

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**





KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORCID : - - -

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /

Tezin Savunma Tarihi : / /

Tez Danışmanı :

ORCID : - - -

Trabzon

ÖNSÖZ

“*Heliothis* (Yeşilkurt) (Lepidoptera: Noctuidae) Türlerinin Viral Patojenlerinin Araştırılması” adlı bu Doktora Tezi ülkemizde tarım ürünlerine zarar veren *Helicoverpa/Heliothis* türlerinin biyolojik mücadelesi hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK, Proje numarası: 118Z003) ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: FDK-2016-5468 ve FBA-2019-8123). Desteklerinden dolayı TÜBİTAK ve KTÜ-BAP birimine teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca hiç bir konuda desteğini esirgemeyen, bitip tükenmeyen enerjisi ve mütevazı kişiliğiyle bir bilim adamının nasıl olması gerektiğini bana öğreten danışman hocam Sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, çalışmalarım ile ilgili önerilerde bulunan tez izleme jürisi üyelerim Sayın Prof. Dr. İsmail DEMİR’e ve Sayın Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU’na, laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’na ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Cihan İNAN’a, bölümün alt yapı imkanlarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Bilal KUTRUP’a, çalışmalarımın bir kısmını Tokyo Ziraat Fakültesindeki laboratuvarında yapmam için bana burs imkanı sağlayan Prof. Dr. Madoka NAKAI’ye, arazi çalışmalarında örneklerin toplanmasına yardımcı olan Sayın Dr. Şebnem TİRENG KARUT’a ve bugünlere gelmemde büyük emeği geçen, her zaman maddi-manevi desteklerini gördüğüm annem Sevinç ELÇİN, babam Salih ELÇİN, abim Barış ELÇİN, eşim Erkan EROĞLU ve kızım Ada EROĞLU’na teşekkür ederim.

Gözde Büşra EROĞLU

Trabzon 2020

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “*Heliothis* (Yeşilkurt) (Lepidoptera: Noctuidae) Túrlerinin Viral Patojenlerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’ın sorumluluğunda tamamladığımı, örnekleri kendim topladığımı, deneyleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 18.06.2020

Gözde Büşra EROĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	IX
SUMMARY	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XIII
SEMBOLLER DİZİNİ	XIV
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Yeşilkurtlar (<i>Helicoverpa/Heliothis</i> , Lepidoptera: Noctuidae).....	3
1.2.1. Yeşilkurtların Dağılımı.....	3
1.2.2. Yeşilkurtların Yaşam Döngüsü	4
1.2.3. Yeşilkurtların Ekonomik Önemi	6
1.2.4. Yeşilkurtlarla Mücadele	7
1.3. Böceklerde Enfeksiyona Neden Olan Virüsler.....	8
1.4. Böceklerde Virüs Taraması	9
1.5. Bakülovirüsler	10
1.5.1. Bakülovirüslerin Morfolojisi	12
1.5.2. Bakülovirüslerin Taksonomisi.....	14
1.5.3. Bakülovirüslerin Evrimi	16
1.5.4. Bakülovirüslerin Enfeksiyon Döngüsü.....	17
1.5.5. Bakülovirüslerin Yatay ve Dikey Yayılımı	20
1.5.6. Bakülovirüslerin Genom Özellikleri	21
1.5.7. Yeşilkurt Kökenli Bakülovirüsler.....	24
1.5.8. Bakülovirüslerin Biyolojik Mücadelede Kullanılabilirliği.....	26
1.5.9. Bakülovirüs Kaynaklı Biyopestisitlerin Geliştirilmesi.....	29
1.6. Tezin Amacı	32
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	34

2.1.	Yeşilkurtların Araziden Toplanması	34
2.2.	Yeşilkurtların Laboratuvarda Yetiştirilmesi	34
2.3.	Virüs Taraması	35
2.3.1.	Mikroskopik Yöntemle Virüs Taraması	35
2.3.2.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemiyle Virüs Taraması	35
2.4.	Virüs İzolatlarının Çoğaltılması ve Saflaştırılması	37
2.5.	Virüs İzolatlarının Tanımlanması	38
2.5.1.	Mikroskopik Yöntemlerle Virüs İzolatlarının Tanımlanması	38
2.5.1.1.	Işık Mikroskopisi	38
2.5.1.2.	Elektron Mikroskopisi	38
2.5.1.2.1.	Taramalı Elektron Mikroskopisi	38
2.5.1.2.2.	Transmisyon Elektron Mikroskopisi	39
2.5.2.	Moleküler Yöntemlerle Virüs İzolatlarının Tanımlanması	39
2.5.2.1.	DNA ekstraksiyonu	39
2.5.2.2.	Hedef Gen Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonuyla Çoğaltılması	40
2.5.3.	Virüs İzolatlarının Filogenetik Analizi	40
2.5.4.	Virüs İzolatlarının Kimura-2 Parametre Analizi	41
2.5.5.	Virüs İzolatlarının Restriksiyon Endonükleaz Profili	41
2.6.	Virüs İzolatlarının Virülans Özelliklerinin Belirlenmesi	42
2.6.1.	Tarama Testleri	42
2.6.2.	Doz Denemeleri	42
2.7.	Genom Analizi	42
2.7.1.	DNA Ekstraksiyonu ve Konsantrasyon Tayini	43
2.7.2.	Genom Dizilemesi	43
2.7.2.1.	Viral DNA'nın Kalite Tayini	44
2.7.2.2.	Dizi Analizi	44
2.8.	Viral Genomun Biyoinformatik Analizi	45
2.8.1.	Açık Okuma Zincirlerinin (ORF) Belirlenmesi	45
2.8.2.	Genlerin Adlandırılması	45
2.8.3.	Kimura-2 Parametre Analizi	46
2.8.4.	Homolog Tekrar Bölgelerinin Belirlenmesi	46
2.8.5.	Fonksiyonel Genlerin Tespiti	46

