519247	AGTAATTTGTATGACATTTATTACATTTGAAAAGAAATCGTTCTCCGATCGAAATAAAA	297
	*** * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Hc1-KX156845	ATGAATGACAACACATTATTTTTAAACCACCACGAAGGTATGATTATGTTGCGCAAAGTT	420
A18-3-AY706559	ATGAATGACAACACATTATTTTTAAACCACCACGAAGGTATGATTATGTTGCGCAAAGTT	384
ChmuGV-AY706543	GTGGCTAACAACATATTGTTTGTAAACCATCACGAAGGTATGGTAATGTTAAAAAAAGT	364
PaliGV-AY519247	ATGGCTCAACAATATTGTTTGTAAACCATCACGAAGGTATGGTATGTTAAAGAAATGT	357
	** * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Hc1-KX156845	GTGGAAATTGATAAAGAAATTAATAAACACACTTCAAACCTCCATTTGAGTATCATAAT	480
A18-3-AY706559	GTGGAAATTGATAAAGAAATTAATAAACACACTTCAAACCTCCATTTGAGTATCATAAT	444
ChmuGV-AY706543	GTTTGTATCAATAACGAAATACACATAAACACTTTGCAAACCTGCTTACGAATACCAACAAC	424
PaliGV-AY519247	GTTTGTATCAATAATGAGATACGCATAAACACTTTGCAAACCTGCTTACGAGTACCAACAAC	417
	** * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Hc1-KX156845	GAAAAAAGTGTGGTGAACATGTTGTGAGTTTTGGAATTTGCGACAAC-----GACGAC	534
A18-3-AY706559	GAAAAAAGTGTGGTGAACATGTTGTGAGTTTTGGAATTTGCGACAAC-----GACGAC	498
ChmuGV-AY706543	AAACATAGTGAATTAATAACGACACTGTTTTAAATTTTGAGGATAAATGGGTGAAAAC	484
PaliGV-AY519247	GAACACAGTATAATTAATAACGACAGTGTGTTGAAATTTGAGGATAAATGGGTGAAAAC	477
	** * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Hc1-KX156845	GACATTGTTTCACTTACGTCACCATGTTTCAAATTAACAAAAATTTATTTGCACATT	594
A18-3-AY706559	GACATTGTTTCACTTACGTCACCATGTTTCAAATTAACAAAAATTTATTTGCACATT	558
ChmuGV-AY706543	ACTACAGCCGCTTAAATGTCTACCATGATTTTGGAAATTAACAAGAATTTATTTGCATATC	544
PaliGV-AY519247	ACCACAGCCGCTTAAATGTCTACCATGATTTTGGAAATTAACAAGAATTTATTTGCATATC	537
	* * * * * * * * * * * * * * * * *	

Şekil 24. HycuGv-Hc1 izolatına ait *lef-8* DNA dizisi hizalaması

Şekil 24'ün devamı

Hc1-KX156845	TTTTATTCGATTCCCTTACCCAAGTTAATTGTGAGCCTGACTAATTTGAAAAACGGTATG	654
A18-3-AY706559	TTTTATTCGATTCCCTTACCCAAGTTAATTGTGAGCCTGACTAATTTGAAAAACGGTATG	618
ChmuGV-AY706543	TTTGACTCTATTCCTGTGGCAAACTCATAGTTAGTTTGACCAATTTAAAAAACGGCATG	604
PaliGV-AY519247	TTTGACTCTATTCCTGTGGCAAACTTATAGTTAGTTTGACCAATTTAAAAAACGGCATG	597
	*** ** *	
Hc1-KX156845	GTTGTTCAAACACCTTTAAAAATAAAATCTTTAGATTATTTACCTCTAGGCCTAGTCGTG	714
A18-3-AY706559	GTTGTTCAAACACCTTTAAAAATAAAATCTTTAGATTATTTACCTCTAGGCCTAGTCGTG	678
ChmuGV-AY706543	GTCGTCC TAAAAACAATT-----ATGAATTTTGCCTTGGGTAACAGTGTG	652
PaliGV-AY519247	GTCGTCC TAAAAACAATT-----ATGAATTTTGCCTTGGGTAACAGTGTG	645
	** * * * * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
Hc1-KX156845	ACCGTAAGTCCATCTATGATGTGCAACGACCGCATGTTTTATCTGTGGACTCTAGTCGCG	774
A18-3-AY706559	ACCGTAAGTCCATCTATGATGTGCAACGACCGCATGTTTTATCTGTGGACTCTAGTCGCG	738
ChmuGV-AY706543	GTGGTGCATGATTC AATATATTACACGATCGCCTTTTTGTTTATGGACAATCGTAATG	712
PaliGV-AY519247	GTGGTGCATGATTC AATATATTACACGATCGCCTTTTTGTTTATGGACAATCGTAATG	705
	* * * * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
Hc1-KX156845	GATAATAAAGTAAAAACGCGCCGAGGACCCTTACGTGCATGCCAAAAACCTTTTAAAAATTT	834
A18-3-AY706559	GATA-----	742
ChmuGV-AY706543	GACAATAAATTA AAA-----	727
PaliGV-AY519247	GACAATAAATTA AAGACA-----	723
	** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
Hc1-KX156845	TTT	837
A18-3-AY706559	---	742
ChmuGV-AY706543	---	727
PaliGV-AY519247	---	723



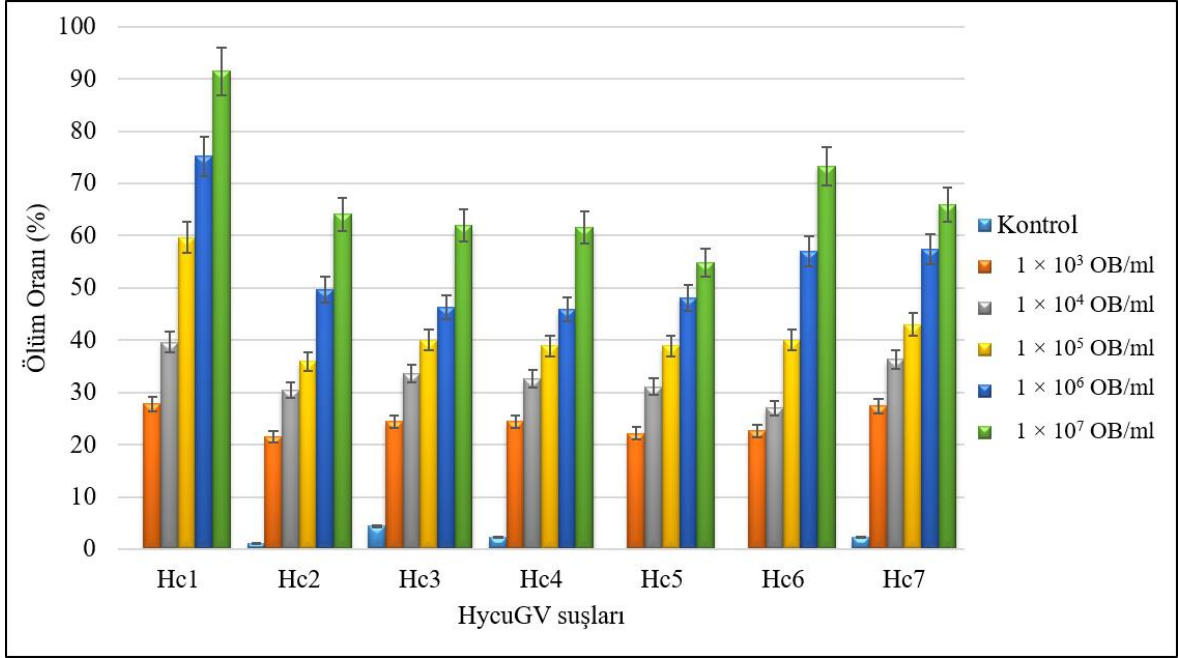
EsacGV-DQ235251	-----CAGTATTTATATTCACCTTTTTGAACACATCAAGTTTTTAC	42
Hc1-KX156846	AAGAATGGGTATGCGGGTCAAGTATTTGTATTCTACTTTTTAAACACATCAAGTTTTTAC	60
A5-1-AY706624	-----GTCAGTATTTGTATTCTACTTTTTAAACACATCAAGTTTTTAC	44
ChmuGV-AY706608	-----GACAATATTTGTATTCTACTTTTTAAACACACAGCAGTTTTTAT	44
PaliGV-AY519248	-----CAATATCTGTATTCACCTTTTTTAAATACAGCAGCTTTTTAT	42
	** * * * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
EsacGV-DQ235251	ACCAATGTTCAATGTATGAACGGTATAAACGAAATAGTGCCACCTCTTGTGCGGTCCAA	102
Hc1-KX156846	ACCAACGTTCAAGTGTATGAACGGTATAAACGAAATAGTGCCACCTCTTGTGCGGTCCAA	120
A5-1-AY706624	ACCAACGTTCAAGTGTATGAACGGTATAAACGAAATAGTGCCACCTCTTGTGCGGTCCAA	104
ChmuGV-AY706608	GCTAATGTGCAATGTTTTAATGGGATTAATGAAATAATACCACCAAAAATGAGCATTGAT	104
PaliGV-AY519248	GCCAATGTGCAATGTTTTAATGGTATTAATGAAATAATACCACCAAAAATGAGCATCGAC	102
	* * * * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
EsacGV-DQ235251	CGTACTATGGTCTGTGAGGACATGACCAATTGTGAGCGTGAACACACAGACACCCTAAT	162
Hc1-KX156846	CGTACTATGGTCTGTGAGGATATGACCAAGTGTGAGCGTGAACACACAGACATCCTAAC	180
A5-1-AY706624	CGTACTATGGTCTGTGAGGATATGACCAAGTGTGAGCGTGAACACACAGACATCCTAAC	164
ChmuGV-AY706608	CGATATTATGGCAGAAAAAGGTAAACAAATGTAAAGCGTGGAACACGCGACACCCAAAC	161
PaliGV-AY519248	CGATATTATGGCAGAAAAAGGTAAACAAATGTAAAGCGTGGAACACGCGACACCCAAAC	159
	** * * * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
EsacGV-DQ235251	ATTTGCAACTGTCCACACAATATTCGCGCGTGACTGTGAGCAACGACATACTTAATTGG	222
Hc1-KX156846	ATTTGCAACTGTCCACACAATATTCGCGCGTGACGGTGAGTAACGACATACTTAATTGG	240
A5-1-AY706624	ATTTGCAACTGTCCACACAATATTCGCGCGTGACGGTGAGTAACGACATACTTAATTGG	224
ChmuGV-AY706608	ATATCTCAGTTATCTACTCAATTTCAAATGTTTTACAAAATGACGATAGCGTTAATTGG	221
PaliGV-AY519248	ATATCTCAGTTATCCACTCAATTTCAAAGCGTTTACAAAATGACGACAGCGTAAATTGG	219
	** * * * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
EsacGV-DQ235251	AACGTGAAAGTGGGCTTGGGCACATTTGTGGGGCCAATCGC--	264
Hc1-KX156846	AACGTCAAAGTGGGCTTGGGCACATTTGTGCGTCATCGCATGCG	284
A5-1-AY706624	AACGTCAAAGTGGGCTTGGGCACATTTGTGGGGCCAATCGC--	266
ChmuGV-AY706608	AATGTTAAGGTAGGTTTGGGTACGTTTGTGGGGCCAACAGA--	263
PaliGV-AY519248	AATGTTAAGGTAGGTTTGGGTACGTTTGTGGGGCCAACAGA--	261
	** * * * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	

Şekil 25. HycuGv-Hc1 izolatına ait *lef-9* DNA dizisi hizalaması

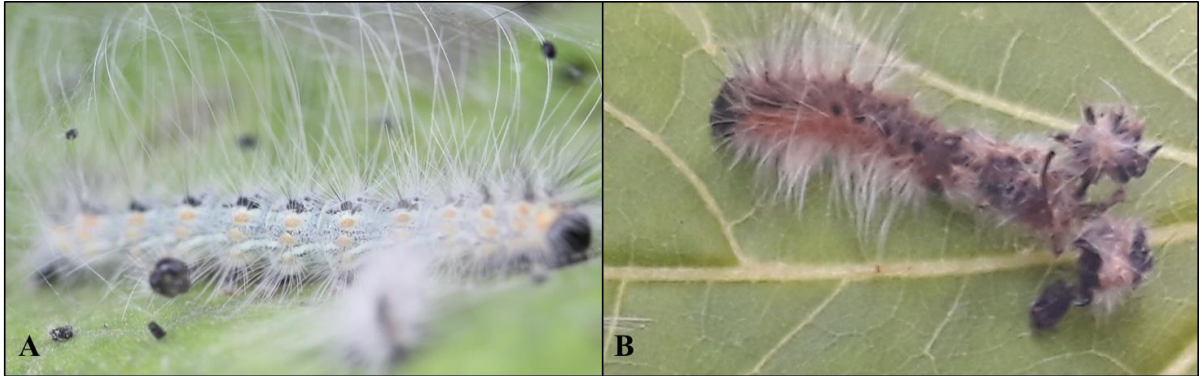
3.5. Viral Suşların İnsektisidal Aktivite Çalışmaları

3.5.1. Viral Suşların *H. cunea* Üzerindeki Doz Denemeleri

Viral suşların üçüncü evre *H. cunea* larvaları üzerindeki LC₅₀ değerlerini belirlemek için 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 OB/ml konsantrasyonlarda HycuGV-Hc1 – Hc7 suşları yüzey dozlama metoduyla (yaprak yedirme metodu) test edildi. Larvaların ölüm oranlarının artan virüs konsantrasyonu ile arttığı gözlemlendi (Şekil 26). Tüm konsantrasyonlarda ölüm oranlarının %21.5 – %91.5 aralığında olduğu belirlendi. En yüksek insektisidal aktivite ise HycuGV-Hc1 suşunun en yüksek konsantrasyonunda (1×10^7 OB/ml) %91.5 olarak tespit edildi. Diğer suşların en yüksek konsantrasyondaki ölüm oranları %73.3 (Hc6), %65.9 (Hc7), %64.1 (Hc2), %61.9 (Hc3) %61.5 (Hc4) ve %54.8 (Hc5) olarak kaydedildi. En düşük konsantrasyonda sağlanan en yüksek ölüm oranları Hc1’de %27.8, Hc7’de %27.4 iken diğer suşlarda %21.5 – 24.4 aralığında hesaplandı. Kontrol grubu larvaları için ölüm oranları %1.1 – %4.4 arasında kaydedildi. Canlı olan larvaların hepsinin pupaya girip yeni bireyler oluşturabildiği gözlemlendi. Deneysel sonucu enfekte olan *H. cunea* larvalarının turuncu-kahvemsiz renkte yumuşamış bir yapıda olduğu gözlemlendi (Şekil 27). Üç tekrarlı deneylerden elde edilen ortalama sonuçlar viral suşların LC₅₀ değerlerini hesaplamak için kullanıldı. HycuGV suşlarının (Hc1 – Hc7) 3. evre *H. cunea* larvalarındaki LC₅₀ analizleri sonucunda değerlerin 2.6×10^4 - 2.1×10^6 OB/ml arasında olduğu belirlendi (Tablo 9) (Şekil 28). Bu sonuçlar dikkate alındığında HycuGV-Hc1 (2.6×10^4 OB/ml) ve HycuGV-Hc6 (2.9×10^5 OB/ml) izolatlarının *H. cunea* üzerinde daha etkili olduğu ortaya koyuldu.



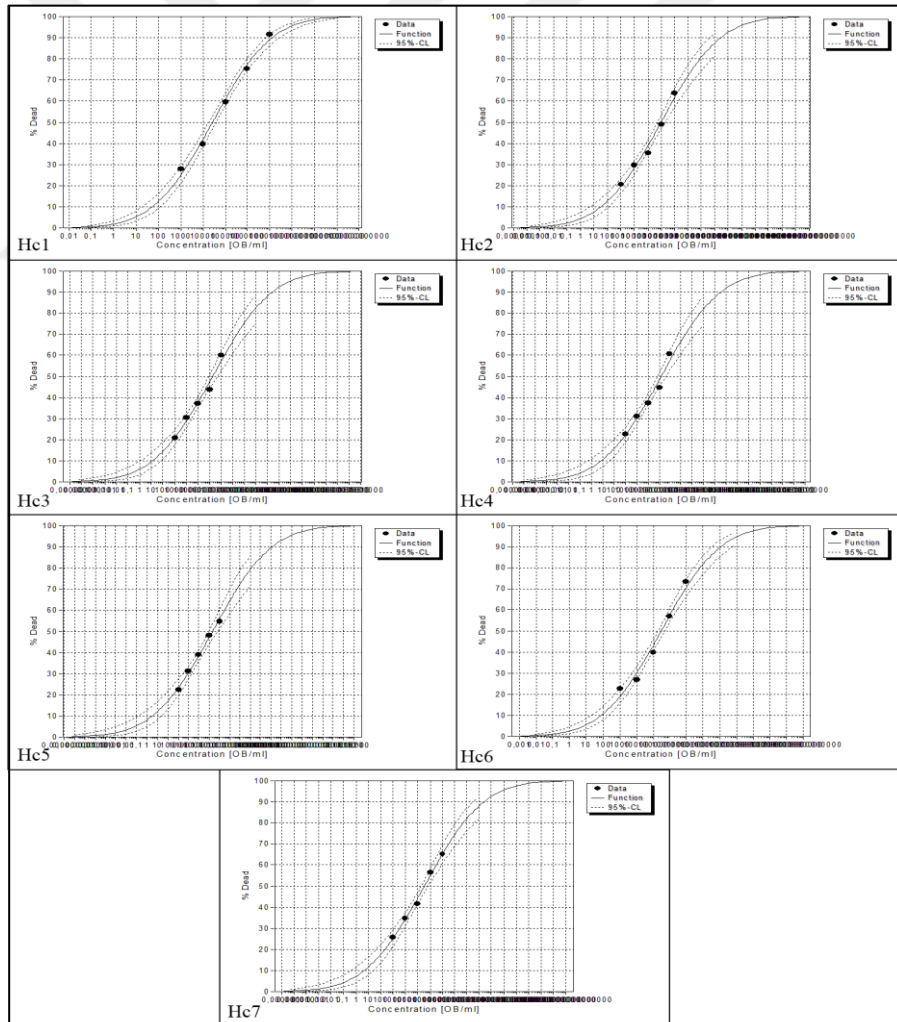
Şekil 26. HycuGV suşlarının üçüncü evre *H. cunea* larvaları üzerindeki ölüm oranları



Şekil 27. *H. cunea* larvası. A: Virüs inoküle edilmeyen sağlıklı *H. cunea* larvası (Kontrol grubu); B: HycuGV ile enfekte olan ölü *H. cunea* larvası (Test grubu)

Tablo 9. HycuGV suşlarının üçüncü evre *H. cunea* larvaları üzerindeki LC₅₀ değerleri ve istatistik analiz sonuçları