2.8.6.	Filogenetik Analiz	47
2.8.7.	Gen Benzerlik Analizi	47
2.8.8.	Restriksiyon Endonükleaz Profili	47
2.9.	Virüs İzolatından Biyopreparat Hazırlanması	48
2.9.1.	Stok Virüs Üretimi	48
2.9.1.1.	Virüs Çoğaltılması ve PIB Saflaştırılması	48
2.9.1.2.	Konsantrasyon Tayini	49
2.9.2.	Yağ Tabanlı Formülasyon Hazırlanması	49
2.9.3.	Ultraviyole-B ve Sıcaklık Deneyleri	50
2.9.4.	Doz Denemesi	50
2.9.5.	Saksı Denemesi	51
2.9.6.	Veri Analizleri	51
3.	BULGULAR	52
3.1.	Virüs Tespiti	52
3.2.	İzolatların Gömülü Yapılarının Morfolojik Özellikleri	54
3.3.	Virüs İzolatlarının Moleküler Özellikleri	57
3.3.1.	Virüs İzolatlarının Filogenetik Analizleri	57
3.3.2.	Virüs İzolatlarının Restriksiyon Endonükleaz Profilleri	59
3.4.	Virüs İzolatlarının Virülans Özellikleri	60
3.5.	Genom Analizi	63
3.5.1.	DNA ekstraksiyonu ve Konsantrasyon Tayini	63
3.5.2.	Viral Genomun Biyoinformatik Analizi	63
3.5.2.1.	Açık Okuma Zincirleri (ORF)	63
3.5.2.2.	Genlerin Adlandırılması	65
3.5.2.3.	Homolog Tekrar Bölgeleri	72
3.5.2.4.	Fonksiyonel Genlerin Tespiti	72
3.5.2.5.	Filogenetik Analiz	75
3.5.2.6.	Gen Benzerlik Analizi	82
3.5.2.7.	Restriksiyon Endonükleaz Profili	82
3.6.	Virüs İzolatından Biyopreparat Hazırlanması	85
3.6.1.	Ultraviyole-B ve Sıcaklığa Dirençli Formülasyon	85
3.6.2.	Hazırlanan Biyopreparatın <i>H. armigera</i> Larvaları Üzerinde Etkili Dozu	86

3.6.3.	Biyopreperatın Saksı Ölçeğinde <i>H. armigera</i> Larvaları Üzerindeki Etkisi.....	87
4.	TARTIŞMA.....	89
5.	SONUÇLAR.....	100
6.	ÖNERİLER	102
7.	KAYNAKLAR.....	103
ÖZGEÇMİŞ		



Doktora Tezi

ÖZET

HELIOTHIS (YEŞİLKURT) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) TÜRLERİNİN VİRAL PATOJENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gözde Büşra EROĞLU

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ
2020, 125 Sayfa

Yeşilkurt (*Helicoverpa/Heliothis* sp., Lepidoptera: Noctuidae) türleri dünyanın her yerinde kozmopolit olarak bulunan polifag tarım zararlılarıdır. Yeşilkurtlarla mikrobiyal mücadele amacıyla planlanan bu tez çalışmasında, 5 nükleopolihedrovirüs (NPV) izolatu tespit edildi, tanımlandı ve virülansları belirlendi. En etkili olan izolattan biyopestisit geliştirildi. İzolatların inklüzyon cisimciklerinin boyutlarının 0.73 - 2.26 µm arasında, nükleokapsit boyutlarının ise 146 × 34 nm ile 279 × 56 nm arasında olduğu belirlendi. Filogenetik analizlerde, izolatların *Helicoverpa armigera* NPV (HearNPV) Çin izolatına yakın olduğu görüldü. Biyotestler sonucunda, HearNPV-TR izolatının tüm türlerde %80'in üzerinde ölüm gösterdiği belirlendi. Biyopestisit olarak geliştirilmesine karar verilen HearNPV-TR izolatının genomunun 130.691 baz çifti olduğu belirlendi. Genomda bulunan homolog tekrar bölgelerinin (hr3 ve hr5) ve bakülovirüs tekrar genlerinin (*bro-a*) literatürdeki *Helicoverpa/Heliothis* NPV genomlarından farklı olduğu görüldü. HearNPV-TR formülasyonunun üçüncü dönem *H. armigera* larvaları üzerinde LC₅₀ değeri, 1.9 × 10⁴ olarak hesaplandı. Bu çalışma ile ülkemizdeki *Helicoverpa/Heliothis* türlerinden bakülovirüs izolasyonları gerçekleştirildi ve tüm özellikleriyle tanımlanan HearNPV-TR izolatından *Helicoverpa/Heliothis* türlerinin biyokontrolleri amacıyla etkili ve yerel bir mikrobiyal mücadele etmeni ilk defa geliştirildi.

Anahtar Kelimeler: Yeşilkurt, bakülovirüs, biyopestisit, yağ formülasyonu, genom analizi

PhD. Thesis

SUMMARY

INVESTIGATION OF VIRAL PATHOGENS OF *HELIOTHIS* (COTTON BOLLWORM) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) SPECIES

Gözde Büşra EROĞLU

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ
2020, 125 Pages

The cotton bollworm (*Helicoverpa/Heliothis* sp., Lepidoptera: Noctuidae) species are found cosmopolitan all over the world. In this thesis study, aimed to develop a microbial biocontrol system for cotton bollworms, 5 nucleopolyhedrovirus (NPV) isolates were identified and their virulence were determined. The biopesticide was developed from the most effective isolate. The sizes of the inclusion bodies of the isolates were determined between 0.73 - 2.26 μm , and the nucleocapsid dimensions were between 146 \times 34 nm and 279 \times 56 nm. In phylogenetic analysis, it was observed that the isolates were more close to the *Helicoverpa armigera* NPV (HearNPV) Chinese isolate. As a result of biotests, over 80% mortality with HearNPV-TR isolate was determined against all species. The genome of the HearNPV-TR, which was decided to be developed as a biopesticide, was found to be 130,691 base pairs. The homologous repeat regions (hr3 and hr5) and baculovirus repeat genes (*bro-a*) in the genome were found to be different than *Helicoverpa/Heliothis* NPV genomes in the literature. LC_{50} value of the HearNPV-TR formulation on third instar *H. armigera* larvae was calculated as 1.9×10^4 . In this study, baculovirus isolations from *Helicoverpa/Heliothis* species in our country were performed, they were identified in detail and a microbial insecticide was developed from HearNPV-TR isolate for the control of *Helicoverpa/Heliothis* species.

Key words: Cotton bollworm, baculovirus, biopesticide, oil formulation, genome analysis

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Yeşilkurt türlerinin dünyadaki dağılımı.	4
Şekil 2. Yeşilkurt türlerinin morfolojisi.	5
Şekil 3. Yeşilkurtların yaşam döngüsü.	6
Şekil 4. Yeşilkurtların ürün zararı.	7
Şekil 5. Bakülovirüs morfolojisinin şematik görünümü.....	13
Şekil 6. Bakülovirüslerin sınıflandırılması.	14
Şekil 7. Bakülovirüs gruplarındaki BV'lerin apikal uç görünümü.....	15
Şekil 8. Autographa californica MNPV (AcMNPV)'ye ait BV'nin yapısal modeli.	15
Şekil 9. Bakülovirüs ile enfekte olan bir böceğin boyuna kesiti.	17
Şekil 10. Bakülovirüs enfeksiyon döngüsü.	19
Şekil 11. Bakülovirüslerin yatay ve dikey yayılımı.	20
Şekil 12. Genom analizi yapılan bakülovirüslerin dağılımı.	21
Şekil 13. Büyük ölçekli bakülovirüs üretimi için böcek yetiştirme ortamı.	27
Şekil 14. Bakülovirüs formülasyonu hazırlama süreci.	29
Şekil 15. Genom analizi iş akışı.	43
Şekil 16. Dizileme ve analiz iş akışı.	44
Şekil 17. Formülasyon çalışmaları iş akışı.	48
Şekil 18. Yeşilkurt larvalarında virüs enfeksiyonları.	53
Şekil 19. Helicoverpa/Heliothis NPV örneklerinin ışık mikroskobu görüntüleri.	54
Şekil 20. Helicoverpa/Heliothis NPV'lerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.....	55
Şekil 21. Helicoverpa/Heliothis NPV'lerin geçirimli elektron mikroskobu görüntüleri.	56
Şekil 22. Helicoverpa/Heliothis NPV'lerin <i>polh</i> , <i>lef8</i> , <i>lef9</i> genlerine göre filogenetik analizleri.	57
Şekil 23. Helicoverpa/Heliothis NPV izolatlarının <i>KpnI</i> restriksiyon endonükleaz profilleri.....	59
Şekil 24. Helicoverpa/Heliothis NPV izolatlarının yeşilkurt larvaları üzerindeki tarama testleri.	61
Şekil 25. HearNPV-TR izolatının yeşilkurt larvaları üzerindeki doz denemeleri.	62
Şekil 26. Genomik DNA dizileme için hazırlanan DNA'nın agaroz jel analizi.....	63
Şekil 27. HearNPV-TR'nin halkasal genom haritası.....	64
Şekil 28. HearNPV-TR genomunun bilinen bakülovirüs genomları ile filogenetik olarak karşılaştırılması.	76

Şekil 29. HearNPV-TR'nin gen benzerlik analizi.....	82
Şekil 30. HearNPV-TR genomu ile diğer Heliothis NPV genomlarının <i>in silico</i> restriksiyon endonükleaz profilleri.....	83
Şekil 31. Hazırlanan biyopreparatlarının ve ticari ürünün, UVB'ye dayanıklılığının karşılaştırılması.	86
Şekil 32. Hazırlanan Helicopel biyopreparatının ve ticari ürünün, larvalar üzerindeki doz denemeleri.	87
Şekil 33. Hazırlanan Helicopel biyopreparatının ve ticari ürünün, saksı denemesi sonucunda larvalar üzerindeki ölüm oranları.	88
Şekil 34. Hazırlanan Helicopel biyopreparatının ve ticari ürünün zararının karşılaştırılması.	88
Şekil 35. <i>Bro</i> genlerinin filogenetik analizi.....	95



TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Böcek patojeni virüs aileleri ve özellikleri.....	8
Tablo 2. Bakülovirüslerin kullanıldığı çalışma alanları.	12
Tablo 3. Bakülovirüs kor genleri ve fonksiyonları.....	22
Tablo 4. Genom analizi yapılan Helicoverpa/Heliothis NPV'ler.....	24
Tablo 5. Bakülovirüs orjinli bazı ticari biyopestisitler ve üreticileri.....	26
Tablo 6. Bakülovirüs formülasyonlarında kullanılan katkı maddeleri ve görevleri.....	30
Tablo 7. Helicoverpa/Heliothis NPV orjinli bazı ticari ürünler.	32
Tablo 8. Virüs taramasında kullanılan primerler.	36
Tablo 9. Filogenetik analizde kullanılan Heliothis NPV izolatları.	40
Tablo 10. Hazırlanan Helicopel biyopreparatının içeriği.	49
Tablo 11. Arazi çalışmalarında toplanan yeşilkurt örneklerine ait veriler.	52
Tablo 12. Yeşilkurt örneklerinden elde edilen viral enfeksiyon kaynakları.....	53
Tablo 13. Helicoverpa/Heliothis NPV izolatlarının boyutları.....	56
Tablo 14. Helicoverpa/Heliothis NPV örneklerinin kısmi <i>polh</i> , <i>lef8</i> , <i>lef9</i> gen bölgelerine göre Kimura-2 analizi.	58
Tablo 15. Helicoverpa/Heliothis NPV izolatlarının restriksiyon fragmentleri.....	60
Tablo 16. HearNPV-TR izolatının yeşilkurt larvaları üzerindeki doz denemeleri.....	62
Tablo 17. HearNPV-TR genomunun ORF pozisyonları.	66
Tablo 18. HearNPV-TR genomundaki fonksiyonel genlerin sınıflandırılması.....	73
Tablo 19. Filogenetik analizde kullanılan bakülovirüs genomları.	77
Tablo 20. HearNPV-TR'nin Kimura-2 parametre analizi.	81
Tablo 21. HearNPV-TR genomu ile diğer Heliothis NPV genomlarının restriksiyon kesim noktaları.....	84
Tablo 22. Hazırlanan Helicopel biyopreparatının ve ticari ürünün, larvalar üzerindeki ölüm oranları.	87
Tablo 23. HearNPV-TR, HasNPV, C1,G4, AU genom özellikleri.	96

SEMBOLLER DİZİNİ

AT	: Adenin timin
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
dk	: Dakika
Edta	: Etilendiamin tetraasetik asit
EtOH	: Etil alkol
GC	: Guanin sitozin
kb	: kilobaz
NaCl	: Sodyum klorür
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
PBS	: Fosfat tuzu tamponu
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
ORF	: Açık okuma zinciri
U	: Ünite
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
µg	: Mikrogram
µM	: Mikromolar
µm	: Mikrometre
mm	: Milimetre
cm	: Santimetre
nm	: Nanometre
ng	: Nanogram
gr	: Gram
M	: Molar
mM	: Milimolar
°C	: Santigrat Derece

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Tarımsal üretim, insanların hem besin hem de geçim kaynağını oluşturan çok önemli bir unsurdur. Dünyada nüfusun artması ile doğru orantılı olarak tarım ürünlerine olan ihtiyaç da her geçen yıl artmaktadır. Türkiye, gerek yüksek tarımsal potansiyeli gerekse ekilebilir mevcut arazileri ile tarımsal üretimin yoğun olarak yapıldığı ülkelerin başında gelmektedir. Ancak, üretim sürecinde ürünlerin zarar görmesine neden olan pek çok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler arasında da en büyük payı zararlı böcek popülasyonları oluşturmaktadır. Tarım ürünlerinde yaklaşık 500'ün üzerinde zarar oluşturan böcek türü bulunmaktadır (Hekimoğlu ve Altındağ, 2006). Dünyada her yıl tarım zararlısı böceklerin kontrolü için milyarlarca dolar harcanmaktadır (Krattiger, 1996). Bu harcamaya rağmen, özellikle gelişmekte olan ülkelerde ürün kaybı %40'ı bulmaktadır (Oerke, 2006).