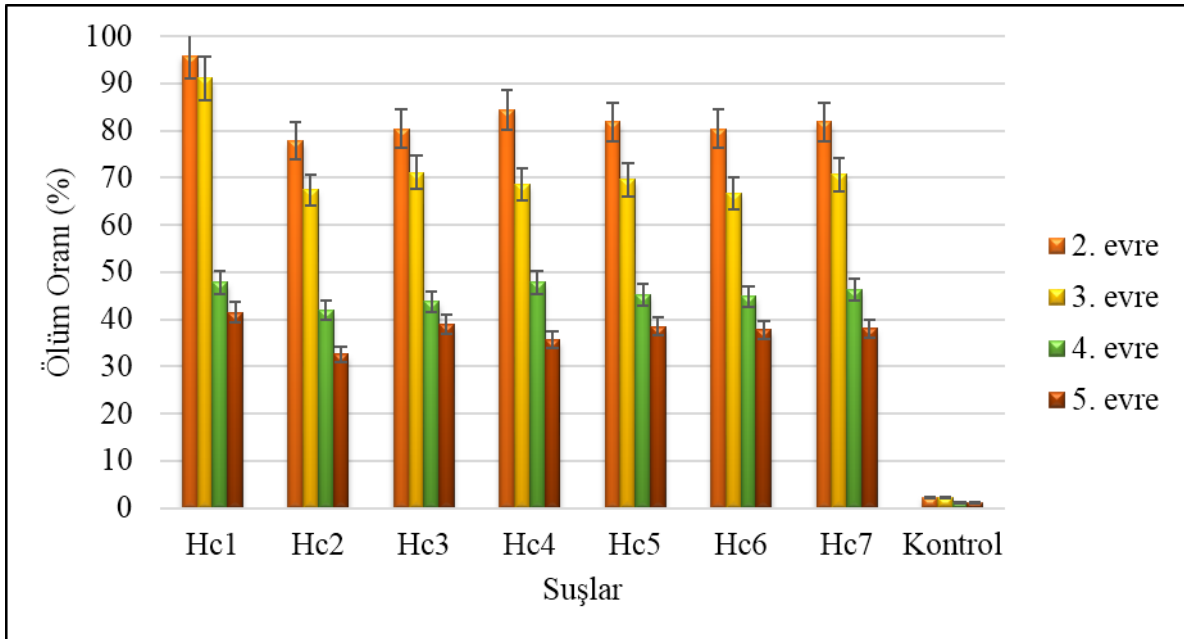
HycuGV suşları	LC ₅₀ (OB/ml)	%95 limit		Eğim	Chi ²	df
		Alt	Üst			
Hc1	$2,6 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	$3,7 \times 10^4$	0,47584	4,40419	3
Hc2	$9,7 \times 10^5$	$5,3 \times 10^5$	$2,05 \times 10^5$	0,28688	2,56640	3
Hc3	$1,7 \times 10^6$	$8,3 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$	0,24802	2,77130	3
Hc4	$1,5 \times 10^6$	$7,2 \times 10^5$	$4,1 \times 10^6$	0,24017	2,62359	3
Hc5	$2,1 \times 10^6$	$9,08 \times 10^5$	$6,6 \times 10^6$	0,22081	0,45846	3
Hc6	$2,9 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$4,8 \times 10^5$	0,35638	5,64132	3
Hc7	$3,4 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$6,7 \times 10^5$	0,26373	1,16229	3



Şekil 28. HycuGV suşlarının 14. gündeki ölüm etkisini gösteren konsantrasyon etki eğrileri

3.5.2. Viral Suşların *H. cunea*'nın Farklı Larval Evreleri Üzerindeki Denemeleri

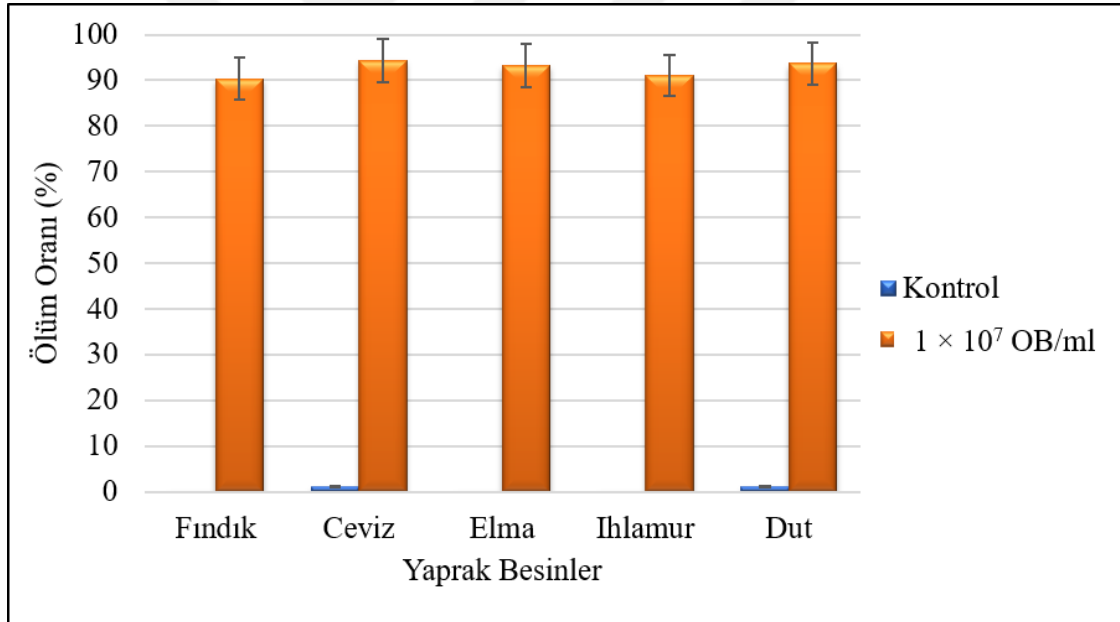
Dut yaprakları kullanılarak yapılan denemede, *H. cunea*'nın farklı evreleri üzerindeki viral suşların etkinliği belirlendi (Şekil 29). İkinci evre larvaların diğer evrelerdeki larvalara göre daha hassas olduğu gözlemlendi. Suşların en düşük etkiyi 5. evre larvalar üzerinde gösterdiği tespit edildi. Larval evre arttıkça virüse olan duyarlılığın azaldığı belirlendi. Dördüncü ve 5. evrelerin 2. ve 3. evrelere göre enfeksiyona daha dirençli olduğu kaydedildi. Genel duruma göre, HycuGV-Hc1 suşunun tüm evrelerde en yüksek etkiye sahip olduğu belirlendi. Bu suş düşük hassasiyete sahip olduğu belirlenen 5. evre larvalar üzerinde %41.5'lik bir ölüm oranıyla etkili oldu. Hc2, Hc3, Hc4 ve Hc5 suşlarının 2. evre larvalar üzerindeki etkileri sırasıyla %77.8, %80.4, %84.4, %81.9, %80.4 ve %81.9 olarak kaydedildi. En düşük etkinin Hc2 suşunda 4. evrede %41.9 ve 5. evrede %32.6 olduğu belirlendi. Denemelerde, 2. evre larvalara karşı suşlar arasında istatistiksel olarak farklılıkların olduğu belirlendi ($F = 223.682$; $df = 7,23$; $p < 0.05$). İkinci evre larvalar üzerinde etkili olan suşlar Hc1 (%95.9) ve Hc6 (%84.4) olarak kaydedildi. Sonuçlar değerlendirildiğinde *H. cunea* 2. ve 3. evrelerinin HycuGV izolatlarına karşı daha hassas olduğu belirlendi ($F = 272.113$; $df = 4,14$; $p < 0.05$).



Şekil 29. HycuGV suşlarının 2., 3., 4. ve 5. evre *H. cunea* larvaları üzerindeki ölüm oranları

3.5.3. Farklı Besinlerin İsektisidal Aktivite Üzerindeki Etkilerinin Tespit Edilmesi

Bu çalışmada farklı konukçu bitkilerle beslenen larvalar üzerinde virüsün etkinliğinde farklılıklar olup olmadığı araştırıldı. Bu hedef doğrultusunda, en yüksek öldürücü etkiye sahip HycuGV-Hc1 virüsünün *H. cunea* larvaları üzerinde farklı besinlerle beslenmenin etkilerini gözlemlmek için deney düzeneği kuruldu. Konukçusu olduğu bitkiler dikkate alındığında fındık, ceviz, elma, ıhlamur ve dut yaprakları tercih edildi. Bütün deney gruplarındaki ölüm oranlarının yaklaşık olarak birbirlerine yakın olduğu ve bu oranların %90.4 – %94.4 arasında değişti belirlendi (Şekil 30). Yapılan istatistiksel analizler sonucunda farklı besinlerle beslenen larvalardaki ölüm oranları arasında anlamlı derecede fark olmadığı tespit edildi ($F = 247.113$; $df = 5,17$; $p > 0.05$).

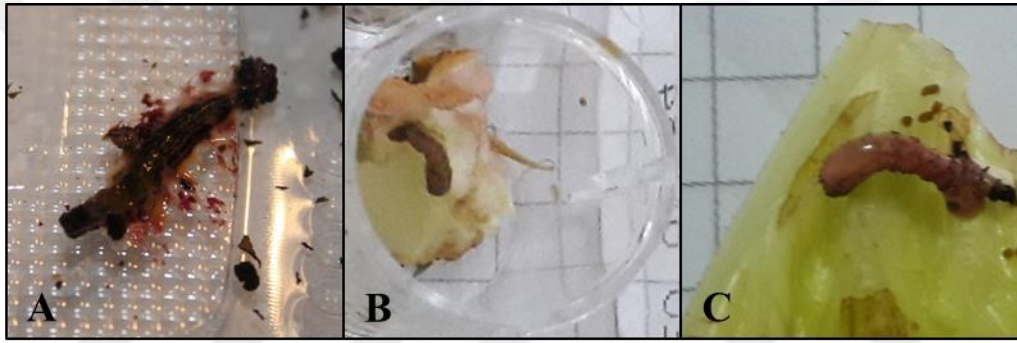


Şekil 30. Farklı besinlerin HycuGV-Hc1 suşunun enfeksiyonundaki etkisi

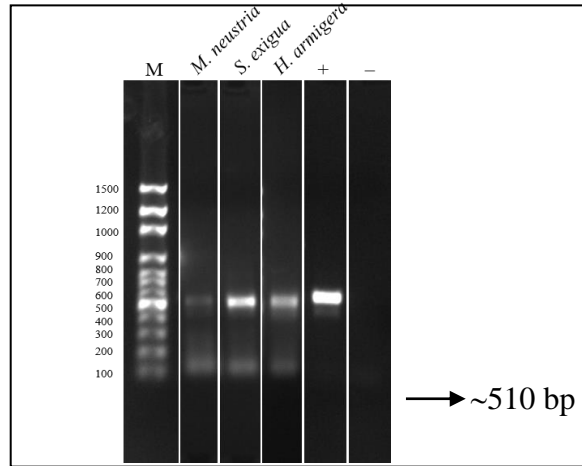
3.5.4. HycuGV-Hc1 Suşunun Konak Dağılımlarının Belirlenmesi

HycuGV-Hc1 suşunun konak hassasiyetini belirlemek için *Malacosoma neustria*, *Spodoptera exigua* ve *Helicoverpa armigera* 3. evre larvaları üzerindeki isektisidal etkileri araştırıldı. Yapılan çalışma sonucunda larval ölümler morfolojik ve moleküler olarak incelendiğinde ölü larvaların yumuşamış vücut dokuları ve arka ayaklarından

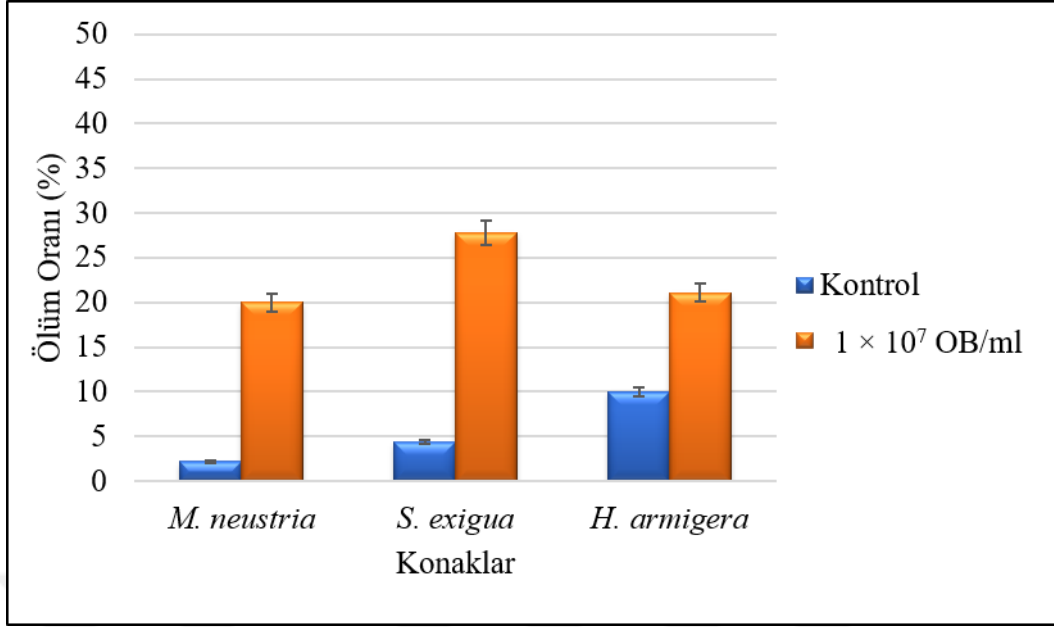
asılma gibi viral enfeksiyon belirtileri gösterdiği tespit edildi (Şekil 31). Ölü larvalardan *polh/gran* primerleri kullanılarak yapılan PCR örneklerinin agaroz jel görüntüsünde granülin gen bölgesinin çoğaldığı tespit edildi (Şekil 32). Ölen larvalardan alınan örnekler mikroskop altında incelendiğinde siyah nokta şeklinde GV'lerin varlığı gözlemlendi. Viral enfeksiyon belirtisi gösteren larvalar dikkate alınarak yapılan istatistiksel analiz sonucunda ölüm oranlarının %20 – %27.8 arasında olduğu belirlendi (Şekil 33). Ölüm oranları *M. neustria* üzerinde %20 ($F = 26.767$; $df = 1,5$; $p < 0.05$), *S. exigua* ve *H. armigera* üzerinde ise sırasıyla %27.8 ($F = 145.518$; $df = 1,5$; $p < 0.05$) ve %21.1 ($F = 13.490$; $df = 1,5$; $p < 0.05$) olarak tespit edildi.



Şekil 31. HycuGV-Hc1 izolatu ile enfekte edilen konaklar. *M. neustria* (A), *S. exigua* (B) ve *H. armigera* (C) larvaları



Şekil 32. HycuGV-Hc1 suşu ile enfekte *M. neustria*, *S. exigua* ve *H. armigera* larvalarından çoğaltılan granulin geninin PCR sonucu. M: 100 bp'lik markır, +: ManeNPV DNA'sı (pozitif kontrol), -: negatif kontrol

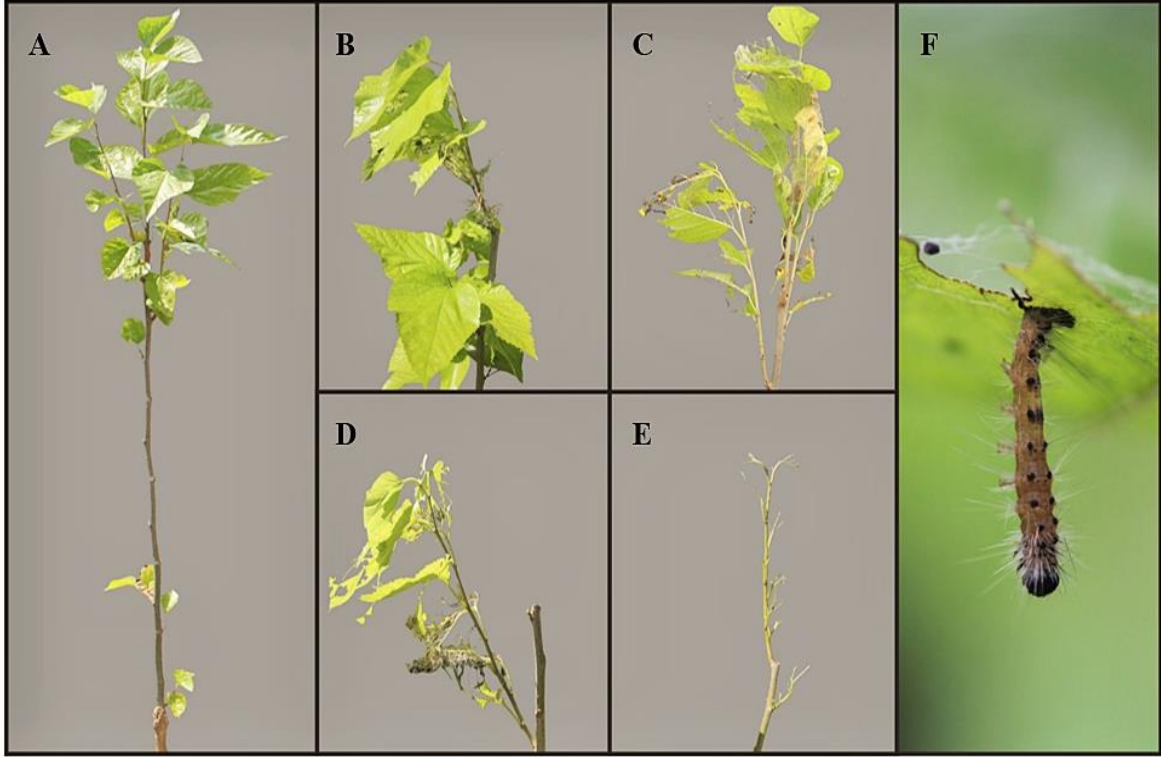


Şekil 33. HycuGV-Hc1 suşunun *M. neustria*, *S. exigua* ve *H. armigera* larvaları üzerindeki insektisidal aktivitesi

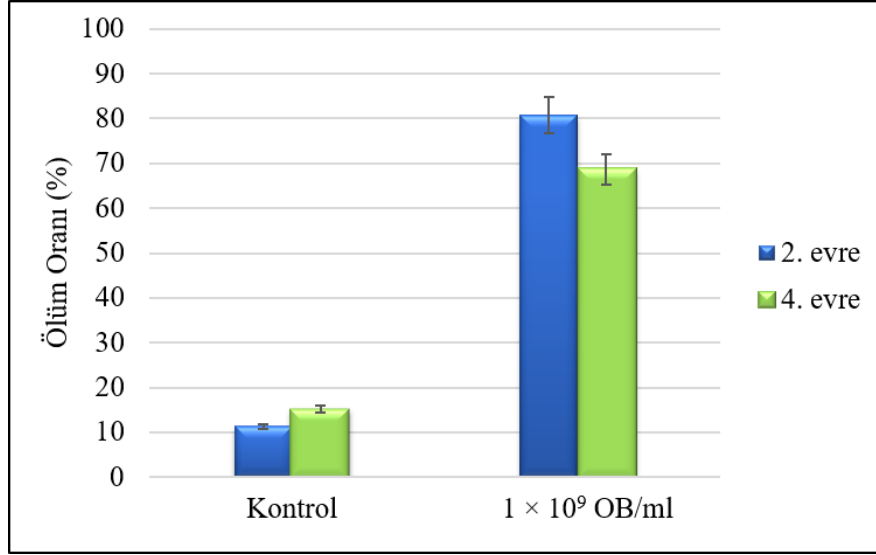
3.5.5. HycuGV-Hc1 Suşunun Alanda Saksı Denemeleri

Laboratuvar çalışmaları sonucunda elde edilen sonuçların ileri bir uygulama için desteklenmesi amacıyla sera koşullarında saksı denemeleri yapılması hedeflendi. Bu hedef doğrultusunda 2. evre ve 4. evre *H. cunea* larvaları HycuGV-Hc1 bulaştırılmış ve bulaştırılmamış dut fideleri üzerine bırakıldı. Yapılan deneyler sonucunda virüs uygulanan fidelerle virüs uygulanmayan kontrol fideleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar gözlemlendi (Şekil 34). Her iki evre denemelerinde de HycuGV-Hc1 ile muamele edilen yapraklardaki yiyintilerin (Şekil 34B ve D) kontrol grubu yapraklarındakinden daha az olduğu görüldü (Şekil 34 C ve E). İkinci evre larva denemelerinde virüs uygulanan grubun daha az bir zarar oluşturduğu tespit edildi (Şekil 34B ve C). Öyle ki Şekil 34B'deki bitki Şekil 33A'daki normal bitkiden ayırt edilemez halde görülmektedir. Beklenildiği gibi dördüncü evre larvalar ikinci evre larvalara göre bitkiye daha fazla zarar verdi (Şekil 34D). Bunun yanında virüs uygulanmayan kontrol grubundaki bitkilerin yaprakları dördüncü evre larvalar tarafından tamamen tüketildi (Şekil 34E). Çalışmada kullanılan larvaların enfeksiyon sonrasında bakülovirüsler için karakteristik ölüm şeklini gösterdiği tespit edildi (Şekil 34F). Uygulama sonrasında 7. günde toplanan canlı larvalar ölünceye ya da pupa oluncaya kadar takip edildi ve 14. güne göre ölüm oranları hesaplandı (Şekil 35). İstatistiksel analizler sonucunda 2. ve 4. evre *H. cunea* larvalarının ölüm oranları kontrol

grubundaki ölüm oranlarından önemli derecede farklı olarak belirlendi ($F = 1441.32$; $df = 3, 35$; $p < 0.05$). Ayrıca, evreler arasındaki larval ölüm oranları karşılaştırıldığında 4. evrelerin (%68.7) ($F = 412.219$; $df = 1,5$; $p < 0.05$) 2. evrelerden (%80.7) ($F = 45.420$; $df = 1,5$; $p < 0.05$) daha düşük olduğu belirlendi.