Uzun yıllardır üreticilerin, ürün kaybını önlemek amacıyla en çok başvurduğu yöntem, kimyasal mücadele olmuştur (Brooke ve Hines, 1999). Kimyasal mücadele kısa vadede hem uygulanması kolay hem de zararlılarla mücadelede başarılı bir yöntem olarak görülse de uzun vadede çok önemli sorunlara yol açmaktadır. Kimyasal ilaçlar, zamanla böceklerin direnç kazanmasına ve hedef organizmaya özgü olmadığı için doğadaki yararlı böceklerin ölmesine neden olmaktadır (Fitt, 1994; Haq vd., 2004). Ayrıca, uygulama sonrasında toprakta birikerek ve havaya ve suya karışarak hem bitkilere hem de diğer omurgalı canlılara zarar vermektedir. Zamanla insan vücudunda birikmesi de pek çok hastalığa sebep olmaktadır. Bu durum ekolojik dengenin bozulmasına sebep olmakla birlikte canlıların sağlığına da zarar vermektedir. Ayrıca, ihraç edilmek üzere hazırlanan ürünler üzerinde kalan kimyasal madde kalıntıları pek çok ülke tarafından ürünlerin red edilmesine sebep olmaktadır. Böylece, tarım zararlısı böceklerin kontrolünde kimyasal mücadele yerine alternatif olarak kullanılacak biyolojik mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi ihtiyacı doğmuştur.

Biyolojik mücadele, hedef organizmanın popülasyonunu kontrol altına almak için predatör, parazitoit veya patojen gibi doğal düşmanların kullanılmasıdır. Biyolojik

mücadelede predatörler ve parazitoitler, hedef organizmaya karşı faydalı böceklerin kullanılmasına dayalı bir yöntem iken, patojenler hedef organizmanın hastalanmasına veya ölmesine sebep olan mikroorganizmalardan oluşmaktadır. Bu mikroorganizmalar mantar, nematod, bakteri, protozoa ve virüs kaynaklı olup, zararlı böcek popülasyonlarını kısa sürede ekonomik zarar eşiğinin altına indirebilen biyoinsektisitlerdir (Ibaraa ve Castero, 2008). Bu patojenlerin, kimyasal maddelerin aksine sadece konağa özel olmaları, hedef olmayan canlılar üzerinde zarar oluşturmamaları, doğada kalıntı bırakmamaları, çevre dostu ve güvenilir olmaları nedeniyle yaygın olarak kullanılma potansiyelleri üzerine yapılan araştırmalar önem kazanmıştır (URL 1). Biyolojik mücadelede kullanılan etmenlerden virüsler, tarım ve orman zararlılarının doğal patojenleri olup, doğrudan hedef organizma üzerinde etkili olmaktadır. Ayrıca, insanlar ve diğer omurgalı canlılar üzerinde enfeksiyon yapmazlar ve çevreyi kirletici etkileri bulunmaz. Bu nedenle etkili ve güvenilir bir biyolojik mücadele materyali olarak tercih edilmektedir (Demirbağ ve Beldüz, 1997).

Yeşilkurtlar (*Helicoverpa/Heliothis*), Noctuidae familyasında bulunan kozmopolit ve polifag tarım zararlılarını içermektedir (Koçlu ve Karsavuran, 2000; Konuş vd., 2014). Kışı toprakta pupa olarak geçiren ve Nisan ayının başlarında erginleşen böceklerin, yaz boyunca 5-6 nesli görülmektedir. Tarım ürünlerinde zarar yapan yaşam formu larvalardır. Birinci ve ikinci dönemde yapraklarla beslenen larvalar daha sonra pamuk, marul, ayçiçeği, çeltik, domates, biber, patlıcan, karpuz, bamya, nohut ve mercimek gibi ürünleri delip içine girerek orada beslenmektedir. Bir meyveden diğerine geçmek suretiyle de birçok meyvenin zarar görüp çürümesine neden olmaktadır. Popülasyonun yüksek olduğu yerlerde yeniden ürün ekimi gerektirecek kadar önemli zarar meydana getirebilmektedirler. Yeşilkurtların doğal düşmanları olarak, parazitoit bir arı olan *Habrobracon hebetor* ve predatör böcekler olan *Crysopa* spp., *Orius* spp., *Geocaris* sp. ve *Coccinella* sp. türleri bilinmektedir. Ancak bunların şu ana kadar verimli bir biyolojik mücadele materyali olarak geliştirilmeleri mümkün olamamıştır (Yassin, 2013). Yeşilkurtlar ile mücadelede en çok kullanılan yöntem kimyasal mücadeledir. Yılda birçok kez ürünlere kimyasal ilaç uygulaması yapılmaktadır. Ülkemizde, 2010 verilerine göre yeşilkurtlara karşı kullanılan 19 adet kayıtlı kimyasal ilaç bulunmaktadır (Anonim, 2010). Ancak son yıllarda pek çok ülkede yeşilkurtların kimyasal ilaçlara karşı direnç geliştirdiği bildirilmiştir (Joussen ve Heckel, 2016). Bu durum sonucunda, direnç geliştiren larvalara uygulanan ilaç miktarı gittikçe artmakta ve kimyasal ilaçların tarım ürünleri üzerindeki kalıntısı daha fazla olmaktadır. Ayrıca, doğa ve insan sağlığı üzerinde de daha ciddi

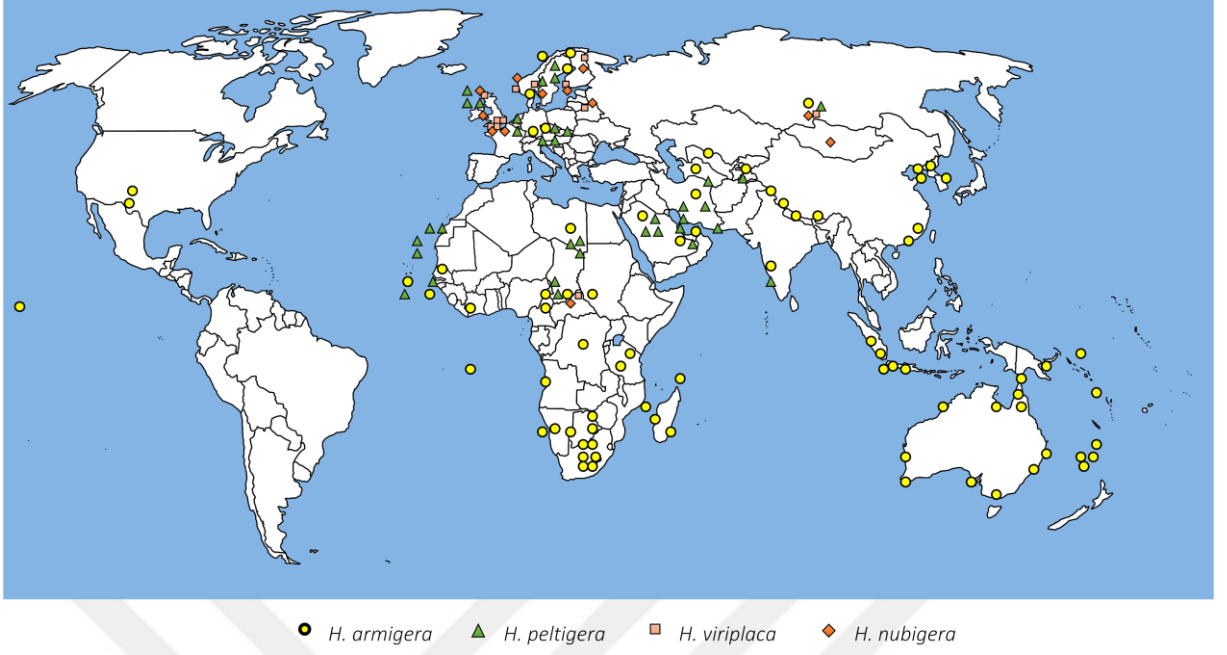
boyutta zararlar oluşturmaktadır. Bu durum, hem ülkemizde hem de dünyada yeşilkurtlara karşı çevre dostu alternatif kontrol sistemlerinin geliştirilmesine ihtiyacı artırmıştır.

1.2. Yeşilkurtlar (*Helicoverpa/Heliothis*, Lepidoptera: Noctuidae)

Noctuidae familyası, 4200 cinse bağlı 35.000'den fazla türe sahip olan en büyük Lepidoptera grubudur (Kitching ve Rawlins, 1998; Tarauş, 2012). Yumurta, larva, pupa ve ergin olmak üzere 4 ayrı hayat formu bulunur (Kayci, 2009). Erginleri gündüz kuytu yerlerde saklanır, geceleri aktif olarak uçuş yapar. Bu nedenle gececil anlamına gelen 'Noctuid' ismini almıştır (Tarauş, 2012). Larvalarının birçoğu ormancılık ve tarım alanlarında ürünlere yapmış oldukları zarardan dolayı uzun yıllardan beri zirai mücadele çalışmalarının konusu olmuştur (Mol, 1976). Noctuidae ailesi içinde tarım ürünlerine en çok zarar veren cinslerden birisi yeşilkurtlardır (Meierrose vd., 1989). Özellikle *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea* ve *Heliothis virescens* dünyada en çok mücadele edilmeye çalışılan yeşilkurt türleridir (Wolfenbarger vd., 1981; Georgheiou, 1986). Ülkemizde 4 adet yeşilkurt türü (*Helicoverpa armigera*, *Heliothis peltigera*, *Heliothis nubigera* ve *Heliothis viriplaca*) bulunur (Yaşarakıncı vd., 1990; Ünlü, 1996; Kaya ve Kovancı, 2000; Tezcan, 2010). Bu türlerin hepsi polifag ve kozmopolit olmasına rağmen *H. armigera*'nın dünyadaki dağılımı diğerlerinden daha geniştir (Şekil 1) (Liu vd., 2004; Krinski ve Godoy, 2015; Mironidis ve Savopoulou-Soultani, 2008).

1.2.1. Yeşilkurtların Dağılımı

H. armigera, Güney Avrupa'da (İspanya, Portekiz ve Yunanistan), Güney Asya'da (Çin, Hindistan ve Tayland), Güney ve Doğu Afrika'da ve Avustralya'da; *H. Peltigera*, Güney Asya, Orta ve Güney Avrupa'da; *H. nubigera* ve *H. viriplaca* ise Portekiz, İspanya ve Afrika'da bulunur (Monteiro, 1959; Gomez ve Arroyo, 1981, Vargas ve Cabello, 1985) (Şekil 1).



Şekil 1. Yeşilkurt türlerinin dünyadaki dağılımı

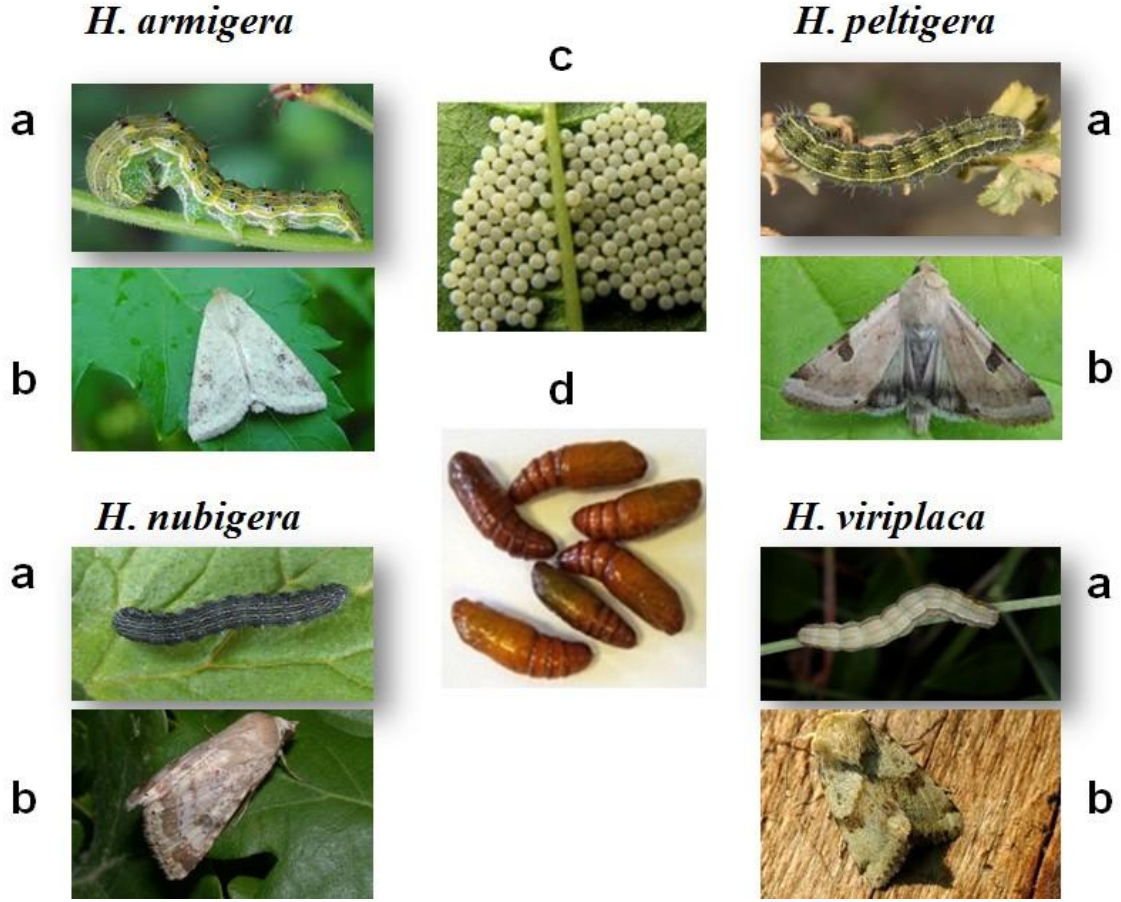
Ayrıca ülkemizdeki tüm *Helicoverpa/Heliothis* türleri, özellikle Çukurova, Ege ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde yetiştirilen birçok ürüne zarar vermektedir (Uygun vd., 1998; Tiftikçi ve Kornoşor, 2015).