Şekil 34. HycuGV-Hc1 suşu uygulanan dut fidelerinde *H. cunea* larvalarının 7. gündeki etkisi. A: uygulama öncesinde dut fidesi; B: virüs bulaştırılmış (test grubu) dut fidesindeki 2. evre larvaların yaprak yiyinti görüntüsü; C: virüs bulaştırılmamış (kontrol grubu) dut fidesindeki 2. evre larvaların yaprak yiyinti görüntüsü; D: virüs bulaştırılmış (test grubu) dut fidesindeki 4. evre larvaların yaprak yiyinti görüntüsü; E: virüs bulaştırılmamış (kontrol grubu) dut fidesindeki 4. evre larvaların yaprak yiyinti görüntüsü; F: HycuGV-Hc1 ile enfekte olmuş baş aşağı dut yaprağından asılan *H. cunea* ölü larvası



Şekil 35. Saksı denemelerinde HycuGV-Hc1 suşunun *H. cunea* larvaları üzerindeki ölüm etkisi

4. TARTIŞMA

Günümüzde tarım ve ormancılıkta büyük zararlara sebep olan böceklerle mücadelede, çevre ve insanlar üzerinde kimyasal sentetiklerin olumsuz etkilerinden dolayı, sentetik kimyasallar yerine biyolojik mücadele etmenlerinin kullanımı artmaktadır. Bu etmenler arasında en yaygın olanları entomopatojen organizmalardır. Bunlar; virüsler, bakteriler, protozoonlar, funguslar ve nematodlardır. Bu organizmalar arasında böcek patojeni olarak etkinliğinin yüksek olduğu bilinen bakülovirüslerin kullanımını araştıran çalışmalar biyolojik mücadele alanındaki eksikliklerin giderilmesi için önem oluşturmaktadır.

Amerikan beyaz kelebeği (*H. cunea*, Drury, Lepidoptera: Arctiidae) bütün dünyada olduğu gibi ülkemiz için de çok önemli tarım ve orman zararlılarından biridir. Bu kadar önemli bir zararlı olmasına rağmen, ülkemizde zararlının viral patojenleri hakkında ayrıntılı bir çalışma günümüze kadar yapılmamıştır. Yapılan literatür araştırması sonucunda bu zararlıda virüs tespitine yönelik çalışmalara çok eski yıllara ait kayıtlarda rastlanmaktadır.

Bu tez çalışmasında 2014-2017 yılları arasında yapılan arazi çalışmaları sırasında tespit edilen, Lepidoptera takımına ait önemli bir zararlı olan Amerikan beyaz kelebeği (*H. cunea*)'nde hastalık oluşturan *Hyphantria cunea* granülovirüs (HycuGV)'un izolasyonu, morfolojik ve moleküler karakterizasyonu ve insektisidal aktivite çalışmaları yapıldı.

Bu çalışmada bakülovirüs varlığını belirlemek amacıyla makroskobik olarak viral enfeksiyon olduğu düşünülen örneklerden bakülovirüslere spesifik gen bölgelerini çoğaltan primerlerle yapılan PCR sonuçlarına göre 7 tane *H. cunea* granülovirüs tespit edildi. Virüs enfeksiyonlarının belirlenmesinde birçok yöntem kullanılmaktadır (Liu vd., 2011). Bunlar arasında yaygın olarak kullanılanlar arasında elektron mikroskobu ve PCR yöntemleri bulunmaktadır (Goldsmith ve Miller, 2009; Kuzio vd., 1999).

Bu çalışmada araziden toplanarak laboratuvara getirilen larvaların yetiştirilme sürecinde ölümlerin olduğu gözlemlendi. Bu ölümlerin viral enfeksiyonlardan kaynaklandığı belirlendi. Alanda böcek popülasyonu salgınları sırasında bakülovirüs enfeksiyonları meydana gelmekte ve bu durum orman ekosistemlerinde sıklıkla gözlemlenebilmektedir (Adams ve McClintock, 1991; Cooper vd., 2003; Il'inykh vd., 2004). Bu salgınlar böcek popülasyonunun baskılanması için önemlidir (Fuxa, 1993; Cory ve Myers, 2003).

Laboratuvarda böceğin yetiştirilirken streslenmesi, gizli bir bakülovirüs enfeksiyonunu ortaya çıkartarak öldürücü olmasını tetikleyebilir (Il'inykh ve Ul'yanova, 2005).

Bu çalışmada toplanan ölü larvalarda az çok şişkinleşme ve turuncu-kahverengi renklenme gibi viral semptomlar gözlemlendi. Ağır hastalıklı larvalardaki vücut sıvısının akışkan ve açık renkli hal aldığı tespit edildi. Bu sıvı içerisinde yoğun bir şekilde kapsüllerin var olduğu belirlendi. Laboratuvara getirildikten sonra gözlemlenen canlı larvalar arasında viral enfeksiyon olanların beslenmelerinde azalma, hareketlerinde yavaşlama olduğu ve bazı larvaların ise gömlek değiştiremediği ya da gömlek değiştirme sonrasında morfolojik olarak sağlıklı görüntüye sahip olduğu ve öldüğü gözlemlendi. Gözlemlenen semptomlar Watanabe ve Kobayashi (1970)'nin yaptığı çalışmada *H. cunea* üzerindeki granulo virüs semptomlarına benzerdir. Bakülovirüs eksternal semptomları araştırıldığında, alfa- ya da beta- bakülovirüsler tarafından enfekte edilen larvalarda renk değişikliği (beyaz, kahve ve sarı), kusma ve beslenme isteksizliği olduğu bilinir. Enfekte larva uyusuk halde yavaş hareket eder ya da tamamen hareketsiz kalır. Öldükten sonra böcek örtüsü kolayca yırtılır ve sıvılaşmış vücut içeriği salınır (Eberle vd., 2012). Bakülovirüs genomlarında bulunan kitinaz ve katepsin gen ürünlerinin enfeksiyon belirtisi olan kutikular incelmeye neden olduğu söylenebilir. Böcek kutikulasının esas olarak kitinden oluşması bu tabakanın parçalanmasında gerek proteaz ve gerekse de kitinazların birlikte bir kombinasyonlarını gerektirmektedir (Samuels ve Paterson, 1995). Kitinaz ve katepsin genlerinin, böcek vücudunda enfeksiyonun arttırılması amacıyla peritrofik membranın aşındırılması ve bozulmasında; böylece, konukçunun erimesinde role sahip olduğu düşünülmektedir (Hawtin vd., 1997; Ishimwe, vd., 2015; Ardisson-Araujo, vd., 2018). Bu genlerin konukçu vücudunun eritilmesini hızlandırdığı rapor edilmiştir (Luque vd., 2001).

Bu çalışmada saflaştırılan granulo virüs izolatları faz-kontrast ve karanlık-alan mikroskopunda incelendi ve gömülü yapılar yoğun bir şekilde ayırt edildi. Faz-kontrast, karanlık alan ve parlak-alan mikroskopları ile ışık mikroskobu kullanımı virüs grupları arasındaki farklılıkları ortaya koyduğundan çok önemlidir (Eberle vd., 2012). Granulo virüsler gömülü yapıya sahip olmalarına rağmen, küçük boyutlara sahip olduklarından, ışık mikroskopunda tespit edilmeleri oldukça zordur ve deneyim gerektirir (Hunter-Fujita vd., 1998). Watanabe ve Kobayashi (1970) *H. cunea* granulo virüs'un ışık mikroskobu histopatoloji çalışmalarında yağ doku preparatlarını incelemiş ve hücre yapısına bakarak viral enfeksiyon belirtilerini kaydetmiştir.

Işık mikroskopunda gözlemlenmesi zor olan GV'ler veya gözlemlenemeyen gömülü olmayan küçük virüsler elektron mikroskopunda kolaylıkla gözlemlenebilmektedir (Evans ve Shapiro, 1997). Bu çalışmada taramalı ve transmisyon elektron mikroskobu incelemelerinde viral izolatların eliptik-oval şekilli oldukları tespit edildi. Transmisyon elektron mikroskobu sonuçları bu viral izolatların gömülü yapı büyüklüklerinin ortalama olarak $318-546 \text{ nm} \times 174-240 \text{ nm}$, her granülün tek çubuk şeklinde $35-51 \text{ nm} \times 202-341 \text{ nm}$ büyüklüğünde viriona sahip olduğu belirlendi. Bu sonuçlar, GV'lerin gömülü yapılarının eliptik şekilli ve $119-350 \text{ nm} \times 300-511 \text{ nm}$ boyut aralığında olduğu önceki çalışmalarda kaydedilen verilerle uyumludur (Crook, 1991; Eberle vd., 2012). Bu çalışmadaki mikroskobik incelemeler sonucunda HycuGV izolatlarının tipik bir GV'nin karakteristik boyutuna, şekline ve morfolojine uygun olduğu belirlendi. Watanabe ve Kobayashi (1970) tarafından yapılan çalışmada HycuGV granülünün ortalama boyutları $220-340 \text{ nm} \times 430-600 \text{ nm}$ olarak kaydedilmiş. Ayrıca, virion boyutları $50-60 \text{ nm} \times 280-350 \text{ nm}$ olarak belirlenmiştir. Hukuhara vd. (1969)'nin yaptığı çalışmada HycuGV granüllerinin $50-65 \times 300-350 \text{ nm}$ boyutunda olduğu tespit edilmiştir. Virüs yapılarının yağ dokuda yoğun olarak bulunduğu gözlemlenmiştir. Literatürdeki bu verilerle bu çalışmada izole edilen HycuGV izolatları karşılaştırıldığında boyutlarının daha küçük olduğu belirlendi. Bu farklılığın oluşmasında birçok faktör etkili olabilir. Bunlardan biri enfeksiyon sırasında konak hücrelerin çevresel ve fiziksel koşullarıyla ilgilidir (Kioukia vd., 1995). Bu tez çalışmasında tanımlanan HycuGV'nin tek bir virion ihtiva etmesi granulovirüslerin genel tanımlamasıyla benzerdir (Huger, 1963; Ackermann ve Smirnof, 1983).

Bu çalışmada HycuGV izolatlarının *EcoRI* ve *HindIII* REN profilleri çıkarıldı. Bu enzim kesim profillerinde *EcoRI* enzimi ile yapılan kesim reaksiyonu sonucunda 14 bant oluşurken *HindIII* ile yapılan kesimde 13 bant oluştuğu gözlemlendi. İzolatların REN profilleri karşılaştırıldığında aralarında fark olmadığı gözlemlendi. Bu kesim profillerinin markırlar yardımıyla hesaplamaları sonucunda her iki enzim için de hesaplanan genom boyutunun ortalama 112 kbp olduğu belirlendi. Aynı familyaya mensup virüslerin ayırt edici morfolojik ve immünolojik özelliklerinin daha düşük hassasiyete sahip olması nedeniyle genotipik özelliklere dayalı analitik yöntemler virüs tanımlanmasında tür ve suş seviyesi açısından en güçlü metot haline gelmiştir. Çift zincir DNA genomuna sahip omurgasız virüsleri için agaroz jel elektroforezi ile REN kesim kombinasyonu virüs izolatlarının ayırt edilmesinde, güvenilir ve hızlı bir şekilde tanımlanmasında seçilen bir metottur (Eberle

vd., 2012). REN analizleri bakülovirüs varyantlarını belirlemek ve virüs suşlarını tanımlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Goto vd., 1992). REN profillerinde çoğu fragmentlerin boyutları doğru bir şekilde hesaplanmasına rağmen, yine de çok küçük fragmentlerin gözden kaçması, büyük parçaların boyutunun kesin olarak tahmin edilmesinde zorluk olması ve aynı hizada giden bantların yorumlanmasındaki zorluklar nedeniyle toplam genom boyutunun tahmininde hatalar ortaya çıkabilir. Granulovirüslerin restriksiyon analizlerini içeren birçok çalışmada *EcoRI* enziminin 12-27 arasında fragment verdiği belirtilmiştir (Crook, 1991). Literatürdeki çalışmalarda GV genom boyutu 90-180 kbp aralığında kaydedilmiştir (Martignoni ve Iwai, 1981; Murphy vd., 1995). Örneğin *Cydia pomonella* GV 125.6 kbp (Crook vd., 1997) veya 114 kbp (Harvey ve Volkman, 1983) gibi çeşitli boyutlarda hesaplanmıştır. Diğer GV genomları, 119 kbp *Phthorimaea operculella* GV (Jukes vd., 2016), 108 kbp *Pieris rapae* GV (Wen vd., 2007), 99 kbp *Adoxophyes orana* GV (Wormleaton vd., 2003) ve 89 kbp AdorGV (Li ve Benz, 1994), 179 kbp *Xestia c-nigrum* GV (Goto vd., 1992; Hayakawa vd., 1999), 169 kbp *Helicoverpa armigera* GV (Harrison ve Popham, 2008), 100 kbp *Plutella xylostella* GV (Hashimoto vd., 2000), 101 kbp *Clostewra anachoreta* GV (Liang vd., 2011) ve 140 kbp *Spodoptera frgiperda* GV (Cuartas vd., 2015) gibi boyutlarla çeşitlilik göstermektedir. Genom boyutunu tahmin etmek için iki farklı restriksiyon enzimi kullandığımız için hataların olasılığı azaldı ve tahminimizdeki güveni arttı. Literatür araştırmasında HycuGV'nin genomuna ait REN profilleri ile ilgili çalışmaya rastlanmadı. Choi vd. (2012)'nin yapmış olduğu bir çalışmada Kore'de izole ettikleri HycuGV genomunun komple genom sekansını ve genomik analizini gerçekleştirdiler. Yapılan bu çalışmayla ilgili poster özeti dışında herhangi bir veriye rastlamamakla birlikte, araştırmacılar HycuGV genomunun 114557 bp büyüklüğünde olduğunu tespit ettiler. Choi vd. (2012)'nin tespit ettikleri genom boyutuyla bu çalışmadaki genom boyutu arasında 2 kbp'lik bir fark olduğu görüldü. Bu farkın kullanılan metotlardan ve farklı coğrafyalardan izole edilmelerinden kaynaklı olduğu tahmin edildi. Bu araştırmacılar yaptıkları çalışma sonucunda, HycuGV'nin *Xestia c-nigrum* GV ile yakından ilişkili olduğunu fakat oldukça farklı bir genomik organizasyona sahip bir beta-bakülovirüs olduğunu belirtmiştir. Bu sonuç HycuGV'nin genomu noktasında birçok bilinmeyen olduğunu göstermektedir.

REN analizinin sınırlılıklarını gidermek için korunmuş gen parçalarının PCR ile çoğaltılmasını takiben dizileme ve bu parçaların filogenetik analizlerinin virüs tanımlanmasında son derece verimli ve faydalı olduğu kanıtlanmıştır (Lange vd., 2004;

Herniou vd., 2004; Jehle vd., 2006). Şu ana kadar dizilenen tüm bakülovirüs genomları 30 korunmuş geni paylaşmaktadır. Lepitopterlere spesifik bakülovirüslerin en korunmuş genlerinden biri granülin genidir ve ayrıca, filogenetik çalışmalarda kullanılan ilk bakülovirüs genidir (Rohrmann, 1986). *Lef-8* ve *lef-9* tüm komple sekanslanan bakülovirüs genomlarında tanımlanmış ve bakülovirüs filogenisini incelemek için uygun oldukları gösterilmiştir (Herniou vd., 2001, 2004; Lange vd., 2004).

Bu çalışmada HycuGV izolatlarının hem genomu hakkında daha fazla bilgi edinmek için hem de diğer bakülovirüslerle genetik ilişkilerini belirlemek için *granülin*, *lef-8* ve *lef-9* genleri çoğaltıldı ve dizi analizleri yapıldı. Bu üç gen bölgesine ait filogenetik ağaçlar oluşturuldu. HycuGV izolatlarının Rusya izolatları olan A5-1 (*gran* ve *lef-9*) ve A18-3 (*lef-8*) ile yakın ilişkili olduğu tespit edildi (Jehle vd., 2006). *Gran* ve *lef-9* genlerine ait filogenetik analizde HycuGV'lerin *Estigmene acrea* GV (*polihedrin* geni / DQ235250 ve *lef-9* geni / DQ235251) ile yakın dallanma gösterdiği belirlendi (Jehle vd., 2006). *E. acrea*, *H. cunea* gibi Arctiidae familyasına ait bir türdür. Choi vd. (2012) tarafından rapor edilen HycuGV izolatı için GenBank'da hiçbir gen dizisi olmadığından, bu izolat filogenetik analizde kullanılmadı.

Bu tez çalışmasında HycuGV izolatlarının morfolojik ve moleküler tanımlamaları gerçekleştirildikten sonra tespit edilen bu virüsün insektisidal aktivite çalışmaları yapıldı. İnsektisidal aktivite çalışmaları doz-ölüm ilişkilerini, virüsün farklı evreler üzerindeki etkisini, virüsün farklı konukçularla beslenen *H. cunea* larvaları üzerindeki aktivitesini, HycuGV'nin konak dağılımı ve alanda saksı denemelerini kapsamaktadır.

Doz-ölüm ilişkileri denemelerinde virüsün alanda uygulanabilir hale getirilmesini sağlayacak verilerin elde edilmesi için yüzey dozlama metodu tercih edildi. Denemelerde kullanılan bu metot larvaların beslenme davranışlarını taklit eden bir tekniktir. Besin materyalleri ile virüs yapılarının larva tarafından başarılı bir şekilde alınması sağlanır (Muthamia vd., 2011). Bu yöntemde zararlıların konukçusu olduğu bitkilerin yaprakları kullanıldı ve yapay besin kullanımına göre doğal koşullara daha yakın koşullar oluşturuldu.

Doz-ölüm ilişkileri denemelerinde izole edilen HycuGV izolatlarının (Hc1-Hc7) test sonuçları değerlendirildiğinde, her izolat için dozlar arasındaki ölüm oranlarındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Her doz için izolatların ölüm oranlarına bakıldığında Hc1 izolatının yüksek etki gösterdiği tespit edildi ve diğer izolatların ölüm oranları ise birbirine yakın olarak hesaplandı. Genel olarak doz artışına bağlı olarak ölüm oranlarında da artış olduğu tespit edildi. Doz ve ölüm oranı arasındaki bu ilişki birçok

araştırmacı tarafından da rapor edilmiştir (Bird, 1969; Boucias ve Nordin, 1977; Boucias ve Nordin, 1978; Cunningham vd., 1991,1993; Sait vd., 1994, Evans, 1981; Dezianian vd., 2010; Abdulkadir, 2014). Bu tespit bütün orjinal konukçu-virüs etkileşimleri ve çapraz enfeksiyon çalışmaları için doğru kabul edilmiştir (Bucher ve Turnock, 1983; Cunningham vd., 1993; Goulson ve Cory, 1995; Scheepens ve Wysoki, 1989). Ayrıca bu gözlem için en muhtemel açıklama, virüs dozu arttıkça daha fazla larval hücrenin enfekte olması ve larvayı öldüren sistemik bir enfeksiyonu başlatan daha fazla virüsün üretilmesidir (Rohrmann, 2013).