1.2.2. Yeşilkurtların Yaşam Döngüsü

Yeşilkurt türleri kışı toprakta pupa olarak geçirir. Erginler havalarda ısınması ile birlikte yaz başında görülürler ve genellikle akşam saatlerinde aktif olurlar. Ergin dişi, bir sezonda 400-2200 adet yumurta bırakabilir. Bitkilerin üzerine tek tek bırakılmış olan yumurtalar, 5-10 gün içinde açılır. Larvalar, gelişmesini 13-26 günde tamamlar ve 6 dönem geçirerek olgun hale gelir. Olgunlaşan larva toprağın 5-10 cm derinliğinde bir yuva hazırlar ve bu yuva içinde pupa olur. Pupa süresi, 12-25 gündür. Türlerin döl sayıları bölgelere göre değişmektedir.

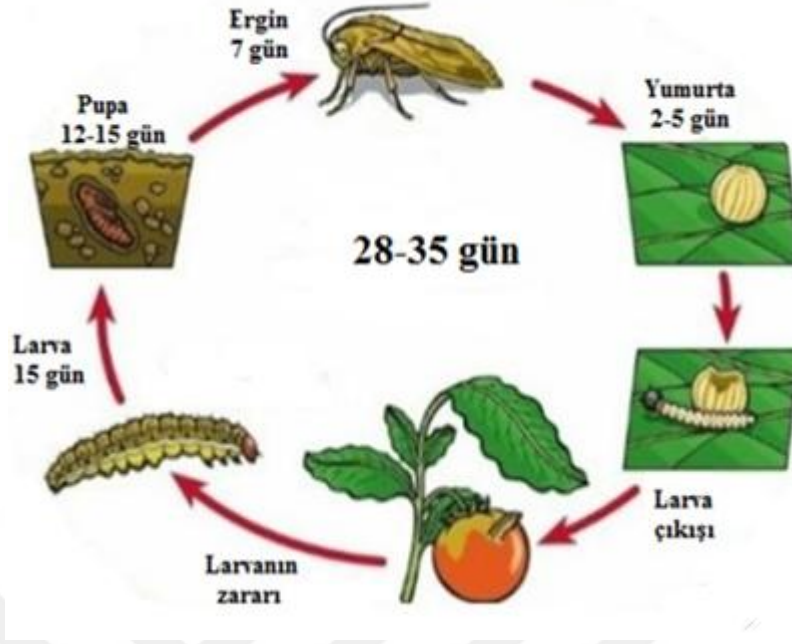
Yeşilkurt türlerinde son evresine gelen bir larvanın boyu, 30-45 mm arasında olup, rengi siyah, yeşil ya da sarı olabilmektedir (Şekil 2a). Erginler, 35-40 mm kanat açıklığında bir kelebeğdir (Şekil 2b). Yumurtalar, 0.5-0.7 mm çapında, krem renkli ve küre

şeklindedir (Şekil 2c). Yumurtadan yeni çıkan larvaların boyları, 1.5-2.0 mm arasında olup, beyaz renklidir. Pupalara ise, 20-23 mm arasında olup, kahverengidir (Şekil 2 d).



Şekil 2. Yeşilkurt türlerinin morfolojisi. a. larva, b. ergin, c. yumurta, d. pupa

H. armigera, Adana'da yılda 5, Bursa'da 4, Manisa'da ise 4-5 döl vermektedir (Yabaş, 1979; Kaya ve Kovancı, 2000; Koçlu ve Karsavuran, 2000). Uygun koşullar altında tüm gelişme dönemi 1 aydan daha kısa sürede tamamlanmaktadır (Şekil 3).



Şekil 3. Yeşilkurtların yaşam döngüsü

1.2.3. Yeşilkurtların Ekonomik Önemi

Yeşilkurtlar, dünyada her yıl milyonlarca dolar zarara sebep olan önemli bir gruptur (Moscardi vd., 2011). Erginleri günün karanlık periyodunda faaliyet gösterirler ve gündüzleri aktiviteleri çok azdır. Genel olarak günün karanlık periyodunda pupadan erginlerin çıktığı ve yumurta bıraktığı bilinmektedir (Yabaş, 1979). Erginlerin yumurtalarını genellikle taze yapraklara bırakmasından dolayı zarar önce yapraklarda başlar. Larvalar, yaprakların sadece damarları kalacak şekilde hatta damarların bir kısmını da yiyerek ürün kaybına neden olurlar. İlerleyen dönemde larvalar bitkinin üst kısmına yönelerek çiçek tomurcuğunda, tohum ve kapsülünde de beslenmeye başlarlar. Yenen çiçekler genellikle tohum kapsülü oluşturamadıkları için ürün verimi doğrudan etkilenmektedir. Tohum kapsülleri oluştuktan sonra da, larvanın kapsülleri delerek beslenmesi sonucu zarar oluşur (Öngören vd., 1977; Tunç, 1988). Larvalar bir meyveden diğerine geçmek suretiyle de birçok meyvenin zarar görüp çürümesine neden olmaktadır. Popülasyonun yüksek olduğu yerlerde yeniden ürün ekimi gerektirecek kadar önemli zarar meydana getirebilirler (Şekil 4).



Şekil 4. Yeşilkurtların ürün zararı

Yeşilkurt larvaları, geniş bir bitki yelpazesinde beslenmelerini sağlayan iyi gelişmiş detoksifikasyon sistemlerine sahiptir. Üreme koşulları zayıfladığında ise farklı yerlere göç edebilmektedir (Fitt, 1989). Başlıca pamuk, mısır, tütün, domates bitkilerinin bulunduğu 49 bitki familyasının 181 türüne zarar verdiği bilinmektedir (Sivakumar vd., 2007).

1.2.4. Yeşilkurtlarla Mücadele

Yeşilkurtlar ile mücadelede en çok kullanılan yöntem kimyasal mücadeledir. Ürünlere yılda birçok kez kimyasal ilaç uygulaması yapılmaktadır. Piretroidler, kinolfos, monokrotofos ve endosülfan gibi kimyasal böcek öldürücüler yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak böceklerin geliştirdiği direnç nedeniyle bu ürünlerin etki mekanizması azalmıştır (Tatchell, 1997).

Yeşilkurtların, Hymenoptera, Diptera, Coleoptera, Hemiptera ve Neuroptera takımlarında bulunan çok sayıda doğal düşmanı vardır. Parazitoit ve predatörler her ne kadar konukçularını baskı altında tutabilme özelliğine sahip olsalar da doğada yetersiz sayıda bulunmalarından dolayı zararlıların kontrolü için yeterli değildir (Uygun vd., 2010).

Yeşilkurtların mikrobiyal mücadelesinde, dünyada yaygın olarak kullanılan 2 adet ticari preparat vardır. Bunlar; *Bacillus thuringiensis* (Cherry vd., 2003) ve bakülovirüs grubuna ait nükleopolihedrovirüs (NPV)'dür. Ancak, yeşilkurtların *B. thuringiensis*'lere karşı da direnç geliştirildiği belirtilmiştir (Luttrell ve Jackson, 2012; Yang vd., 2013). Bu nedenle yeşilkurtların mücadelesinde bakülovirüs kaynaklı ürünlerin geliştirilmesine başta ülkemiz olmak üzere dünyanın her yerinde ihtiyaç doğmuştur.

1.3. Böceklerde Enfeksiyona Neden Olan Virüsler

Böcek patojeni virüsler, zararlıların kontrolünde en çok tercih edilen ajanlardan biridir (Hunter-Fujita vd., 1998; Beas-Catena vd., 2014; Szewczyk vd., 2011). Hedef organizmaya beslenme yoluyla bulaşması nedeniyle özellikle çiğneyici ağız yapısına sahip, yaprak yiyen böceklerin kısa sürede enfekte olmasını sağlamaktadır. Ayrıca koloni halinde yaşayan böcek gruplarında böcekten böceğe yayılım göstererek, popülasyonda salgınlara sebep olmaktadır. Genellikle Lepidoptera, Coleoptera ve Hymenoptera takımı böceklerde hastalık oluşturan başlıca virüs aileleri şunlardır: Baculoviridae, Nodaviridae, Iflaviridae, Picornaviridae, Polydnviridae, Rhabdoviridae, Poxviridae, Ascoviridae, Reoviridae, Iridoviridae ve Parvoviridae (Tablo 1) (Fauquet ve Fargette, 2005). Baculoviridae, Reoviridae ve Poxviridae familyalarında diğer böcek virüslerinden farklı olarak inklüzyon cisimciği bulunmaktadır. Bu yapı virüslerin etrafında bulunan protein örtüye ilave olarak farklı bir protein yapı içine daha gömülü olması durumudur (Hunter-Fujita vd., 1998).

Tablo 1. Böcek patojeni virüs aileleri ve özellikleri

Familiya	Nükleik asit	Nükleokapsit simetrisi	Inklüzyon cisimciği
Baculoviridae	dsDNA	Basil	+
Reoviridae	dsDNA	İzometrik	+
Poxviridae	dsDNA	Oval	+
Iridoviridae	dsDNA	İkozahedral	-
Parvoviridae	ssDNA	İzometrik	-
Picornaviridae	ssRNA	Küresel	-
Ascoviridae	dsDNA	Allontoit	-
Polydnviridae	dsDNA	Oval	-
Rhabdoviridae	ssRNA	Basil	-
Nodaviridae	ssRNA	İkozahedral	-
Iflaviridae	ssRNA	İkozahedral	-

ds: çift zincirli, ss: tek zincirli

Böcek patojeni virüslerin biyolojik mücadelede kullanılabilirliği, 16. yüzyıldan itibaren bilinmektedir. Böceklerde görülen ilk viral hastalık Vida tarafından 1524 yılında ipek böceğinde (*Bombyx mori* L.; Lepidoptera: Bombycidae) solgunluk (vücut sıvısında sarılık) olarak adlandırıldı. Bu hastalık kaynağının bakülovirüsler olduğu, 1856 yılında iki

İtalyan bilim adamı olan Maestri ve Cornalia tarafından anlaşıldı. Steinhaus ve arkadaşları ise, 1950-1970 yılları arasında bakülovirüslerin zararlı böcekler üzerindeki etkinliğini alan uygulamasında test etti. Sandoz firması tarafından 1975 yılında, 'Elcar' isimli ilk viral biyoinsektisit üretilerek piyasaya sürüldü (Ibaraa ve Castero, 2008). Şu ana kadar üretilen ve piyasaya sürülen 60 adet viral biyoinsektisit bulunmaktadır. Virülanslarının diğer böcek patojeni virüslere göre daha yüksek olması nedeniyle, bu zamana kadar üretilen ticari biyoinsektisitlerin hepsi bakülovirüs ailesindedir (Beas-Catena vd., 2014; Szewczyk vd., 2011).

1.4. Böceklerde Virüs Taraması

Böcek virüsleri çevresel, zirai, moleküler ve tıbbi biyoteknolojideki önemleri bakımından bütün dünyada yoğun olarak çalışılan araştırma materyalleri haline gelmiştir (Demir vd., 2008). Bu virüslerin yeni izolatlarının veya yeni türlerinin keşfedilmesi daha verimli ve daha güvenilir materyallerin elde edilmesini sağlamaktadır (Jakubowska vd., 2015). Ayrıca, yeni izolatlar ile birlikte yeni moleküler mekanizmaların keşfedilmesi ve bu mekanizmaların çalışma sistemlerinin ortaya konulması da böcek virüslerinin bu alanlardaki kullanılabilirliğini arttırmaktadır.