Boucias ve Nordin (1977) tarafından yapılan çalışmada HycuGV'nin 2. evre ($10^4 - 10^9$ kapsül/larva), 4. ve 5. evre ($5.2 \times 10^4 - 10^9$ kapsül/larva) larvalar üzerindeki etkinliği araştırılmıştır. Bu tez çalışmasındaki HycuGV izolatları en yüksek dozda (10^7 OB/ml) %91,5-54,8 arasında ölüm oranına sahipken, 1977'deki çalışmada aynı dozdaki virüsün 2. evre üzerindeki etkisi %100 olarak hesaplanmıştır. Diğer dozlardaki ölüm oranları ise sırasıyla 10^6 OB/ml'de %75,2-55,9'e karşı %85, 10^5 OB/ml'de %59,6-35,9'ya karşı %52 ve 10^4 OB/ml'de %39,6-27'e karşı %29 olarak karşılaştırıldığında birbirlerine yakın değerlere sahip olduğu görüldü. Literatürdeki çalışma verilerine göre farklılıkların olmasının birkaç nedeni olabilir. Bu nedenlerden biri uygulanan yöntemdir. Birçok bakülovirüs denemesinde aynı virüsün aynı konak üzerindeki LC ya da LD değerleri arasında kullanılan metoda göre farklılıklar olduğu ortaya konmuştur. Örneğin, Abdulkadir (2014), *Plutella xylostella* GV (PlxyGV) ile yaprak yedirme metodu kullanarak yaptığı uygulamada LC_{50} değerini 3.56×10^5 OB/ml olarak hesaplamıştır. Bu değer Kadir vd. (1999)'nin LC_{50} değerinden daha düşüktür (3.82×10^5 OB/ml – 3.42×10^6 OB/ml). Bu farklılığın sebebinin Kadir vd. (1999)'nin çalışmada damla besleme yöntemini kullanmaları şeklinde açıklanabilmektedir. Bu tez çalışmasında yüzey dozlama ile yaprak besin kullanılırken, Boucias ve Nordin (1977) çalışmalarında hazır besin kullanmıştır. Yine aynı çalışmada 2. evrelerde toplu uygulama yapılırken, 4.ve 5. evrelerde bireysel uygulama yapılmıştır. Ayrıca, LC_{50} değerlerinin testlerde kullanılan larval evrelere göre değiştiği bilinen bir gerçektir (Dezianian vd., 2010). Çalışmadaki 2. evre larvaların LD_{50} değerlerine bakıldığında 7.06×10^4 OB/larva olduğu hesaplanmıştır (Boucias ve Nordin, 1977). Bu tez çalışmasında ise LC_{50} değerleri hesaplandı ve $2.6 \times 10^4 - 2.1 \times 10^6$ OB/ml arasında olduğu belirlendi. Bir diğer çalışmada ise Boucias ve Nordin (1978) HycuGV'nin *H. cunea* 3. evre üzerindeki denemelerinde $4.7 \times 10^6 - 10^9$ kapsül/larva dozlarını uyguladı ve ölüm oranlarını %44 - %100 olarak hesapladı. Türkiye suşları ile 10^6 OB/ml dozları karşılaştırıldığında

%75,2'e karşı 4.7×10^6 kapsül/larva dozda %44 ölüm oranı hesaplanırken, 10^7 OB/ml'de %91,5'ye karşı %75 ölüm oranı hesaplandı. Bu karşılaştırmada 1978'deki çalışmada doz 4,7 kat daha fazla olmasına rağmen, etkinliği daha düşük bulunmuştur. Araştırmacılar bu çalışmalarında bireysel dozlamada hazır besin kullanmışlardır (Boucias ve Nordin, 1978). Bu nedenle, çalışmalar arasında kullanılan yöntemlerden kaynaklanan farklılıkların olması beklenen bir durumdur. Bu farklılıkların beslenme materyalinden kaynaklı olduğu dikkate alındığında bakülovirüs çalışmalarında hazır besine göre doğal konukçusu ile beslenen larvaların LC ya da LD değerlerinin düşük olduğu gözlenmiştir (Bianchi vd., 2002). Yaprak yedirme metodunun diğer yöntemlere göre daha anlamlı veriler elde edilmesi bakımından virüs uygulamalarında kullanılmasının daha uygun olduğu söylenebilir (Bianchi vd., 2002). Biyotestlerde takip edilen protokollerde ufak düzenlemelerin bile test sonuçlarında çok büyük değişikliklere neden olabileceği unutulmamalıdır.

Böceğin gelişim dönemlerinde virüsün patojenitesini test etmek amacıyla HycuGV izolatlarının (HycuGV-Hc1 – Hc7) biyolojik etkinliğinin daha kapsamlı bir analizi, böceklerin 2., 3., 4. ve 5. larva dönemleri üzerinde yapıldı. Farklı larval evrelerindeki ölüm oranlarının karşılaştırılması, yeni doğan larvaların 2. ve 3. evre larvalara göre virüs enfeksiyonuna daha duyarlı olduğunu gösterir (Abdulkadir, 2014). Bunun yanında 2. ve 3. evre larvaların daha geç evrelere göre enfeksiyonda daha hassas oldukları da bilinmektedir (Eberle vd., 2012). Genellikle erken larval evreler daha yüksek başarılarından dolayı biyotestlerde tercih edilmektedir. Bu tez çalışmasındaki 1×10^7 OB/ml uygulama sonuçları değerlendirildiğinde 2. evrenin 3. evreye göre daha duyarlı olduğu, bu iki erken evrenin de 4. ve 5. evrelere göre daha hassas olduğu tespit edildi. Evreler arasındaki ölüm oranlarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Boucias ve Nordin (1977) yaptıkları çalışmada HycuGV'nin 2., 4. ve 5. evre *H. cunea* larvaları üzerindeki etkisini araştırdı. Bu çalışmadaki 10^7 kapsül/larva dozu 2. evrede %100, 4. evrede %60 ve 5. evrede %19 ölüm oranı göstermiştir. HycuGV Türkiye suşlarının 1×10^7 OB/ml dozu ile 2. evrede %77.8-95.9, 3. evrede %66.7-91.1, 4. evrede %41.9-47.8 ve 5. evrede de %32.6-41.5 ölüm oranı gösterdiği belirlendi. Bu iki çalışma sonuçları karşılaştırıldığında, 2. ve 4. evrede bu tezdeki izolatların biraz daha yüksek etki gösterdiği değerlendirildi. Fakat, 5. evre denemelerindeki ölüm oranlarını Boucias ve Nordin (1977) %19 olarak belirlerken bizim izolatlarımızda %31 - 41 arasında tespit edildi. Genellikle bakülovirüs enfeksiyonlarında daha genç larvalar yaşlı larvalara göre daha hassastır (Huger, 1963; Ignoffo, 1966; Evans, 1981; Duan ve Otvos, 2001; Trang ve Chaudhari, 2002; Sporleder

vd., 2007; Eberle vd., 2012; Dezianian vd., 2010). Geç evrelerde enfeksiyonun daha yavaş ya da düşük olması, larvaların enfeksiyona karşı direnç göstermesi ve genellikle birkaç gün içinde pupa olduğundan virüsün üretken bir enfeksiyon siklusu için srenin kısa olabileceği gerçeğine bağlı olabilir (Ignoffo ve Couch, 1981; Briese, 1986; Abdulkadir, 2014). Engelhard ve Volkman (1995) yaptıkları çalışmada 4. evre *Trichoplusia ni* larvalarının oral enfeksiyona dirençli olduğunu, ancak hemosol yoluyla tomurcuk virüs (BV) enfeksiyonuna duyarlı olduğunu bildirmiştir. Direnç, orta bağırsağın koruyucu astarı olan peritrofik membran varlığından da kaynaklanabilir (Kirkpatrick, vd., 1998; McNeil, vd., 2010). Yaşlı larvalarda daha belirgin olan bu astar-membran virüsün penetrasyonunu ve enfeksiyonu başlatmasını zorlaştırır (Federici, 1997).

Sonuç olarak, HycuGV izolatlarının gerek doz-ölüm denemelerinde gerek farklı larval evreler üzerindeki etki denemelerinde kendi aralarında karşılaştırmaları yapıldığında Hc1 izolatının istatistiksel veriler dikkate alındığında etkili bir suş olduğu kabul edildi. Bu nedenle, bu izolat esas alınarak diğer biyolojik aktivite çalışmaları yapıldı.

Yapılan birçok araştırma konukçu bitki kaynaklı konak böceklerde patojenlerin gelişimi üzerinde rolleri olduğunu ortaya koymuştur (Kansu, 1962; Uygun, 1975; Tuncer ve Kansu, 1994; Farrar ve Ridgway, 2000). Larvalar üzerinde virüsün etkinliğinde etkili olduğu birçok çalışmada kanıtlanmıştır (Richter vd., 1987; Keating vd., 1990; Forschler vd., 1992; Farrar ve Ridgway, 2000). Bu durumu araştırmacılar farklı konukulardaki larvaların besini tkietme gücündeki farklılıklardan kaynaklandığını dşnmştir (Farrar ve Ridgway, 2000). Konukçu bitkilerin *H. cunea* zerindeki etkileri ile ilgili pek çok çalışmada farklı bitkilerin böceğin gelişim sürelerinde farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur (Kovacevik, 1960; Choi, 1969; Tuncer ve Kansu, 1994). Bu çalışmaların bazılarında dut, akçaağaç, elma, erik, kavak ve fındık konukçuları ile yapılan araştırma sonucunda dut ve akçaağaç bitkilerinin ergin, larva, pupa ve yumurta sayısı bakımından *H. cunea* için en uygun konukçular olduğu tespit edilmiştir (Tuncer ve Kansu, 1994). Bunun yanında, konukçu bitki kaynaklı böceğin bağırsağındaki pH değişiminin bakülovirüs OB'lerinin znme hızında, virionun devamlılığında ve larvaların virüs enfeksiyonuna duyarlılığının azalmasında güçlü bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Harpaz ve Raccach, 1978; Stiles ve Paschke, 1980). Bu tez çalışmasında farklı konukçu bitkilerle beslenen *H. cunea* zerinde HycuGV'nin insektisidal aktivitesindeki etkisi araştırıldı. Konukçusu olduğu dut, elma, ceviz, fındık ve ıhlamur bitkisinin yaprakları kullanılan bu çalışmada ölüm oranları arasında çok fark olmadığı belirlendi.

Baculoviridae familyasında yer alan NPV ve GV'lerin konukçuları olan böceklerle olan ilişkilerinin 40 - 60 milyon yıl öncesine kadar dayandığı sanılmaktadır (Rohrmann vd., 1981). Bugüne kadar birçok araştırmacı tarafından entomopatojenlerin patojenitelerinin farklı konukçularda ortaya konulmasına yönelik bazı araştırmalar yürütülmüştür. Bütün bu çalışmalar daha geniş konukçu dizisine sahip izolatların elde edilmesini amaçlamıştır. Bu çalışmalar doğrultusunda birçok bakülovirüsün konak dağılımı ve çapraz enfektivitesi gözden geçirilmiştir (Gröner, 1986).

Öte yandan, bakülovirüslerin dezavantajı, uygulayıcıların daha geniş bir aralığa sahip zararlılar üzerinde etkili olan mücadele etmeni talep etmesine karşılık dar konak aralığına sahip olmalarıdır (Szewczyk vd., 2011; Moscardi, 1999). Bunun yanında birden fazla konukçuda hastalığa neden olabilen bakülovirüsler de bulunmaktadır (Moscardi, 1999; Gröner, 1986; Harrison ve Bonning, 2000). Bakülovirüslerin pestisit uygulamasını azaltmanın ve faydalı organizmaların korunmasının arzu edildiği yerlerde zararlı böceklerin (özellikle Lepidoptera ve Hymenoptera arasından) seçici kontrolünde potansiyel bir rolü vardır (Tinsley, 1979; Payne, 1982). Ancak, birçok ekosistem ürünü içinde bu tür virüsler diğer önemli zararlı türler etkilenmezse konakçıya özgü olabilirler (Payne, 1982). Bu nedenle, belirli bakülovirüslerin konak dağılımını belirlemek gerekir. Böylece en uygun virüs ya da virüsler belirli bir zararlı problemi için seçilebilir. Bakülovirüslerin farklı yapısal tipleri ve konak dağılımları arasındaki ilişki ile ilgili bazı kanıtlar vardır. NPV'lerin sıklıkla GV'lerden daha geniş bir konak dağılımına sahip olduğu öne sürülmüş (Ignoffo, 1968), ancak sonraki çalışmalarla bu desteklenmemiştir (Hamm, 1982). Bakülovirüslerle çapraz bulaştırma testleri yaygın olmasına rağmen, büyük ekolojik öneme sahip olsa da farklı konaklar için karşılaştırmalı testlere ait veriler nadiren yer almaktadır. Konak dağılımı ve özgüllüğünü belirlemek için bir biyotest standardizasyonu bulunmamaktadır (Cory vd., 1997). NPV'ler 7 böcek takımına ait 400'den fazla eklem bacaklı türü arasında yaygın olarak bulunmaktadır (Murphy vd., 1995). Genel olarak, çoğu NPV'nin konak aralığı orijinal olarak izole edildiği konukçusunun cinsinin ya da familyasının bir veya birkaç türüyle sınırlıdır (Moscardi, 1999). Daha geniş konak dağılımına sahip NPV'ler de bulunmaktadır (Gröner, 1986; Doyle vd., 1990; Hostetter ve Puttler, 1991; Harrison ve Bonning, 2000). Ek olarak, çoklu NPV'ler (MNPV) nispeten geniş bir konak dağılımına sahipken (Vail ve Jay, 1973; Capinera ve Kanost, 1979), tekli NPV'ler (SNPV) genellikle daha kısıtlıdır (Ignoffo ve Couch, 1981). GV enfeksiyonları ise 100'den fazla böcek türünde kaydedilmiştir; ancak, sadece Lepidoptera takımının üyelerini enfekte ettiği

görülmüştür (Murphy vd.,1995). NPV'lerin aksine, GV'lerin konak dağılımı daha dar ve çoğunlukla tek bir türle sınırlı gibi görünmektedir. Yapılan birçok çalışmada bakülovirüsler farklı konukçularda test edilmiş ve onlarda patojen olmadıkları görülmüştür (Del Rincon-Castro ve Ibarra, 1997). Bu çalışmada HycuGV-Hc1 izolatının *M. neustria*, *S. exigua* ve *H. armigera* üzerinde doğal konukçusundan daha düşük ölüm oranlarıyla zayıf patojen olduğu belirlendi. Vasiljevic (1968) yaptığı çalışmada *H. cunea* GV'nin *Bombyx mori* L. ve *Pieris rapae* L. üzerindeki etkisini araştırmıştır. Araştırmacı HycuGV'nin *P. rapae* larvalarında enfeksiyon oluşturduğunu kaydetmiştir. Daha sonraki çalışmada Tomita ve Ebihara (1982), HycuGV'yi *Euproctis pseudoconspersa*, *E. silimis*, *Numenes disparilis*, *Clostera anastomosis tristis*, *Diaphania pyloalis*, *Bombyx mori*, *Spilarctia subcarnea*, *S. imparilis* ve *H. cunea* olmak üzere 8 konak üzerinde test etmiştir. Araştırma sonucunda, *S. subcarnea* ve *S. imparilis* ölü larvalarında elektrosinerez yöntemiyle spesifik bir antijen tanımlanmış ve bu böceklerin yağ hücrelerinin hipertrofik hale geldiği, HycuGV ile enfekte edilen *H. cunea*'ya morfolojik olarak benzediği kaydedilmiştir. Araştırmada bu bulgulara dayanarak bu iki türün HycuGV'ye duyarlı olduğu belirlenmiş; ancak, diğer türler üzerinde enfektif olmadığı gözlemlenmiştir (Tomita ve Ebihara, 1982). Hukuhara vd. (1969) de HycuGV'nin *B. mori* üzerinde etkili olmadığını kaydetmiştir. Bu sonuçlar dikkate alındığında HycuGV'lerin konak dağılımlarının tek bir türle sınırlı kalmadığı ortaya çıkmaktadır.

Laboratuvar koşullarında yapılan testlerin sonuçlarıyla alandaki denemelerin sonuçlarının tahmin edilip edilemeyeceği önemli bir sorudur. Örneğin bir sera ya da alan bitkisindeki durum ekin, böcek, virüs ve abiyotik ortam arasındaki dalgalanmalar ve çevresel faktörler nedeniyle çok daha karmaşıktır. Bununla birlikte, bir sera ya da alan uygulamalarındaki bakülovirüslerin etkinliği, laboratuvar biyotestlerinde elde edilen sonuçlarla tutarlı olduğunda laboratuvar denemelerinde belirlenen etkilenme ve etki hızı, mahsul seviyesinde bakülovirüs etkinliğinin göstergeleri olarak kullanılabilir. Bitkilerde bakülovirüslerin etkinliği genellikle maliyeti yüksek olan alan veya sera test programlarında belirlenir (Smits vd., 1987a; Kolodny-Hirsch vd., 1993, 1997; Cory vd., 1994; Treacy vd., 1997). Bakülovirüslerin etkinliği laboratuvar deneme verilerinden kısmen tahmin edilebildiğinde alan denemelerinin sayısı ya da boyutu azaltılabilir. Diğer bir deyişle laboratuvar verilerinden yola çıkarak sera ya da alan uygulamaları planlanabilir. Laboratuvar çalışmalarının daha ileri götürülmesi için, virüslerin çeşitli koşullarda ve farklı bitki evrelerinde, farklı coğrafi bölgelerde virüsün ortamdaki devamlılığı, alandaki ölüm

oranını ortaya çıkarmak için gerekli konsantrasyon ve uygulama zamanı gibi birçok faktör araştırılmalıdır. Alan ya da seradaki sıcaklık, larvanın virüs duyarlılığı, larva beslenme hızı ve larva beslenme yeri gibi çeşitli faktörler ölümcül dozdaki virüsün alımını ve daha sonraki virüs uygulama süresini etkileyebilir. Ürün-böcek-virüs kombinasyonunun ayrıntılı bir tanımına dayanan çeşitli modeller ürün seviyesinde oluşturulan laboratuvar verilerinin daha doğru bir ölçekte artmasını sağlamak için kullanılabilir (Van der Werf vd., 1991).

Bu tez çalışmasında saksıda yetiştirilen dut fidelerinde 2. ve 4. evre *H. cunea* larvalarına karşı HycuGV-Hc1 izolatının uygulamaları yapıldı. Bu çalışmanın amacı saksıdaki dut fidelerinde gelişen erken ve geç evre larvalar üzerinde HycuGV'nin fidelerdeki zarar boyutunu belirlemek ve bunların karşılaştırmasını yapmaktır.

Alan çalışmalarıyla ilgili Hukuhara vd. (1978) tarafından Japonya'da dut ağaçlarıyla çevrili bir arsada belirli özelliklere sahip bir deney alanı sağlanmıştır (Hukuhara vd. 1978). HycuGV'nin sürekliliği ve dağılımının araştırıldığı bu çalışmada ağaçlar üzerine *H. cunea* 1. ve 2. dölüne ait yumurtalar yerleştirilmiştir. Stok HycuGV laboratuvarında yetiştirilen *H. cunea* larvalarında çoğaltılarak saflaştırılmış ve 4×10^7 kapsül/ml ve %0.01'lik gramin (bir ıslatma maddesi) içeren bir virüs süspansiyonu 30 ağaç üzerine elle çalıştırılan bir basınçlı püskürtücü ile muamele edilmiştir (100 ml/ağaç). Larvalar 3. veya 4. evreye geldiğinde virüs püskürtülmüştür. Uygulamadan bir yıl sonra ilk dölde GV enfeksiyonuna rastlanmazken, 2. dölde 14 enfekte larva tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda GV'nin konakçı popülasyonda homojen bir şekilde dağılmadığı; ancak, erken evrelerde ağ içerisinde yaşayan larvalarda ortaya çıktığı kaydedilmiştir. Bu gibi çalışmalar esas alındığında, Hukuhara (1975) tarafından önerilen modele göre, larvalarda enfeksiyonlar ortaya çıktığında ölü larva sayısı logaritmik olarak artmaktadır. Van Der Plank (1963)'ün tanımladığı gibi ortaya çıkan enfeksiyon oranı larvalar ağda toplu bir şekilde yaşadığında yüksek, fakat larvalar ağdan ayrılıp yayıldığında düşük olmaktadır. İlk döldeki enfekte larvalardan yayılan virüs ikinci döldeki larvalar çıkana kadar aktif olarak kalmakta ve virüs bulaşma derecesi yüksek olmaktadır. Epizootik başlangıcın ilkbaharda olması ikinci döldeki larvalarda büyük kayıplar meydana getireceğine işaret etmektedir. Bütün bu çalışmalar incelendiğinde bu tez çalışması sonucunda elde edilen verilerin de bakülovirüs uygulama zamanının önemli olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Tez çalışmamızda 2. evre *H. cunea* larvalarının dut yapraklarındaki yeşillik tüketiminin 4. evre larvalara göre daha az olması bu sonucu doğrulamaktadır. Aynı şekilde alan denemelerine paralel olarak

laboratuvar çalışmalarında da erken evrelerin geç evrelere göre daha duyarlı olduğu sonucu desteklendi.

Bugüne kadar, bakülovirüslerin alan ya da sera denemeleri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Hukuhara vd., 1978; Bourner vd., 1992; Kolodny-Hirsch vd., 1997; Bianchi vd., 2000; Lasa vd., 2007). Smits vd. (1987b) yaptıkları çalışmada krizantem bitkisi üzerinde 4. ve 5. evre *S. exigua* larvalarının yaprak tüketimini kaydetmiştir. *S. exigua* larvalarının biber meyvelerinden uzaklaşıp bitkinin üst kısmına tırmandıkları ve öldükleri kaydedildi. Bu davranış bakülovirüs enfeksiyonunun bir özelliğidir ve bu patojenlerin bulaşma olasılığını arttırır (Vasconcelos vd., 1996; Goulson, 1997). Bu tez çalışmasında da HycuGV-Hc1 izolatu ile enfekte olan *H. cunea* larvaları aynı davranışı gösterdi. Benzer şekilde birçok çalışmada bakülovirüslerle enfekte olan larvalar ölümlerinden kısa bir süre önce buldukları bitkilerin üst kısımlarına tırmanarak kendilerini baş aşağı sarkıtarak ölmüştür (Tanada ve Kaya, 1993; Federici, 1997; Abdulkadir, 2014). Bu gibi çalışmalarda büyük ölçüde yaprak kaybına neden olmalarından önce uygulamaların erken dönemlerde hedeflenmesi avantajlıdır. Ancak erken evrelerin istilasının belirlenmesi yaprak yüzeylerinde ilk hasarın küçük olması nedeniyle zordur. Genelde larvalar 3. evreye gelene kadar zararlı varlığı tespit edilemez (Smits vd., 1987b). Larvaların enfeksiyona duyarlılığı evre arttıkça azalır, fakat daha ileri evrelerde daha yüksek bir yeşillik tüketimi olmakta ve bu durum yüksek OB uygulaması ile telafi edilmektedir.

Sonuç olarak çalışmada ilk defa Türkiye’de *H. cunea*’dan bir granulo virüs izolasyonu yapıldı. Tüm dünyada özellikle son yıllarda böceklerle mücadele noktasında virüslerin yaygın bir şekilde kullanımına yönelik araştırmalar hız kazanmakta ve günümüzde virüslere ait birçok preparat üretilip kullanılmaktadır. Ülkemizde böcek virüsleri ile ilgili çalışmalar hız kazanmasına rağmen, *H. cunea*’nın viral patojenleri ile ilgili çalışma bu zamana kadar yapılmamıştır. Bu nedenle, bu çalışmanın ülkemizde hem bu zararlıya karşı hem de diğer zararlılara karşı viral mücadele etmeni olarak kullanımı dikkat çekecektir ve yeni virüslerin tespit edilmesine yönelik çalışmalara hız kazandıracaktır.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışması sonucunda, *Hyphantria cunea* larvalarından *Hyphantria cunea* granulovirus (HycuGV) izole edildi, morfolojik ve moleküler karakterizasyonları yapıldı ve HycuGV'nin biyolojik aktivitesi laboratuvar koşullarında test edildikten sonra saksı denemeleri yapıldı. Tez çalışması sonucunda birçok hedefe başarılı bir şekilde ulaşılmıştır. Bu tez çalışması ile,

1. Türkiye'de *H. cunea*'nin viral patojenleri ilk kez araştırılmış ve araştırma sonucunda *H. cunea*'dan ilk kez bir granülovirüs tespit edildi.
2. Bu virüsün morfolojik ve moleküler özellikleri belirlendi.
3. Virüsün filogenetik özellikleri belirlenerek benzerleriyle olan akrabalık dereceleri ortaya konuldu.
4. Virüsün gerek kendi konağı ve gerekse farklı konaklar üzerindeki patojenik özellikleri belirlenerek, biyolojik mücadelede kullanım potansiyeli tespit edildi.
5. Tez konusunu oluşturan virüsün morfolojik, moleküler ve filogenetik özellikleri literatüre kazandırılarak bilim hizmetine sunuldu.

6. ÖNERİLER

Bu çalışmada ilk kez *H. cunea*'dan ve Türkiye'den bir granülovirüs tespiti, izolasyonu, karakterizasyonu ve laboratuvar ve alan koşullarında insektisidal aktivite çalışmaları yapıldı. Birçok hedefe başarılı bir şekilde ulaşılmış olsa da HycuGV'nin daha sonraki çalışmalara olacak katkıları aşağıda verilmiştir;

1. Moleküler yapısının aydınlatılması için HycuGV-Hc1'in komple genom haritası çıkarılabilir ve bioinformatik analizleri yapılabilir.
2. HycuGV-Hc1'in büyük ölçekli üretimini kolaylaştırmak için laboratuvar kültürü olarak yetiştirilen farklı böceklerde denemeler yapılabilir.
3. Hücre kültürü çalışmaları ile virüsün çoğaltılması araştırmaları yapılabilir.
4. Alan denemelerinde virüsün *H. cunea* üzerindeki etkinliği birkaç yıl takip edilmek suretiyle araştırılabilir.
5. HycuGV'e ait insektisit geliştirilmesin yönelik çalışmalar başlatılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide, J. Econ. Entomol., 18, 265-267.
- Abdulkadir, F., 2014. Genetic and biological characterization of a novel South African *Plutella xylostella* granulovirus (PlxyGV) isolate, Rhodes University, Master of Science in Microbiology.
- Ackermann, H.W. ve Smirnoff, W.A., 1983. A morphological investigation of 23 baculoviruses, J. Invertebr. Pathol., 41, 269-280.
- Adams, J. R. ve McClintock, J.T., 1991. Baculoviridae. Nuclear polyhedrosis viruses, Adams J.R. and Bonami J.R., In Atlas of Invertebrate Viruses, Boca Raton, Florida, CRC Press, 87-204.
- Ardisson-Araujo, D.M.P., Silva, A.M.R., Melo, F.L., Santos, E.R., Sosa-Gomez, D.R. ve Riberio, B.M., 2018. A Novel Betabaculovirus Isolated from the Monocot Pest *Mocis latipes* (Lepidoptera: Noctuidae) and the Evolution of Multiple-Copy Genes, Viruses, 10, 134.
- Baird, A.B., 1916. An historical account of the forest tent caterpillar and of the fall webworm in North America, 47th Ann. Rept. Entomol. Soc. Ontario, 73-87.
- Baş, R., 1982. Türkiye için yeni bir bitki zararlısı, *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera, Arctiidae), İstanbul.
- Bayramoglu, Z., Gencer, D., Muratoglu, H., Efe, D., Nalcacioglu, R., Demirbag, Z. ve Demir, I., 2018. Characterization of a nucleopolyhedrovirus variant of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) in Turkey, Int. J. Pest Manage., 64, 117-127.
- Beljelarskaya, S.H., 2002. A baculovirus expression system for insect cells, Mol. Biol., 36, 281-292.
- Bergold, G.H., 1963. The nature of nuclear polyhedrosis viruses, Editör: Steinhaus E.A., Insect Pathology: An Advance Treatise, Academic Press, New York, 413-455.
- Bianchi, F.J.J.A., Van der Werf, W. ve Vlak, J.M., 2002. Validation of a comprehensive process-based model for the biological control of beet armyworm, *Spodoptera exigua*, with baculoviruses in greenhouses, Biol. Control, 23, 47-55.
- Bianchi, F.J.J.D., Joosten, N.N., Vlak, J.M. ve Van der Werf, W., 2000. Greenhouse evaluation of dose- and time- mortality relationship of two nucleopolyhedroviruses for the control of beet armyworm, *Spodoptera exigua*, on chrysanthemum, Biol. Control, 19, 252-258.

- Bilimoria, S.L., 1991. The biology of nuclear polyhedrosis viruses, Editör: Edouard K., Viruses of Invertebrates, Marcel Dekker, New York. 1-72.
- Bird, F.T., 1969. Infection and mortality of spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* and forest tent caterpillar, *Malacosoma disstria* caused by nuclear and cytoplasmic polyhedrosis viruses, Can. Entomol., 101, 8133-8140.
- Black, B.C., Brennan, L.A., Dierks, P.M. ve Gardm, I.E., 1997. Commercialization of baculoviral insecticides, Editör: Miller L.K., The Baculoviruses, Plenum Press, New York, USA, 341-387.
- Blissard, G.W. ve Rohrman, G.F., 1990. Baculovirus diversity and molecular biology, Ann. Rev. Entomol., 35, 127-155.
- Blissard, G.W., Black, B., Crook, N., Keddie, B.A. ve Possee, R., 2000. Family Baculoviridae. Editörler: Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B. ve Estes M.K., Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, San Diego, Academic, 195-202.
- Bonning, B.C., 2006. Insect Viruses: Biotechnological Applications, Elsevier, San Diego, CA, USA, 68, 532.
- Boucias, D. ve Pendland, J. C., 1998. Principles of Insect Pathology, Kluwer academic Publisher, Boston.
- Boucias, D.G. ve Nordin, G.L., 1977. Interinstar susceptibility of the fall webworm, *Hyphantria cunea*, to its nucleopolyhedrosis and granulosis virus, J. Invertebr. Pathol., 30,68-75.
- Boucias, D.G. ve Nordin, G.L., 1978. Susceptibility of *Hyphantria cunea* infected with the Diacrisia granulosis virus to its homologous baculoviruses, J. Invertebr. Pathol., 32, 341-347.
- Bourner, T.C., Vargas-Osuna, E., Williams, T., Santiago-Lavarez, F. ve Cory, J.S., 1992. A comparison of the efficacy of nuclear polyhedrosis and granulosis viruses in spray and bait formulations for the control of *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize, Biocontrol Sci. Techn., 2, 315-326.
- Bovey, P., 1954. Un nouveau ravageur en Europe: l'Ecaille fileuse (*Hyphantria cunea* Drury), J. Forestier Suisse, I.
- Briese, D.T., 1986. Insect resistance to baculoviruses, The biology of baculoviruses, 2, CRC, Boca Raton, FL., 237-266.
- Bucher, G.E. ve Turnock, W.J., 1983. Dosage responses of larval instars of the bertha armyworm, *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) to a native nuclear polyhedrosis, Can. Entomol., 115, 341-349.

- Capinera, J.L. ve Kanost, M.R., 1979. Susceptibility of the zebra caterpillar to *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, J. Econ. Entomol., 72, 570-572.
- Choi, J.B., Heo, W.I., Bae, S.m., Shin, T.Y., Lee, J.B., Je, Y.H., Jin, B.R. ve Woo, S.D., 2012. Complete sequence and genomic analysis of the *Hyphantria cunea* granulovirus, 45th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 2012 International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Buenos Aires, Argentina, 68.
- Choi, S.Y., 1969. Effects of host plants on the pupal weight and number of eggs in the ovary of the fall webworm, *H. cunea* Drury-correlation between the pupal weight and the number of eggs, Korean J. Plant. Prot., 7, 33-37.
- Cooper, D., Cory, J.S., Theilmann, D.A. ve Myers, J.H., 2003. Nucleopolyhedroviruses of forest and western tent caterpillars: cross-infectivity and evidence for activation of latent virus in high-density field populations. Ecol. Entomol., 28, 41-50.
- Cory, J.S, Hails, R.S. ve Sait, S.M., 1997. Baculovirus ecology, Plenum Press, NY.
- Cory, J.S. ve Bishop, D.H.L., 1997. Use of baculoviruses as biological insecticides. Mol. Biotechnol., 7, 303-313.
- Cory, J.S. ve Myers, J.H., 2003. The ecology and evolution of insect baculoviruses. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst., 34, 239-72.
- Cory, J.S., Hirst, M.L., Williams, T., Hails, R.S. ve Goulson, D., 1994. Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide, Nature, 370, 138-40
- Crook, N.E., 1991. Baculoviridae: subgroup B: comparative aspects of granulosis viruses, Editör: Kurstak E., In *Viruses of Invertebrates*, New York, Marcel Dekker, 73-110.
- Crook, N.E., James, J.D., Smith, I.R.L. ve Winstanley, D., 1997. Comprehensive physical map of the *Cydia pomonella* granulovirus genome and sequence analysis of the granulin gene region, J. Gen. Virol., 78, 965-974.
- Cuartas, P.E., Barrera, G.P., Belaich, M.N., Barreto, E., Ghiringhelli, P.D. ve Villamizar, L.F., 2015. The Complete Sequence of the First *Spodoptera frugiperda* Betabaculovirus Genome: A Natural Multiple Recombinant Virus, Viruses, 7, 394-421.
- Cunningham, J.C., 1995. Baculoviruses as microbial insecticides, Editör: Reuvei R., *Novel Approaches to Integrated Pest Management*, Boca Raton, Lewis, 261-292.
- Cunningham, J.C., Kaupp, W.J. ve Howse, G.M., 1991. Development of a nuclear polyhedrosis virus for control of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) in Ontario. I. Aerial trial sprays in 1988, Can. Entomol., 123, 601-609.

- Cunningham, J.C., Kaupp, W.J., Fleming, R.A., Brown, K.W. ve Burns, T., 1993. Development of a nuclear polyhedrosis virus for control of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) in Ontario. II. Reduction in dosage and emitted volume (1989 and 1990), Can. Entomol., 125, 489-498.
- Del Rincon-Castro, M.C. ve Ibarra, J.E., 1997. Genotypic divergence of three single nuclear polyhedrosis virus (SNPV) strains from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, Biochem. Syst. Ecol., 25, 4, 287-295.
- Demir, İ., 2004. *Hyphantria cunea* Nükleopolihedrovirüs'ünün *Spodoptera frugiperda* ve *Lymantria dispar* Hücre Kültürlerinde Replikasyonunun Karşılaştırılması. Doktora Tezi. K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.
- Demir, İ., Nalçacıoğlu, R., Demirbağ, Z., Kılıç, A.O. ve Beldüz, A.O., 2000. Expression of cryIVA and cryIVD genes of *Bacillus thuringiensis* in baculovirus expression system, Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes, IOBC WPRS Bull., 23, 267-274.
- Demir, İ., Nalcacioglu, R., Mohammed Gholizad, L. ve Demirbag, Z., 2013. Characterization of a new isolate of *Malacosoma Neustria* nucleopolyhedrovirus (ManeNPV) from Turkey, Turk. J. Biol., 37, 385-391.
- Demir, İ., Nalcacioglu, R., Mohammed Gholizad, L. ve Demirbag, Z., 2014. A highly effective nucleopolyhedrovirus against *Malacosoma* spp. (Lepidoptera: Lasiocampidae) from Turkey: isolation, characterization, phylogeny, and virulence, Turk. J. Agric. For., 38, 462-470.
- Demirbağ, Z. ve Beldüz, A.O., 1997. Baculovirüs'ün Biyolojik Mücadeledeki Önemi, Kükem Dergisi, 20, 1, 49-58.
- Demirbağ, Z., Beldüz, A.O. ve Demir, İ., 1998. Baculovirus'lerin ekspresyon vektörü olarak Biyoteknolojide kullanılması, Turk. J. Biol., 21, 63-70.
- Deseo, K.V., Montermini, A. ve Cortellini, W., 1986. The 1st outbreak of the fall webworm (*Hyphantria cunea* Drury, Lepid, Arctiidae) in north Italy-preliminary-observations on the development, diapause and derivation, J. Appl. Entomol., 101, 201-206.
- Dezianian, A., Sajap, A.S., Hong, L.W., Omar, D., Kadir, H.A., Mohamed, R. ve Yusoh, M.R.M., 2010. Morphological Characteristics of *P. xylostella* Granulovirus and Effects on Its Larval Host Diamondback Moth *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera, Plutellidae), Am. J. Agric. Biol. Sci., 5, 1, 43-49.
- Dhladhla, B.I.R., 2012. Enumeration of Insect Viruses using Microscopic and Molecular Analyses; South African isolate of *Cryptophlebia leucotreta* Granulovirus as a Case Study. Master thesis. Nelson Mandela Metropolitan University.

- Doyle, C.J., Hirst, M.L., Cory, J.S. ve Entwistle, P.F., 1990. Risk assessment studies: detailed host range testing of wild-type cabbage moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus, Appl. Environ. Microbiol., 56, 2704-2710.
- Duan, L. ve Otvos, I.S., 2001. Influence of larval age and virus concentration on mortality and sublethal effects of a nucleopolyhedrovirus on the western spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae), Environ. Entomol., 30, 136-146.
- Eberle, K.E., Wennmann, J.T., Kleespies, R.G. ve Jehle, J.A., 2012. Basic techniques in insect virology, Editör: Lacey L.A., Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, Academic Press Washington, USA, 15-74.
- Engelhard, E.K. ve Volkman, L.E., 1995. Developmental Resistance Within Fourth Instar *Trichoplusia ni* Orally Inoculated with *Autographa californica* M Nuclear Polyhedrosis Virus, Virology, 209, 384-389.
- Erlandson, M., 2008. Insect pest control by viruses. In: Encyclopedia of Virology, edited by Mahy BWJ and Van Regenmortel MHV, Elsevier-Academic Press, 3, 125-133.
- Evans, H.F. ve Shapiro, M., 1997. "Viruses" Manual of techniques in insect pathology, Lacey, L., ed., Academic Press, San Diego, 17-53.
- Evans, H.F., 1981. Quantitative Assessment of the Relationship Between Dosage and Response of the Nuclear Polyhedrosis Virus of *Mamestra brassica*, J. Invertebr. Pathol., 37, 101-109.
- Farrar, R.R. ve Ridgway, R.L., 2000. Host plant effects on the activity of selected nuclear polyhedrosis viruses against the corn earworm and beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae), Environ. Entomol., 29, 1, 108-115.
- Faulkner, P., Kuzio, J., Williams, G.V. ve Wilson, J.A., 1997. Analysis of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity in vivo, J. Gen. Virol., 78, 12, 3091-3100.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L.A. (2005). Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Virus Taxonomy. Elsevier, San Diego, California, pp. 691-700.
- Federici, B.A., 1997. Baculovirus Pathogenesis. University of California at Riverside, Department of Entomology and Interdepartmental Graduate Program in Genetics, Riverside California.
- Ferrelli, M.L., Berretta, M.F., Baleich, M.N., Ghiringhelli, P.D., Sciocco-Cap, A. ve Romanowski, V., 2012. The Baculoviral genome, Editörler: Maria Laura Garcia ML ve Romanowski V., Viral Genomes - Molecular structure, diversity, gene expression mechanisms and host-virus interactions, Publisher InTech, 1-32.
- Finney, D.J., 1971. Probit Analysis, Cambridge University Press, London, 328.

- Flexner, J.L. ve Belnavis, D.L., 2000. Microbial Insecticides, Editörler: Rechcigl J.E. ve Rechcigl N.A., Biological and Biotechnological Control of Insect Pest, Lewis Publishers, Boca Raton, 35-62.
- Forschler, B.T., Young, S.Y. ve Felton, G.W., 1992. Diet and the susceptibility of *Helicoverpa zea* (Noctuidae: Lepidoptera) to a nuclear polyhedrosis virus, Environ. Entomol., 21, 1120-1223.
- Friesen, P.D., 1997. Regulation of baculovirus early gene expression. Editör: Miller, L.K., The Baculoviruses, Plenum Press, New York and London, 141-170.
- Friesen, P.D., 2007. Insect Viruses. In: Fields Virology, Fifth Edition, Volume 1, Editörler: Knipe D.M. ve Howley P.M., Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, USA.
- Funk, C.J., Braunagel, S.C. ve Rohrmann, G.F., 1997. Baculovirus Structure (L. K. Miller, eds). In "The Baculoviruses", Chapter 2, Plenum Press, New York, 7-27.
- Fuxa, J.R., Richter, A.R. ve Srother, M.S., 1993. Detection of Anticarsia gemmatialis nuclear polyhedrosis virus in predatory arthropods and parasitoids after viral release in Louisiana soybean, J. Entomol. Sci., 28, 51-60.
- Gencer, D., Bayramoglu, Z., Nalcacioglu, R., Kleespies, R. G., Demirbag, Z. ve Demir, I., 2018. Characterisation of three Alphabaculovirus isolates from the gypsy moth, *Lymantria dispar dispar* (Lepidoptera: Erebidae), in Turkey, Biocontrol Sci. Techn., 28, 170-121.
- Ghosh, S., Parvez, M.K., Banerjee, K., Sarin, S.K. ve Hasnain, S.E., 2002. Baculoviruses as mammalian cell expression vector for gene therapy: An emerging strategy, Molec. Ther., 6, 5-11.
- Goldsmith, C.S. ve Miller, S.E., 2009. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. Clin. Microbiol. Rev., 22, 552-563.
- Gomi, T. ve Takeda, M., 1996. Changes in life-history traits in the fall webworm within half a century of introduction to Japan, Funct. Ecol., 10, 384-389.
- Goto, C., Minobe, Y. ve Iizuka, T., 1992. Restriction endonuclease analysis and mapping of the genomes of granulosis viruses isolated from *Xestia c-nigum* and five other noctuid species. J. Gen. Virol., 73, 1491-1497.
- Goulson, D. ve Cory, J.S., 1995. Sublethal effects of baculovirus in the cabbage moth, *Mamestra brassica*, Biol. Control, 5, 361-367.
- Goulson, D., 1997. Wipfelkrankheit: Modification of host behaviour during baculoviral infection, Oecologia, 109, 219-228.
- Gray, S.M. ve Banerjee, N., 1999. Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 63, 128-148.

- Gröner, A., 1986. Specificity and safety of baculoviruses, *The biology of Baculoviruses*, Vol. I, CRC Press, Boca Raton, 177-202.
- Haase, S., Ferrelli, L., Pidre, M.L., Romanowski, M.L.V., 2013. Current Issues in Molecular Virology-Viral Genetics and Biotechnological Applications, Victor Romanowski, ISBN 978-953-51-1207-5, Intech, 79-112.
- Haas-Stapleton, E.J., Washburn, J.O. ve Volkman, L.E., 2004. "P74 mediates specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to primary cellular targets in the midgut epithelia of *Heliothis virescens* Larvae", J. Virol., 78, 6786-6791.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hamm, J.J., 1982. Extension of the host range for a granulosis virüs from *Heliothis armiger* from South Africa, Environ. Entomol., 11, 159-160.
- Harpaz, I. ve Raccach, B., 1978. Nuclear Polyhedrosis Virus of the Egyptian Cotton Worm, *Spodoptera littoralis*: Temperature and pH Relation Host Range and Synergism. J. Invertebr. Pathol., 32, 368-372.
- Harrap, K.A., 1970. "Cell infection by a nuclear polyhedrosis virus", Virology, 42, 311-318.
- Harrison, R.L. ve Bonning, B.C., 2000. Use of scorpion neurotoxins to improve the insecticidal activity of *Rachiplusia ou* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus, Biol. Control, 17, 191-201.
- Harrison, R.L. ve Popham, H.J., 2008. Genomic sequence analysis of a granulovirus isolated from the Old World bollworm, *Helicoverpa armigera*, Virus Genes, 36, 565-581.
- Harvey, J.P. ve Volkman, L.E., 1983. Biochemical and biological variation of *Cydia pomonella* (codling moth) granulosis virus, Virology, 124, 21-34.
- Hashimoto, Y., Hayakawa, T., Ueno, Y., Fujita, T., Sano, Y. ve Matsumoto, T., 2000. Sequence analysis of the *Plutella xylostella* granulovirus genome, Virology, 275, 358-372.
- Hawtin, R.E., Zarkowska, T., Arnold, K., Thomas, C.J., Gooday, G.W., King, L.A., Kuzio, J.A. ve Possee, R.D., 1997. Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus encoded chitinase and cathepsin genes, Virology, 238, 243-253.
- Hayakawa, T., Ko, R., Okano, K., Seong, S.I., Goto, C. ve Maeda, S., 1999. Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome, Virology, 262, 277-297.

- Herniou, E.A., Luque, T., Chen, X., Vlak, J.M., Winstanley, D., Cory, J.S. ve O'Reilly, D.R., 2001. Use of whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny, J. Virol., 75, 8117-8126.
- Herniou, E.A., 2003. Use of comparative genomics and phylogenetics to study the evolution of the Baculoviridae. PhD Thesis, Department of Biological Sciences, Imperial College, London, 84.
- Herniou, E.A., Olezewski, J.A., O'Reilly, D.R. ve Cory, J.S., 2004. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts, J. Virol., 78, 3244-3251.
- Hiscock, D. ve Upton, C., 2000. Viral genome database: storing and analyzing genes and proteins from complete viral genomes, Bioinformatics, 16, 484-485,
- Hostetter, D.L. ve Puttler, B., 1991. A new broad host spectrum nuclear polyhedrosis virus isolated from a celery looper, *Anagrapha falcifera* (Kirby), (Lepidoptera: Noctuidae), Environ. Entomol., 20, 5, 1480-1488.
- Hu, Y.C., 2006. Baculovirus vectors for gene therapy, Adv. Virus Res., 68, 287-320.
- Huger, A., 1963. Granulosis of insects, Editör: Steinhaus E.A., In Insect Pathology, 1, New York: Academic Press, 531-575.
- Hukuhara, T. ve Hashimoto, Y., 1966. Virus disease of *Hyphantria cunea* Drury, Jap. J. Appl. Entomol. Zool., 10, 149-155.
- Hukuhara, T., 1975. Distribution of viruses of the fall webworm in soil, Proc. Ist. Intersect. Congr. IAMS, Tokyo, 2, 658-665.
- Hukuhara, T., Aruga, H. ve Kobayashi, M., 1969. On the Granulosis of *Hyphantria cunea* DRURY, Jap. J. Appl. Ent. Zool., 13, 1-4.
- Hukuhara, T., Kitajima, K. ve Tamura, M., 1978. Introduction of a granulosis virus of the fall webworm, *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae) into Japan, Appl. Ent. Zool., 13, 29-33.
- Hunter-Fujita, F.R., Entwistle, P.F., Evans, H.F. ve Crook, N.E., 1998. Insect Viruses and Pest Management, John Wiley & Sons, Chichester.
- Ignoffo, C.M. ve Couch, T.L., 1981. Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980, London and New York, Academic Press.
- Ignoffo, C.M. ve Garcia, C., 1992. Combinations of environmental factors and simulated sunlight affecting activity of inclusion bodies of the *Heliothis* (Lepidoptera: inclusion bodies of the *Heliothis* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrosis virus, Environ. Entomol., 21, 210-13.

- Ignoffo, C.M. ve Garcia, C., 1994. Antioxidant and oxidative enzyme affect on the inactivation of inclusion bodies of the *Heliothis* baculovirus by simulated sunlight-UV, Biol. Control, 23, 1025-1029.
- Ignoffo, C.M., 1966. Effects of age on mortality *Heliothis zea* and *Heliothis virescens* larvae exposed to a nuclear polyhedrosis virus, J. Invertebr. Pathol., 8, 279-282.
- Ignoffo, C.M., 1968. Specificity of insect viruses, Bulletin of the Entomological Society of America, 14, 265-276.
- Ignoffo, C.M., 1974. Microbial control of insects. Harris FA. ed. Viral Pathogens, Proceedings of the Summer Institute on Biological Control of Plants Insects and Diseases, Maxwell, Jackson: Univ. Mississippi, 541-557.
- Ikeda, M., Shikata, M., Shirata, N., Chaeychomsri, S. ve Kobayashi, M., 2006. Gene organization and complete sequence of the *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus genome, J. Gen. Virol., 87, 2549-2562.
- Il'inykh, A.V. ve Ul'yanova, E.G., 2005. Latency of baculoviruses, Biology Bulletin, 32, 5, 496-502.
- Ilyinykh, A.V., Shternshis, M.V. ve Kuzminov, S.V., 2004. Exploration Into a Mechanism of Transgenerational Transmission of Nucleopolyhedrovirus in *Lymantnia dispar* L. in Western Siberia, BioControl, 49, 441-454.
- Inceoglu, A.B., Kamita, S.G., Hinton, A.C., Huang, Q., Severson, T.F., Kang, K. ve Hammock, B.D., 2001. "Recombinant baculoviruses for insect control", Pest Manag. Sci., 57, 981-987.
- Ishimwe, E., Hodgson, J.J. ve Pasarelli, A.L., 2015. Expression of the *Cydia pomonella* granulovirus matrix metalloprotease enhances *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus virulence and can partially substitute for viral cathepsin, Virology, 481, 166-178.
- Jakubowska, A.K., Peters, S.A., Ziemnicka, J., Vlak, J.M. ve van Oers, M.M., 2006. Genome sequence of an enhancin gene-rich nucleopolyhedrovirus (NPV) from *Agrotis segetum*: collinearity with *Spodoptera exigua* multiple NPV, J. Gen. Virol., 87, 537-551.
- Jaques, R.P., 1985. Stability of insect viruses in the enviroment, *Viral Insecticides for Biological Control*, Orlando, FL, Academic, 289-360.
- Jehle, J.A., Lange, M., Wang, H., Hu, Z., Wang, Y. ve Hauschild, R., 2006. Molecular identification and phylogenetic analysis of basculoviruses from Lepidoptera, Virology, 346, 180-193.
- Johnson, W.T. ve Lyon, H.H., 1988. *Insects that feed on trees and shrubs*, Cornell University Press, Ithaca, NY.

- Jones, K.A., 2000. Bioassays of Entomopathogenic Viruses. Natural Resources Institute, University of Greenwich, Chatham, Kent, UK.
- Jukes, M.D., Motsoeneng, B.M., Knox, C.M., Hill, M.P. ve Moore, S.D., 2016. The comparative analysis of complete genome sequences from two South African betabaculoviruses: *Phthorimaea operculella* granulovirus and *Plutella xylostella* granulovirus, Arch. Virol., 161, 2917-2920.
- Kadir, H.B.A., Payne, C.C., Crook, N.E., Fenlon, J.S. ve Winstanley, D., 1999. The comparative susceptibility of the diamondback moth *Plutella xylostella* and some other major lepidopteran pests of brassica crops to a range of baculoviruses, Biocontrol Sci. Techn., 9, 421-433.
- Kansu, İ.A., 1962. Besin çeşidinin tırtılların gelişmesine etkileri ve bu konuda *L. dispar* L. (Kıltırtılı) üzerinde araştırma, A. Ü. Ziraat Fak. Yıllığı, 2, 116-138, Ankara.
- Kaya, H.K., 1977. Transmission of a nuclear polyhedrosis virus isolated from *Autographa californica* to *Alsophila pumetaria*, *Hyphantria cunea*, and other forest defoliators, J. Econ. Entomol., 70, 9-12.
- Keating, S.T., Schultz, J.C. ve Yendol, W.G., 1990. The effect of Diet on Gypsy Moth (*Lymantria dispar*) Larval Midgut pH, and Its Relationship with Larval Susceptibility to a Baculovirus, J. Invertebr. Pathol., 56, 317-326
- Kessler, P. ve Zingg, D., 2008. New baculovirus products offer solutions for the biological control of *Cydia pomonella* and *Cryptophlebia leucotreta*, Proceedings of the 23rd International Congress of Entomology, Pest Management, Perennial Crops, Durban, South, Africa.
- King, L.A. ve Possee, R.D., 1992. The Baculovirus Expression System, Chapman and Hall, London.
- Kioukia, N., Nienow, A.W., Emery, A.N. ve Al-Rubeai, M., 1995. Physiological and environmental factors affecting the insect cells and infection with baculovirus, J. Biotech, 38, 243-251.
- Kirkpatrick, B.A., Washburn, J.O. ve Volkman, L.E., 1998. AcMNPV pathogenesis and developmental resistance in fifth instar *Heliothis virescens*, J. Invertebr. Pathol., 72, 63-72.
- Kiyota, R., Arakawa, M., Yamakawa, R., Yasmin, A. ve Ando, T., 2011. Biosynthetic pathways of the sex pheromone components and substrate selectivity of the oxidation enzymes working in pheromone glands of the fall webworm, *Hyphantria cunea*, Insect Biochem. Mol. Biol., 41, 362-369.
- Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B. ve Straus, S.E., 2007. Fields Virology (5 Edition). Lippincott Williams & Wilkins, 3177 sayfa, Philadelphia.

- Kolodny-Hirsch, D.M., Sitchawati T., Jansiri, T., Chenrchaivachirakul, A. ve Ketunuti, U., 1997. Field evaluation of a commercial formulation of the *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus for control of beet armyworm on vegetable crops in Thailand, Biocontrol Sci. Techn., 7, 475-488.
- Kolodny-Hirsch, D.M., Warkentin, D.L., Alvarado Rodri guez, B. ve Kirkland, R., 1993. *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus as a candidate viral insecticide for the beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae), J. Econ. Entomol., 86, 314-321.
- Kost, T.A., Condreay, J.P. ve Jarvis, D.L., 2005. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells, Nat. Biotechnol., 23, 5, 567-575.
- Kovacevic, Z., 1958. Pathogene Mikroorganismen als Begleiter und Mortalitätsfaktoren des amerikanischen Webewaren, *Hyphantria cunea* Drury, Anz. Schadlingskunde, 31, 148-150.
- Kovacevik, Z., 1960. Influence of weather and food on the occurrence and distribution of the American *H. cunea* in Yugoslavia, Z. Angew. Ent., 41, 113-410.
- Kuzio, J., Pearson, M.N., Harwood, S.H., Funk, C.J., Evans, J.T., Slavicek, J.M. ve Rohrmann, G.F., 1999. Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*, Virology, 253, 17-34.
- Lacey, L.A. ve Brooks, W.M., 1997. Initial Handling and Diagnosis of Diseased Insects, Editör: Lacey L.A., Manual of Techniques in Insect Pathology, Academic Press, New York, 1-15.
- 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, 3, 230-248.
- Lange, M., Wang, H., Zhihong, H. ve Jehle, J.A., 2004. Towards a molecular identification and classification system of lepidopteran-specific baculoviruses, Virology, 325, 36-47.
- Lapied, B., Pennetier, C., Apaire-Marchais, V., Licznar, P. ve Corbel, V., 2009. Innovative applications for insect viruses: towards insecticide sensitization. Trends Biotechnol., 27, 190-198.
- Lasa, R., Pagola, I., Ibanez, I., Belda, J.E., Williams, T. ve Caballero, P., 2007. Efficacy of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus as a biological insecticide for beet armyworm control in greenhouses of southern Spain, Biocontrol Sci. Techn., 17, 3, 221-232.
- Li, X. ve Benz, G., 1994. Restriction endonuclease analysis of the granulosis virus of *Adoxophyes orana*. F.V.R. (Lep., Tortricidae), Bull. OILB/SROP, 17, 244-247.
- Li, Y.P., Goto, M., Ito, S., Sato, Y., Sasaki, K. ve Goto, N., 2001. Physiology of diapause and cold hardiness in the overwintering pupae of the fall webworm *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae) in Japan, J. Insect Physiol., 47, 1181-1187.

- Liang, Z., Zhang, X., Yin, X., Cao, S. ve Xu, F., 2011. Genomic sequencing and analysis of *Clostera anachoreta* granulovirus, Arch. Virol., 156, 1185-1198.
- Lipa, J.J., 1975. An outline of Insect Pathology. Published for the U. S. Department of Agriculture and the National Science Foundation, Washington D. C., by the Foreign Scientific, Technical and Economic Information Warsaw, Poland.
- Liu, S., Vijayendran, D. ve Bonning, B.C., 2011. Next generation sequencing technologies for insect virus discovery, Viruses, 3, 10, 1849-1869.
- Lucarotti, C.J., Moreau, G. ve Kettela, E.G., 2007. Abietiv™, a viral biopesticide for control of the balsam fir sawfly, Editörler: Vincent C., Goethel M.S. ve Lazarovits G., Biological Control: A Global Perspective, Oxfordshire, UK, and Cambridge, USA, CAB International, 353-361.
- Luckow, V.A., 1991 Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors; in Recombinant DNA technology and applications, Editörler: Prokop A., Bajpai, R.K. ve Ho, C., New York, McGraw-Hill, 97-152.
- Luque, T., Finch, R., Crook, N., O'Reilly, D.R. ve Winstanley, D., 2001. The complete sequence of the *Cydia pomonella* granulovirus genome, J. Gen. Virol., 82, 2531-2547.
- Maori, E., Paldi, N., Shafir, S., Kalev, H., Tsur, E., Glick, E. ve Sela, I., 2009. Iapv, a bee-affecting virus associated with colony collapse disorder can be silenced by dsRNA ingestion, Insect Mol. Biol., 18, 55-60.
- Martens, J.W.M., Honee, G., Zuidema, D., van Lent, J.W.M., Visser, B. ve Vlak, J.M., 1990. Insecticidal activity of a bacterial crystal protein expressed by a recombinant baculovirus in insect cells. Appl. Environ. Microbiol., 56, 2764-2770.
- Martignoni, M.E. ve Iwai, P.J., 1981. A Catalogue of Viral, Editör: Burges, H.D., Academic Press Inc., London, United Kingdom, 897-911.
- McCarthy, C.B., Dai, X., Donly, C. ve Theilmann, D.A., 2008. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ac142, a core gene that is essential for BV production and ODV envelopment, Virology, 372, 325-339.
- McNeil, J., Cox-Foster, D., Gardner, M., Slavicek, J., Thiem, S. ve Hoover, K., 2010. Pathogenesis of *Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus in *L. dispar* and mechanisms of developmental resistance, J. Gen. Virol., 91, 1590-1600.
- McWilliam, A., Environmental impact of baculoviruses. http://www.fao.org/docs/eims/upload/agrotech/2003/R7299_FTR_anx3.pdf, 13,03,2018
- Miele, S.A.B., Garavaglia, M.J., Belaich, M.N. ve Ghiringhelli, P.D., 2011. Baculovirus: Molecular Insights on their Diversity and Conservation, Int. J. Evol. Biol., 2011, 15.

- Miller, L.K., 1997. The Baculoviruses. Plenum Press, New York, NY.
- Moore, S.D., 2002. The development and evaluation of *Cryptophlebia leucotreta* granulovirus (CrleGV) as a biological control agent for the management of false codling moth, *Cryptophlebia leucotreta* on citrus. In: PhD thesis, Rhodes University, s. 304.
- Moore, S., Kirkman, W. ve Stephen, P., 2004a. Cryptogran, A virus for the biological control of false codling moth, SA Fruit J., 35-39.
- Moore, S.D., Pittaway, T., Bouwer, G. ve Fourie, J.G., 2004b. Evaluation of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus, HaNPV, for control of *Helicoverpa annigera* Hubner (Noctuidae: Lepidoptera) on citrus in South Africa, Biocontrol Sci. Techn., 14, 3, 239-250.
- Moore, S. ve Kirkman, W., 2010. Helicovir™: A virus for the biological control of bollworm, SA Fruit J., 63-67.
- Moscardi, F. ve Sosa-Gómez, D.R., 1992. Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil, Editörler: Copping L.G., Green M.B. ve Rees R.T., Pest Management in Soybean, London, Elsevier, 98-109.
- Moscardi, F., 1999. Assesment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera, Ann. Rev. Entomol., 44, 257-289.
- Moscardi, F., 2007. A Nucleopolyhedrovirus for control of the velvetbean caterpillar in Brazilian Soybeans, Editörler: Vincent S.C., Goethel M.S. ve Lazarovits G., Biological Control- A Global Perspective, Oxfordshire, UK, and Cambridge, USA, CAB International, 344-352.
- Moscardi, F., Lobo de Souza, M., Batista de Castro, M.E., Moscardi, M.L. ve Szewczyk, B., 2011. Baculovirus Pesticides: Present state and future perspectives, Editörler: Ahmad I., Ahmad F. ve Pachtel J., Microbes and microbial technology, Springer.
- Murphy, F.A, Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A. ve Summers, M.D., 1995. Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag. Wien.
- Muthamia, E.K., Ogada, P.A., Mukunzu, M.J., Vanbeek, N.A.M., Wesonga, J.M. ve Ateka, E.M., 2011. Characterization of *Plutella xylostella* granulovirus (PLXYGV) isolates for the management of diamondback moth in Kenya, Afr. J. Hort. Sci., 4, 19-23.
- Naçacıoğlu, R., 2003. Chile iridescent virüs'ün *Bombyx mori* hücre kültüründe replikasyonu ve DNA pol ile mcp genlerinin transkripsiyonal analizi. Doktora tezi. K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.
- Oliver, A.D., 1964. A behavioral study of two races of the fall webworm, *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae), in Louisiana, Ann. Entomol. Soc. Am., 57, 192-194.

- O'Reilly, D.R., Miller, L.K. ve Luckow, V.A., 1992. Baculovirus Expression Vectors, Laboratory Manual, Oxford University Press, New York.
- Özay, F., 1997. Marmara Bölgesinde Söğütlerde Zarar Yapan Böcekler, Doktora Tezi, İ.Ü. Orman Fakültesi, İstanbul.
- Park, I K., Lee, H.S., Lee, S.G., Park, J.D. ve Ahn, Y.J., 2000. Antifeeding activity of isoquinoline alkaloids identified in *Coptis japonica* roots against *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae) and *Agelastica coerulea* (Coleoptera: Galerucinae), J. Econ. Entomol., 93, 331-335.
- Payne, C.C., 1982. Insect viruses as control agents, Parasitology, 84, 35-77.
- Phan, T.G., Nguyen, T.A., Yan, H., Yagyu, F., Kozlov, V., Kozlov, A., Okitsu, S., Müller, W.E. ve Ushuijma, H., 2005. Development of a novel protocol for RT-multiplex PCR to detect diarrheal viruses among infants and children with acute gastroenteritis in Eastern Russia, Clin. Lab., 51, 429-435.
- Possee, R.D. ve Rohrmann, G.F., 1997. Baculovirus genome organization and evolution. Editör: Miller, L.K., The Baculoviruses, Plenum Press, New York.
- Possee, R.D., 1997. Baculoviruses as expression vectors, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 569-572.
- Pritchett, D.W., Young, S.Y. ve Yearian, W.C., 1984. "Some factors involved in the dissolution of *Autographa californica* NPV by digestive fluids of *Trichoplusia ni* larvae", J. Invertebr. Pathol., 43, 160-168.
- Richter, A.R., Fuxa, J.R. ve Abdel-Fattah, M., 1987. Effect of host plant on the susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to a nuclear polyhedrosis virus, Environ. Entomol., 16, 1004-1006.
- Riley, C.V., 1887. The fall webworm, *Hyphantria cunea* (Drury), *H. textor* (Harris), In Fifth Rept. Entomol. Comm. USDA, 244-257.
- Rohrmann, G., 2013. Structural proteins of baculovirus occlusion bodies and virions. In: Baculovirus Molecular Biology. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), NCBI.
- Rohrmann, G., Pearson, M., Bailey, T., Becker, R. ve Beaudreau, G., 1981. N-terminal polyhedrin sequences and occluded Baculovirus evolution, J. Mol. Evol., 17, 329-333.
- Rohrmann, G.F., 1986. Polyhedrin structure, J. Gen. Virol., 67, 1499-1513.
- Sait, S.M., Begon, M. ve Thompson, D.J., 1994. The influence of larval age on the response of *Plodia interpunctella* to a granulosis virus, J. Anim. Ecol., 63, 107-110.

- Samuels, R.J. ve Paterson, I.C., 1995. Cuticle degrading proteases from insect molting fluid and culture filtrates of entomopathogenic fungi, Comp. Biochem. Physiology, 110, 661.
- Scheepens, M.H.M. ve Wysoki, M., 1989. Pathogenicity of AcMNPV for larvae of *Boarmia selenaria*, *Heliothis armigera*, *Heliothis peltigera*, *Spodoptera littoralis*, and *Ephestia cautella*, J. Invertebr. Pathol., 53, 183-189.
- Schmidt, L. ve Philips, G., 1958. Granulosis, a new virus disease of the fall webworm. Fac. Agr. Forestry. Inst. Ent. Zagreb, 1, 1-27.
- Selek, F., 1998. İzmit ve Adapazarı Yöresinde Kavaklarda Zarar Yapan Lepidoptera Türleri, Yüksek Lisans Tezi, İ.Ü. Orman Fakültesi, İstanbul.
- Sezen, K., 2004. Coleoptera Takımına Ait Fındık Zararlılarında Virüs Tespiti Ve Biyolojik Mücadelede Kullanım Potansiyeli. Doktora Tezi. K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.
- Shapiro, M., 1986. "In vivo" Production of Baculoviruses, Practical Applications for Insect Control, 2, 31-61.
- Slack, J. ve Arif, B.M., 2006. The Baculoviruses Occlusion-Derived Virus: Virion Structure and Function, Adv. Virus Res., 69, 99-165.
- Smits, P.H, Van de Vrie, M. ve Vlak, J.M., 1987a. Nuclear polyhedrosis virus for control of *Spodoptera exigua* larvae on glasshouse crops, Entomol. Exp. Appl., 43, 73-80.
- Smits, P.H., Vanvelden, M.C., Vandevrie, M., Vlak, J.M., 1987b. Feeding and dispersion of *Spodoptera exigua* larvae and its relevance for control with a nuclear polyhedrosis-virus, Entomol. Exper. Appl., 43, 67-72.
- Sporleder, M., Maritza, E., Cauti, R., Huber, J. ve Kroschel, J., 2007. Susceptibility of *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera; Gelechiidae) to its granulovirus PoGV with larval age, Agric. For. Entomol., 9, 271-278.
- Steinhaus, E.A., 1956. Microbial Control: The Emergence of an Idea, J. Agric. Sci., 26, 107-160.
- Stiles, B. ve Paschke, J.D., 1980. Midgut PH in Different Instars of Three, Aedes Mosquito Species and the Relation Between PH and Susceptibility of Larvae to a Nuclear Polyhedrosis Virus. J. Invertebr. Pathol., 35, 58-64.
- Suttle, C.A., 2005a. Viruses in the sea, Nature, 437, 356-361.
- Suttle, C.A., 2005b. Crystal ball. The viriosphere: The greatest biological diversity on earth and driver of global processes, Environ. Microbiol., 7, 481-482.
- Suttle, C.A., 2007. Marine viruses-Major players in the global ecosystem, Nat. Rev. Microbiol., 5, 801-812.

- Szewczyk, B., Hoyos-Carvajal, L., Paluszek, M., Skrzecz, I. ve Lobo de Souza, M., 2006. Baculoviruses-- re-emerging biopesticides. Biotechnol. Adv., 24, 143-160.
- Szewczyk, B., Lobo de Souza, M., Batista de Castro, M.E., Moscardi, M.L. ve Moscardi, F., 2011. Baculovirus Biopesticides. Editör: Stoytcheva M., Pesticides-Formulations, Effects, Fate, Publisher InTech, 21-36.
- Tadic, M.D., 1958. Biological control of the fall webworm, *Hyphantria cunea* (Dr.) in Europe, Proc. Tenth Internat. Congr. Eutomol., 4, 855-858.
- Tadic, M.D., 1960. Relative humidity of the air as a regulator of the fall webworm population, Report from the Laboratory for Biological Control, Institute for Plant Protection, Zemun, Yugoslavia, 697-700.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, N. ve Kumar, S., 2007. MEGA4: Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) Software Version 4.0., Mol. Biol. Evol., 24, 1596-1599.
- Tanada, Y. ve Kaya, H.K., 1993. Insect Pathology, Academic Press, Inc., San Diego, 666.
- Tinsley, T.W., 1979. The potential of insect pathogenic viruses as pesticidal agents. Ann. Rev. Entomol., 24, 63-87.
- Tomita, K.O. ve Ebihara, T., 1982. Cross-Transmission of the Granulosis Virus of the *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae), to other Lepidopterous insects species. Japanese J. Appl. Entomol. Zool., 26, 224-227.
- Toprak, U. ve Gürkan, M.O., 2004. First record of a NPV isolated from *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) in Turkey and its molecular identification according to the partial *lef-8* gene. Turk. J. Biol., 28, 71-77.
- Tothill, J.D., 1922. Natural control of the fall webworm, *Hyphantria cunea* (Drury), in Canada together with an account of its several parasites, Canada Dept. Agr., Bull., 3, 1-107.
- Trang, T. ve Chaudhari, S., 2002. Bioassay of nuclear polyhedrosis virus (npv) and in combination with insecticide on *Spodoptera litura* (Fab), Omonrice, 10, 45-53.
- Treacy, M.F., All, J.N. ve Kukel, C.R., 1997. Invertebrate selectivity of a recombinant baculovirus: Case study on AaHIT gene-inserted *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, New Developments in Entomology, Research Signpost, London, 57-68.
- Tuncer, C. ve Kansu, İ.A., 1994. Konukçu bitkilerin *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera, Arctiidae)'ya etkileri üzerine araştırmalar, Türk. Entomol. Derg., 18, 4, 209-222.

URL-1, <https://bugguide.net/node/view/898151/bgimage> 27,02,2018

URL-2, <http://pest.ceris.purdue.edu/pest.php?code=ITABAIA> 27,02,2018

- URL-3, https://www.researchgate.net/profile/Celal_Tuncer/publication/287330633_Amerikan_Beyaz_Kelebegi_Hyphantria_cunea_Drury_Lepidoptera_Arctiidae_veMucadele_Yontemleri/links/567574a308ae0ad265c0d75b/Amerikan-Beyaz-Kelebegi-Hyphantria-cunea-Drury-Lepidoptera-Arctiidae-ve-Mucadele-Yontemleri.pdf, 27,02,2018
- Uygun, N., 1975. Besinin böcekler üzerindeki etkileri. Ç. Ü. Zir. Fak. Yıllığı, 6, 2, 99-115.
- Vail, P.V. ve Jay, D.L., 1973. Pathology of a nuclear polyhedrosis virüs of the alfalfa looper in alternate hosts, J. Invertebr. Pathol., 21, 198-204.
- Van Der Plank, J.E., 1963. Plant Disease: Epidemics and Control, Academic Press, N. Y., 349 s.
- Van der Werf, W., De Moed, G.H. ve Smits, P.H., 1991. A comprehensive simulation model of the epidemiology of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus on beet armyworm in glasshouse chrysanthemums, IOBC/WPRS Bull., XIV, 108-117.
- Van Oers, M.M., 2011. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system, J. Invertebr. Pathol., 107, 3-15.
- Vasconcelos, S.D., Williams, T., Hails, R.S. ve Cory, J.S., 1996. Prey selection and baculovirus dissemination by carabid predators of Lepidoptera, Ecol. Entomol., 21, 98-104.
- Vasiljevic, L., 1968. Utijac virusa granuloze dudovca (*Hyphantria cunea* DRURY) na gusenice svilene bube (*Bombyx mori* L.) I kupusara (*Pierris rapae* L.), Plant Protect. Beograd, 98, 29-40.
- Vincent, C., Andermatt, M. ve Valéro, J., 2007. Madex® and VirosoftCP4®, viral biopesticides for codling moth control, Editörler: Vincent C., Goethel M.S. ve Lazarovits G., Biological Control- A Global Perspective, Oxfordshire, UK, and Cambridge, USA, CAB International, 336-343.
- Vlak, J. M., ve Keus, A.R. 1990. The baculovirus expression vector system for production of viral vaccines, Adv. Biotechnol. Process, 14, 91-127.
- Volkman, L.E., Blissard, G.W., Friesen, P., Keddie, B.A., Possee, R. ve Theilmann, D.A., 1995. Family Baculoviridae, Editörler: Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A. ve Summers M.D., Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses, Vienna & New York, Springer-Verlag, 104-113.
- Warren, L.O. ve Tadic, M., 1970. The fall webworm *Hyphantria cunea*, in Arkansas, University of Arkansas Agricultural Experiment Station Bulletin, 759, 1-106

- Washburn, J.O., Chan, E.Y., Volkman, L.E., Aumiller, J.J. ve Jarvis, D.L., 2003. Early synthesis of budded virus envelope fusion protein GP64 enhances *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus virulence in orally infected *Heliothis virescens*, J. Virol., 77, 280-290.
- Watanabe, H. ve Kobayashi, M., 1970. Histopathology of a granulosis in the larva of the fall webworm, *Hyphantria cunea*, J. Invertebr. Pathol., 16, 71-79.
- Weiser, J., 1962. Biological insect control, Adv.Biol. Sci., Praha, 123-133.
- Weiser, J., 1969. An Atlas of Insect Diseases, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague.
- Weiser, J., 1958. Report on research work of the laboratory of insect pathology 1957-1958, Czechoslovak Acad. Sci. Inst. Biol., 1-48.
- Wen, R., Ou, R. ve Chen, B., 2007. Identification, transcriptional and phylogenetic analysis of the DNA polymerase gene of *Pieris rapae* granulovirus, Virus Genes, 34, 351-358.
- Willis, L.G., Siepp, R., Stewart, T.M., Erlandson, M.A. ve Theilmann, D.A., 2005. Sequence analysis of the complete genome of *Trichoplusia ni* Single Nucleopolyhedrovirus that contains a baculoviral photolyase gene, Virology, 338, 209-226.
- Wormleaton, S., Kuzio, J. ve Winstanley, D., 2003. The complete sequence of the *Adoxophyes orana* granulovirus genome, Virology, 311, 350-365

8. EKLER

EK 1.

```
GGACCTGGCAAAAATGTTAGGATCACTTTGTTCAAAGAGATTCGTTCGCGTCC
AGCCAGACACTTTGAAATTAGTTTGCAATTGGAGCGGAAAGGAATTTTACG
CGAAACTTGGACTCGGTTTATTTGCGAGGAGTTCCCCATCACTACAGACCAG
GAAATCATGGATTTGTGGTTTCAAATTAACCTTTTACCCATGCACCCAAATC
GCCGCTACAAATTTTGTGCAATATGCTCTATGTGCACCGCCAGGCTACAT
CGCTCACGATGTTATAAGAGCACAAGATCCTTATTATGTAGGATCCGACAAC
ACGGAACGCATCAACTTGACTCGAAAGGGATGCGCGTTCCCACATAACATGCT
TACAGGCAGCTTACAACGATTGTTTCGAAAAATTCTTTGACAATTTCTTATG
GCCCTATTTCTATAGACCATTGGTTTGGGTAGGCACCACTT
```

Ek1. Şekil 1. Hc1 numaralı suşa ait *gran* geninin baz sırası

```
GCGGAGGATCCGTTTCGTGGACCTGGCAAAAATGTTAGGATCACTTTGTTCA
AAGAGATTCGTTCGCGTCCAGCCAGACACTTTGAAATTAGTTTGCAATTGGAG
CGGAAAGGAATTTTACGCGAAACTTGGACTCGGTTTATTTGCGAGGAGTTC
CCCATCACTACAGACCAGGAAATCATGGATTTGTGGTTTCAAATTAACCTTT
TACCCATGCACCCAAATCGCTGCTACAAATTTTGTGCAATATGCTCTATG
TGCACCGCCAGGCTACATCGCTCACGATGTTATAAGAGCACAAGATCCTTAT
TATGTAGGATCCGACAACACGGAACGCATCAACTTGACTCGAAAGGGATGCG
CGTTCCCACATAACATGCTTACAGGCAGCTTACAACGATTGTTTCGAAAAATT
CTTTGACAATTTCTTATGGCCCTATTTCTATAGACCATTGGTTTGGGTAGGC
ACCACTTCTGGC
```

Ek1. Şekil 2. Hc2 numaralı suşa ait *gran* geninin baz sırası

```
GGACCTGGCAAAAATGTTAGGATCACTTTGTTCAAAGAGATTCGTTCGCGTCC
AGCCAGACACTTTGAAATTAGTTTGCAATTGGAGCGGAAAGGAATTTTACG
CGAAACTTGGACTCGGTTTATTTGCGAGGAGTTCCCCATCACTACAGACCAG
GAAATCATGGATTTGTGGTTTCAAATTAACCTTTTACCCATGCACCCAAATC
GCCGCTACAAATTTTGTGCAATATGCTCTATGTGCACCGCCAGGCTACAT
CGCTCACGATGTTATAAGAGCACAAGATCCTTATTATGTAGGATCCGACAAC
ACGGAACGCATCAACTTGACTCGAAAGGGATGCGCGTTCCCACATAACATGCT
TACAGGCAGCTTACAACGATTGTTTCGAAAAATTCTTTGACAATTTCTTATG
GCCCTATTTCTATAGACCATTGGTTTGGGTAGGCACCACTTCTGGCGAAGTG
GAGGAA
```

Ek1. Şekil 3. Hc3 numaralı suşa ait *gran* geninin baz sırası

GAAGATGCGTTTTCGTGGACGTGGCAAAAATGTTAGGATCACTTTGTTCAAAG
 AGATTTCGTAGCGTCCAGCCAGACACTTTGAAATTAGTTTGCAATTGGAGCGG
 AAAGGAATTTTTACGCGAAACTTGGAGTTGGTTTATTTGGGAGGAGTTCCCC
 ATCACTACAGACCAGGAAATCATGGATTTGTGGTTTGAAATTAACATTTTAC
 CCATGCACCCAAATCGTCGCTACAAATTTTTGTTGCAATATGCTTTATGTGC
 ACCGCCAGGCTACATCGCTCACGATGTTATAAGAGCACAAGATCCTTATTAT
 GTAGGATCCGGCAACACGGAACGCATCAACTTGACTCGAAAGGGATGCGCGT
 TCCCCTAACATGGTTACAGGCAGGCTACAACGATTGGTTTCGAAAAATTCTT
 TGACAATTTTCTATGGCCGCACTTATATAGACCATTGGTTTGGGTAGGCACC
 ACTTCACGCGAAGGGATGAAACTCAATGTAAGCTCTAATATCCCCGCAGTCT

Ek1. Şekil 4. Hc4 numaralı suşa ait *gran* geninin baz sırası

AATTAGGAGGCACAGTCGAGGGGCGGAGGACCCGTTTCGTGGACCTGGCAAA
 AATGTTAGGATCACTTTGTTCAAAGAGATTTCGTGCGTCCAGCCAGACACTT
 TGAAATTAGTTTGCAATTGGAGCGGAAAGGAATTTTTACGCGAAACTTGGAC
 TCGGTTTATTTGCGAGGAGTTCCCCATCACTACAGACCAGGAAATCATGGAT
 TTGTGGTTTGAAATTAACATTTTACCCATGCACCCAAATCGCTGCTACAAAT
 TTTTGTGCAATATGCTCTATGTGCACCGCCAGGCTACATCGCTCACGATGT
 TATAAGAGCACAAGATCCTTATTATGTAGGATCCGACAACACGGAACGCATC
 AACTTGACTCGAAAGGGATGCGCGTTCCCCTAACATGCTTACAGGCAGCTT
 ACAACGATTGTTTCGAAAAATTCTTTGACAATTTCTATGGCCCTATTTCTA
 TAGACCATTGGTTTGGGTAGGCACCACTTCTGGCGAAGTGGAGGAAATTTTG
 ACTGAAGTTCTCTTATCATCCGAGATGTTA

Ek1. Şekil 5. Hc5 numaralı suşa ait *gran* geninin baz sırası

CTAAGCTGATGTTAGGATCACTTTGTTCAAGAGATTTCGTGCGTCCAGCCAG
 ACACTTTGAAATTAGTTTGCAATTGGAGCGGAAAGGAATTTTTACGCGAAAC
 TTGGACTCGGTTTATTTGCGAGGAGTTCCCCATCACTACAGACCAGGAAATC
 ATGGATTTGTGGTTTGAAATTAACATTTTACCCATGCACCCAAATCGCTGCT
 ACAATTTTTGTTGCAATATGCTCTATGTGCACCGCCAGGCTACATCGCTCA
 CGATGTTATAAGAGCACAAGATCCTTATTATGTAGGATCCGACAACACGGAA
 CGCATCAACTTGACTCGAAAGGGATGCGCGTTCCCCTAACATGCTTACAGG
 CAGCTTACAACGATTGTTTCGAAAAATTCTTTGACAATTTCTATGGCCCTA
 TTTCTATAGACCATTGGTTTGGGTAGGCACCACTTCTGGCGAAGTGGAGGAA

Ek1. Şekil 6. Hc6 numaralı suşa ait *gran* geninin baz sırası

```

GTGGGGCCGGGGAAGAATGTTAGGATCACTTTGTTCAAAGAGATTTCGTCGCG
TCCAGCCAGACACTTTGAAATTAGTTTGCAATTGGAGCGGAAAGGAATTTTT
ACGCGAAACTTGGACTCGGTTTATTTGCGAGGAGTTCCCCATCACTACAGAC
CAGGAAATCATGGATTTGTGGTTTGAATTAACCTTTTACCCATGCACCCAA
ATCGCTGCTACAAATTTTTGTTGCAATATGCTCTATGTGCACCGCCAGGCTA
CATCGCTCACGATGTTATAAGAGCACAAGATCCTTATTATGTAGGATCCGAC
AACACGGAACGCATCAACTTGACTCGAAAGGGATGCGCGTTCCCACTAACAT
GCTTACAGGCAGCTTACAACGATTGTTTCGAAAAATTCTTTGACAATTCCT
ATGGCCCTATTTCTATAGACCATTGGTTTGGGTAGGCACCACTTCTGGCGAA
GTGGAGGAAATTT

```

Ek1. Şekil 7. Hc7 numaralı suşa ait *gran* geninin baz sırası



EK 2.

```

GCAGACGTGGCGGTAAAATTTTTTTTGTGCCACAACACCACGTTACCTGACG
TGAATTACAAACATGTTAACGAGCTGTTTCACTTATTAATAAATAAAAAATT
GTTATTTAACAATAAAACCAACGATACCTGTGAAAATTGCGACCAAGATTTT
AATTGTAATTCTGATCCGGCAGAAAAATCTTTTTTTAAAAATTATAATTTGC
ACAATATCGAGCCCAAAATTAAAACAAAAGACCCGACCCGCAAGCTTTTAGT
GTCTTTTAACAATAGGCCAACAATATTTTGGTGCACCCAGTCGAATGTTTGC
CGAATTTATTATTACGTTAAACGAAACATGTCCCCAGTTGAGGTAAAATGA
ATGACAACACATTATTTTTTAAACCACCACGAAGGTATGATTATGTTGCGCAA
AGTTGTGGAAATTGATAAAGAAATTTAAATTAACACACTTCAAACCTCCATTT
GAGTATCATAATGAAAAAAGTGTGGTGAACATGTTGTCAGTTTTTGGAAATTT
GCGACAACGACGACGACATTGTTTCACTTACGTCCACCATTGTTCAAATAA
CTACAAAAATTATTTGCACATTTTTTATTCGATTCCCTTACCCAAGTTAATT
GTGAGCCTGACTAATTTGAAAAACGGTATGGTTGTTCAAACACCTTTAAAT
TAAATCTTTAGATTATTTACCTCTAGGCACTAGCGTGACCGTAAGTCCATC
TATGATGTGCAACGACCGCATGTTTTATCTGTGGACTCTAGTGCGCGATAAT
AAACTGAAAACGGCCGAGGACCCTTACGTGCATGCCAAAAACCTTTTAAAT
TTTTT

```

Ek2. Şekil 1. Hc1 numaralı suşa ait *lef-8* geninin baz sırası

```

GTGACCGGGCGGTGGCGGGAAATTTTTTTTGTGCCACAACACCACGTTACCT
GACGTGAATTACAAACATGTTAACGAGCTGTTTCACTTATTAATAAATAAAA
AATTGTTATTTAACAATAAAACCAACGATACCTGTGAAAATTGCGACCAAGA
TTTTAATTGTAATTCTGATCCGGCAGAAAAATCTTTTTTTAAAAATTATAAT
TTGCACAATATCGAGCCCAAAATTAAAACAAAAGACCCGACCCGCAAGCTTT
TAGTGTCTTTTAACAATAGGCCAACAATATTTTGGTGCACCCAGTCGAATGT
TTGCCGAATTTATTATTACGTTAAACGAAACATGTCCCCAGTTGAGGTAAA
ATGAATGACAACACATTATTTTTTAAACCACCACGAAGGTATGATTATGTTGC
GCAAAGTTGTGGAAATTGATAAAGAAATTTAAATTAACACACTTCAAACCTC
ATTTGAGTATCATAATGAAAAAAGTGTGGTGAACATGTTGTCAGTTTTTGGAA
TTTTGCGACAACGACGACGACATTGTTTCACTTACGTCCACCATTGTTCAA
ATTACTACAAAAATTATTTGCACATTTTTTATTCGATTCCCTTACCCAAGTT
AATTGTGAGCCTGACTAATTTGAAAAACGGTATGGTTGTTCAAACACCTTTA
AAATTTAAATCTTTAGATTATTTACCTCTAGGCACTAGCGTGACCGTAAGTC
CATCTATGATGTGCAACGACCGCATGTTTTATCTGTGGACTCTAGTGCGCGA
TAATAAACTGAAAACGGCTGAGGACCCTTACGTCCATGCCAAAAACTCTGTA
TAAACCCACCCCAAAAAAATTCAGGTAA

```

Ek2. Şekil 2. Hc2 numaralı suşa ait *lef-8* geninin baz sırası

TGGACCGAGCGTGCGGGTAAATTTTTTTTGTGCCACAACACCACGTTACCT
GACGTGAATTACAAACATGTTAACGAGCTGTTTCACTTATTAATAAATAAAA
AATTGTTATTTAACAATAAAACCAACGATACCTGTGAAAATTGCGACCAAGA
TTTTAATTGTAATTCTGATCCGGCAGAAAAATCTTTTTTTAAAAATTATAAT
TTGCACAATATCGAGCCCCAAAATTTAAACAAAAGACCCGACCCGCAAGCTTT
TAGTGTCTTTTAACAATAGGCCAACAATATTTTGGTGCACCCAGTCGAATGT
TTGCCGAATTTATTATTACGTTAAACGAAACATGTCCCCAGTTGAGGTAAA
ATGAATGACAACACATTATTTTTAAACCACCACGAAGGTATGATTATGTTGC
GCAAAGTTGTGGAAATTGATAAAGAAATTTAAATTAACACACTTCAAACCTCC
ATTTGAGTATCATAATGAAAAAGTGTGGTGAACATGTTGTCAGTTTTGGAA
TTTTGCGACAACGACGACGACATTGTTTCACTTACGTCCACCATTGTTCAA
ATTACTACAAAAATTATTTGCACATTTTTTATTTCGATTCCCTTACCCAAGTT
AATTGTGAGCCTGACTAATTTGAAAAACGGTATGGTTGTTCAAACACCTTTA
AAATTTAAATCTTTAGATTATTTACCTCTAGGCACTAGCGTGACCGTAAGTC
CATCTATGATGTGCAACGACCGCATGTTTTATCTGTGGACTCTAGTGCGCGA
TAATAAACTGAAAACGGCTGAGGACCCTTACGTCCTGCAACACCGGTGTGTA
TATAAATACCCCCCTAAAAAAAATATTGGAAA

Ek2. Şekil 3. Hc3 numaralı suşa ait *lef-8* geninin baz sırası

GGGCCGGTGCGTGCGGCATAATTTTTTTTGTGCCACAACACCACGTTACCT
GACGTGAATTACAAACATGTTAACGAGCTGTTTCACTTATTAATAAATAAAA
AATTGTTATTTAACAATAAAACCAACGATACCTGTGAAAATTGCGACCAAGA
TTTTAATTGTAATTCTGATCCGGCAGAAAAATCTTTTTTTAAAAATTATAAT
TTGCACAATATCGAGCCCCAAAATTTAAACAAAAGACCCGACCCGCAAGCTTT
TAGTGTCTTTTAACAATAGGCCAACAATATTTTGGTGCACCCAGTCGAATGT
TTGCCGAATTTATTATTACGTTAAACGAAACATGTCCCCAGTTGAGGTAAA
ATGAATGACAACACATTATTTTTAAACCACCACGAAGGTATGATTATGTTGC
GCAAAGTTGTGGAAATTGATAAAGAAATTTAAATTAACACACTTCAAACCTCC
ATTTGAGTATCATAATGAAAAAGTGTGGTGAACATGTTGTCAGTTTTGGAA
TTTTGCGACAACGACGACGACATTGTTTCACTTACGTCCACCATTGTTCAA
ATTACTACAAAAATTATTTGCACATTTTTTATTTCGATTCCCTTACCCAAGTT
AATTGTGAGCCTGACTAATTTGAAAAACGGTATGGTTGTTCAAACACCTTTA
AAATTTAAATCTTTAGATTATTTACCTCTAGGCACTAGCGTGACCGTAAGTC
CATCTATGATGTGCAACGACCGCATGTTTTATCTGTGGACTCTAGTGCGCGA
TAATAAACTGAAAACGGCCGAGGACCCTTACGTACCTGCCATAAACTTGTTA
AAAACCACCAGCCCGGAAAAAAA

Ek2. Şekil 4. Hc4 numaralı suşa ait *lef-8* geninin baz sırası

CTTTGGACGGTGCGGTGGCGGGAAAATTTTTTTTGTGCCACAACACCACGTT
 ACCTGACGTGAATTACAAACATGTTAACGAGCTGTTTCACTTATTAATAAAT
 AAAAAATTGTTATTTAACAATAAAACCAACGATACCTGTGAAAATTGCGACC
 AAGATTTTAATTGTAATTCTGATCCGGCAGAAAAATCTTTTTTTAAAAATTA
 TAATTTGCACAATATCGAGCCCAAATTTAAAACAAAAGACCCGACCCGCAAG
 CTTTTAGTGTCTTTTAACAATAGGCCAACAAATATTTGGTGCACCCAGTCGA
 ATGTTTGCCGAATTTATTATTACGTTAAACGAAACATGTCCCCAGTTGAGGT
 TAAAATGAATGACAACACATTATTTTTTAAACCACCACGAAGGTATGATTATG
 TTGCGCAAAGTTGTGGAATTTGATAAAGAAATTTAAAATTAACACACTTCAA
 CTCCATTTGAGTATCATAATGAAAAAAGTGTGGTGAACATGTTGTCAGTTTT
 GGAATTTTGCGACAACGACGACGACATTGTTTCACTTACGTCCACCATTGTT
 CAAAATTAATAAAAAATTATTTGCACATTTTTTTATTTCGATTCCCTTACCCA
 AGTTAATTGTGAGCCTGACTAATTTGAAAAACGGTATGGTTGTTCAAACACC
 TTTAAAATTTAAAATCTTTAGATTATTTACCTCTAGGCACTAGCGTGACCGTA
 AGTCCATCTATGATGTGCAACGACCGCATGTTTTATCTGTGGACTCTAGTGC
 GCGATAATAAACTGAAAACGGCTGAGGACCCTTACGTACCATGGCAATAAGC
 TGTTAAGCTTTTCCACG

Ek2. Şekil 5. Hc5 numaralı suşa ait *lef-8* geninin baz sırası

GGCTAAGTCGTGGCGGTACATTTTTTTTGTGCCACAACACCACGTTACCTGA
 CGTGAATTACAAACATGTTAACGAGCTGTTTCACTTATTAATAAATAAAAA
 TTGTTATTTAACAATAAAACCAACGATACCTGTGAAAATTGCGACCAAGATT
 TTAATTGTAATTCTGATCCGGCAGAAAAATCTTTTTTTAAAAATTTATAATTT
 GCACAATATCGAGCCCAAATTTAAAACAAAAGACCCGACCCGCAAGCTTTTA
 GTGTCTTTTAACAATAGGCCAACAAATATTTGGTGCACCCAGTCGAATGTTT
 GCCGAATTTATTATTACGTTAAACGAAACATGTCCCCAGTTGAGGTTAAAAT
 GAATGACAACACATTATTTTTTAAACTACCACAAAGGTATGATTATGTTGCGC
 AAACGTTGTGGACATTGATAAAAAACCTTATATTAACCCCATCTAATTTCC
 TTTTGTTTTACACAATCAACACACCGTGGTTATTTAAGCTTGCCTCAACAGC
 AAGTCTGTGCCACCCTAAAACCTCAAAGGCTCACGTGTGTGAGCATTTT
 GCAGACAAACAATGAAGATAAACTTCCCGCTATCTACTGACCCCTAAAAT
 ACCTATGGCTGGC

Ek2. Şekil 6. Hc6 numaralı suşa ait *lef-8* geninin baz sırası

```

GAGGAGTCTAGTCGATGGCAGGACGATTTTTTTTTGTGCCACAACACCACGTT
ACCTGACGTGAATTACAAACATGTTAACGAGCTGTTTCACTTATTAATAAAT
AAAAAATTGTTATTTAACAATAAAACCAACGATACCTGTGAAAATTGCGACC
AAGATTTTAATTGTAATTCTGATCCGGCAGAAAAATCTTTTTTTAAAAATTA
TAATTTGCACAATATCGAGCCCAAATTAAAACAAAAGACCCGACCCGCAAG
CTTTTAGTGTCTTTTAACAATAGGCCAACAAATATTTGGTGCACCCAGTCGA
ATGTTTGCCGAATTTATTATTACGTAAACGAAACATGTCCCAGTTGAGGT
TAAATGAATGACAACACATTATTTTTAAACCACCACGAAGGTATGATTATG
TTGCGCAAAGTTGTGGAATTGATAAAGAAATTAATAACACACTTCAA
CTCCATTTGAGTATCATAATGAAAAAGTGTGGTGAACCAGTTGTCAGCCCT
GGAATTTTGCCACAACGACCAACACATAGTTTCACTTACGTCCACCATTGTT
CAAAATTTATACAAAACTACTTGCTCACTTAATTT

```

Ek2. Şekil 7. Hc7 numaralı suşa ait *lef-8* geninin baz sırası

EK 3.

```

AAGAATGGGTATGCGGGTCAGTATTTGTATTCTACTTTTTTAAACACATCAA
GTTTTTACACCAACGTTTCAGTGTATGAACGGTATAAACGAAATAGTGCCACC
TCTTGCTGCGGTCCAACGCTACTATGGTTCGTGAGGATATGACCAAGTGTCGA
GCGTGGAACACCAGACATCCTAACATTTTCGCAACTGTCCACACAATATTCGC
GCGTGACGGTGAGTAACGACATACTTAATTGGAACGTCAAAGTGGGCTTGGG
CACATTTGTGCGTCATCGCATGCG

```

Ek3. Şekil 1. Hc1 numaralı suşa ait *lef-9* geninin baz sırası

```

GGTATGCGGGGATCAGGAAACAGCTATGACCAAGAATGGGTATGCGGGTCAG
TATTTGTATTCTACTTTTTTAAACACATCAAGTTTTTACACCAACGTTTCAGT
GTATGAACGGTATAAACGAAATAGTGCCACCTCTTGCTGCGGTCCAACGCTA
CTATGGTTCGTGAGGATATGACCAAGTGTGAGCGTGGAACACCAGACATCCT
AACATTTTCGCAACTGTCCACACAATATTCGCGCGTGACGGTGAGTAACGACA
TACTTAATTGGAACGTCAAAGTGGGCTTGGGCACATTGTGGCGTCAATCGGA
AATACGT

```

Ek3. Şekil 2. Hc2 numaralı suşa ait *lef-9* geninin baz sırası

```

AAACAGCTATGACCAAGAATGGGTATGCTGTTTCCAGGAAACAGCTATGACC
AAAAACGGGTACGCCGGTCAGTATTTGTATTCTACTTTTTTAAACACATCAA
GTTTTTACACCAACGTTTCAGTGTATGAACGGTATAAACGAAATAGTGCCACC
TCTTGCTGCGGTCCAACGCTACTATGGTTCGTGAGGATATGACCAAGTGTCGA
GCGTGGAACACCAGACATCCTAACATTTTCGCAACTGTCCACACAATATTCGC
GCGTGACGGTGAGTAACGACATACTTAATTGGAACGTCAAAGTGGGCTTGG
GCA

```

Ek3. Şekil 3. Hc3 numaralı suşa ait *lef-9* geninin baz sırası

```

TTTTAAAGATGTTTCTAGGAAACAGCTATGACCAAGAATGGGTACGCCGGTCA
GTATTTGTATTCTACTTTTTTAAACACATCAAGTTTTTACACCAACGTTTCAG
TGTATGAACGGTATAAACGAAATAGTGCCACCTCTTGCTGCGGTCCAACGCT
ACTATGGTTCGTGAGGATATGACCAAGTGTGAGCGTGGAACACCAGACATCC
TAACATTTTCGCAACTGTCCACACAATATTCGCGCGTGACGGTGCAGTAACGA
CATACTTAATTGGAACGTCAAAGTGGGCTTGGGCACATTGTGGCGACATCCG
CGATATCGTG

```

Ek3. Şekil 4. Hc4 numaralı suşa ait *lef-9* geninin baz sırası

```

GGAAACAGCTATGACCAAGAATGGGTATGCGGGTCAGTATTTGTATTCTACT
TTTTTAAACACATCAAGTTTTTACACCAACGTTTCAGTGTATGAACGGTATAA
ACGAAATAGTGCCACCTCTTGCTGCGGTCCAACGCTACTATGGTCGTGAGGA
TATGACCAAGTGTGAGCGTGGAACACCAGACATCCTAACATTTTCGCAACTG
TCCACACAATATTCGCGCGTGACGGTGAGTAACGACATACTTAATTGGAACG
TCAAAGTGGGCTTGGGCACATTGTGCACATCGCGAATGGG

```

Ek3. Şekil 5. Hc5 numaralı suşa ait *lef-9* geninin baz sırası

```

CCAAAAACGGGTCGCCGTGATCAGGAAACAGTATGACCAAGAATGGGTACGC
GGGTCAGTATTTGTATTCTACTTTTTTAAACACATCAAGTTTTTACACCAAC
GTTTCAGTGTATGAACGGTATAAACGAAATAGTGCCACCTCTTGCTGCGGTCC
AACGCTACTATGGTCGTGAGGATATGACCAAGTGTGAGCGTGGAACACCAG
ACATCCTAACATTTTCGCAACTGTCCACACAATATTCGCGCGTGACGGTGAGT
AACGACATACTTAATTGGAACGTCAAAGTGGGCTTGGGCACATTGTGGCACA
TCGGATTGGG

```

Ek3. Şekil 6. Hc6 numaralı suşa ait *lef-9* geninin baz sırası

```

CTACGGGGTGGCATTTTTTAGGAAACAGCTATGACCAAAAATGGGTATGCGGG
TCAGTATTTGTATTCTACTTTTTTAAACACATCAAGTTTTTACACCAACGTT
CAGTGTATGAACGGTATAAACGAAATAGTGCCACCTCTTGCTGCGGTCCAAC
GCTACTATGGTCGTGAGGATATGACCAAGTGTGAGCGTGGAACACCAGACA
TCCTAACATTTTCGCAACTGTCCACACAATATTCGCGCGTGACGGTGAGTAAC
GACATACTTAATTGGAACGTCAAAGTGGGCTTGGGCACATTTGTGCGTCATC
GCATG

```

Ek3. Şekil 7. Hc7 numaralı suşa ait *lef-9* geninin baz sırası

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Trabzon'da doğdu. 1992-1994 yılları arasında Avusturya Hans Sachs Volksschule İlk Okulu'nda, devamında 1994-2000 yılları arasında 100. Yıl İlköğretim Okulu'nda ilköğretim eğitimini tamamladı. Lise eğitimini 2000-2003 yılları arasında Trabzon Lisesi'nde tamamladı. 2004-2005 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Giresun Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde lisans öğrenimine başladı. 2008 yılında mezun oldu. 2008-2009 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 2012 yılında Yüksek Lisans eğitimini tamamladıktan sonra 2013 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimine başladı. Evli ve bir çocuk annesidir, yabancı dili İngilizcedir.

Yayınlari:

Makaleler:

- Bayramoğlu, Z.**, Demir, İ., İnan, C. ve Demirbağ, Z., 2018. Efficacy of native entomopathogenic nematodes from Turkey against the alder leaf beetle, *Agelastica alni* L. (Coleoptera: Chrysomelidae), under laboratory conditions. Egyptian Journal of Biological Pest Control, doi: 10.1186/s41938-017-0021-0.
- Gencer, D., **Bayramoğlu, Z.**, Nalcacioglu, R., Kleespies, R.G., Demirbag, Z. ve Demir, I., 2018. Characterisation of three Alphabaculovirus isolates from the gypsy moth, *Lymantria dispar dispar* (Lepidoptera: Erebidae), in Turkey, Biocontrol Science and Technology, 28: 170-121.
- Bayramoğlu, Z.**, Gencer, D., Muratoglu, H., Efe, D., Nalcacioglu, R., Demirbag, Z. ve Demir, I., 2018. Characterization of a nucleopolyhedrovirus variant of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) in Turkey, International Journal of Pest Management, doi: 10.1080/09670874.2017.1344789.
- Erbaş, Z.**, Demir, İ. ve Demirbağ, Z., 2017. Isolation and Characterization of a Parasitic Nematode, *Oscheius myriophila* (Nematoda: Rhabditida), Associated with European Mole Cricket, *Gryllotalpa gryllotalpa* (Orthoptera: Gryllotalpidae), Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, 45, 2, 197-203.
- Ozkan Cakici, F., Ozgen, I., Bolu, H., **Erbaş, Z.**, Demirbag, Z.ve Demir, I., 2014. Highly effective bacterial agents against *Cimbex quadrimaculatus* (Hymenoptera: Cimbicidae): isolation of bacteria and their insecticidal activities, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 31, 1, 59-67.
- Gökçe, C., **Erbaş, Z.**, Yılmaz, H., Demirbağ, Z. ve Demir, İ., 2014. A new entomopathogenic nematode species from Turkey, *Steinernema websteri* (Rhabditida: Steinernematidae), and its virulence, Turkish Journal of Biology, 39, 1, 167-174.

- Erbaş, Z.**, Gökçe, C., Hazır, S., Demirbağ, Z. ve Demir, İ., 2014. Isolation and identification of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) from the Eastern Black Sea region and their biocontrol potential against *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 38, 187-197.
- Gokce, C., Yılmaz, H., **Erbaş, Z.**, Demirbag, Z. ve Demir, I., 2013. First Record of *Steinernema kraussei* (Rhabditida: Steinernematidae) from Turkey and its Virulence against *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae), Journal of Nematology, 45, 4, 253-259.
- Sevim, A., Gökçe, C., **Erbaş, Z.** ve Özkan, F., 2012. Bacteria from *Ips sexdentatus* (Coleoptera: Curculionidae) and their biocontrol potential, Journal of Basic Microbiology, 52 , 6, 695-704.