Virüs enfeksiyonu taşıyan böcekler, doğada genellikle ayırt edici belirtiler göstermektedir. Böcek virüsleri, özellikle larva safhalarında enfeksiyona sebep olmaktadır (Evans ve Shapiro, 1997). Ancak, çoğu zaman viral enfeksiyon başlangıç safhalarında olabilir ve bu belirtiler gözlenemeyebilir. Bu nedenle sağlıklı gibi gözükten örneklerin de doğal ortamlarından toplanarak, virüs taramasında kullanılması gerekmektedir. Virüs taramasında, çeşitli virüs gruplarına ait korunmuş kısmi gen bölgelerinin primerleri kullanılarak doku PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) analizi yapılması, son zamanlarda yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Erlandson ve Theilmann, 2009). Bu şekilde belirlenen virüsler, böcek dokusundan izole edilerek saflaştırılmaktadır. Saflaştırılan virüslerin karakterizasyonu, morfolojik ve moleküler olarak gerçekleştirilmektedir. Morfolojik karakterizasyonda saflaştırılan virüsler ışık ve elektron mikroskopunda incelenirken, moleküler karakterizasyonda ise kısmi gen bölgelerinin çoğaltılması ve filogenetik ağaçlarının çizilmesi çalışmaları yapılmaktadır. Bu şekilde karakterizasyonu yapılan izolatların çoğaltılması ve enfektivitesini belirlemek amacı ile canlı konakta

enfeksiyonu gerçekleştirilmektedir. Sıvı veya ıslanabilir toz şeklinde formülasyonlar geliştirilerek, viral biyopestisit ürünlerinin üretimi yapılmaktadır (Szewczyk vd., 2011).

1.5. Bakülovirüsler

Bakülovirüsler, böceklerde hastalık oluşturan ve onların ölümlerine sebep olan virüslerdir. Bu özelliklerinden dolayı zirai mücadelede zararlı böcekleri kontrol altına almak ve popülasyon hacmini zarar seviyesinin altına indirmek için biyolojik mücadele materyali olarak kullanılmaktadırlar (Bilimoria, 1991). Bakülovirüslerin biyolojik mücadelede kullanılabilirliği ilk defa 1911'de Reiff tarafından önerilmiştir (Hunter-Fujita vd., 1998). Bakülovirüslerin konak spektrumu dar olup, genellikle tek bir böcek cinsi veya türü ile sınırlıdır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, bu virüslerin omurgalı canlılar üzerinde enfeksiyona sebep olmadıkları kanıtlanmıştır (Krieg vd., 1980; Entwistle, 1983; Cunningham, 1998; Black vd., 1997; McWilliam, 2007). Bu nedenle etkili ve güvenilir bir biyolojik mücadele materyali olarak tercih edilmektedir.

Biyolojik mücadelede kullanılma potansiyellerinin yanı sıra gen tedavi ve gen ifade vektörü olarak kullanılmasından ve biyoteknolojik öneme sahip olmasından dolayı, bakülovirüsler bu zamana kadar en çok ilgi duyulan böcek virüs ailesi olmuştur (Demirbağ ve Beldüz, 1997; Summers, 2006). Memelilere gen aktarmada (Ghosh vd., 2002; Hu, 2006) ve ilgi duyulan genlerin ifade edilmesinde kullanılacak uygun vektörlerdir. Moleküler biyoloji ve rekombinant DNA çalışmalarında kullanılmaktadır (Blissard ve Rohrmann, 1989; Bilimoria, 1991). Ayrıca, insanlarda enfeksiyon oluşturmadıklarından dolayı moleküler biyoloji çalışmaları yapılabilecek güvenilir modeller olarak kullanılmaktadırlar (Demir vd., 2008).

Bakülovirüsler, biyolojik mücadele, moleküler biyoloji, gen ifadesi ve gen tedavisi alanlarında yoğun olarak kullanılmaktadır (Tablo 2). Bakülovirüslerin biyoteknoloji alanında kullanılması yönündeki en önemli gelişmelerden biri de 'bacmid' (bakülovirüs genomunu içeren bakteri yapay kromozomları) teknolojisidir. Bu sistemde bakülovirüs genomu bakteri sisteminde çoğaltılabilmekte (O'Reilly vd., 1992) ve yabancı genler rekombinasyon veya transpozisyonla vektör içine aktarılabilmektedirler (Miller vd., 1998). Böylece, hastalıkların tanısı ve aşı geliştirilmesi amaçlı rekombinant protein üretiminde ifade vektörü olarak kullanılabilirliği bakülovirüslerin en önemli özelliklerindedir. Polihedrin ve p10 genlerinin yüksek seviyede ifade edilebilmesinden dolayı, bakülovirüsler

rekombinant protein üretiminde en çok tercih edilen viral vektörlerden birisidir. Polihedrin (*polh*) ve *p10* genleri, bakülovirüs ile enfekte olmuş hücrelerde virüs replikasyonunun en geç safhasında yoğun olarak üretilerek polihedrin yapısını oluştururlar (Smith vd., 1983a). Polihedrin proteini, içerisine virüs partiküllerinin gömüldüğü inklüzyon yapıların (Polihedral İnküzyon Cisimleri, PIB) oluşumunu sağlar. Bu yapılar virüsleri, doğal ortam şartlarından koruyarak virüslerin kararlılığını arttırmaktadır. PIB yapısı, böceklerin ağız yoluyla enfeksiyonunda kullanıldığı için hücre kültüründeki virüs replikasyonu için gerekli değildir (Smith vd., 1983b, Gonnet ve Devauchelle, 1987). Bu nedenle, PIB üretiminden sorumlu olan *polh* ve *p10* genlerinin genomdan çıkarılması ve yerlerine yabancı genlerin yerleştirilmesi ile bakülovirüs vektörleri geliştirilmektedir (Smith vd., 1983b).

Böcek hücre kültürlerinin gelişmesiyle birlikte rekombinant bakülovirüslerin biyoreaktörler ve kültür kaplarında hızlı bir şekilde çoğaltılması sağlanmıştır (Smith vd., 1983a; Trampler vd., 1993). Memeli hücrelerinin bakülovirüslerle ilk transdüksiyonu (hepatositler) yaklaşık çeyrek asır önce bildirilmiştir (Hofmann vd., 1995). Bakülovirüslerin memeli hücrelerine karşı düşük sitotoksositeye sahip olduğu ve bu hücrelerde çoğalmadığı görülmüştür. Gen tedavisinde, bakülovirüslerin kullanımına yönelik artan araştırma sayısı, bu vektörün gen ve kök hücre tedavileri için faydalı bir araç olduğunu göstermiştir (Raty vd., 2008).

Tarım ve orman zararlıların kontrolünde bakülovirüslerin kullanılabilirliği, ülkemizdeki potansiyel mikrobiyal ajanların araştırılmasına ilham vermektedir. Yapılan çalışmalarda çeşitli böceklerden elde edilen bakülovirüs izolatlarının morfolojik ve moleküler özellikleri tanımlanarak virülans özellikleri belirlenmiştir (Eroglu vd., 2018; Gencer vd., 2017; Demir vd., 2014; Toprak vd., 2006).

Tablo 2. Bakülovirüslerin kullanıldığı çalışma alanları.

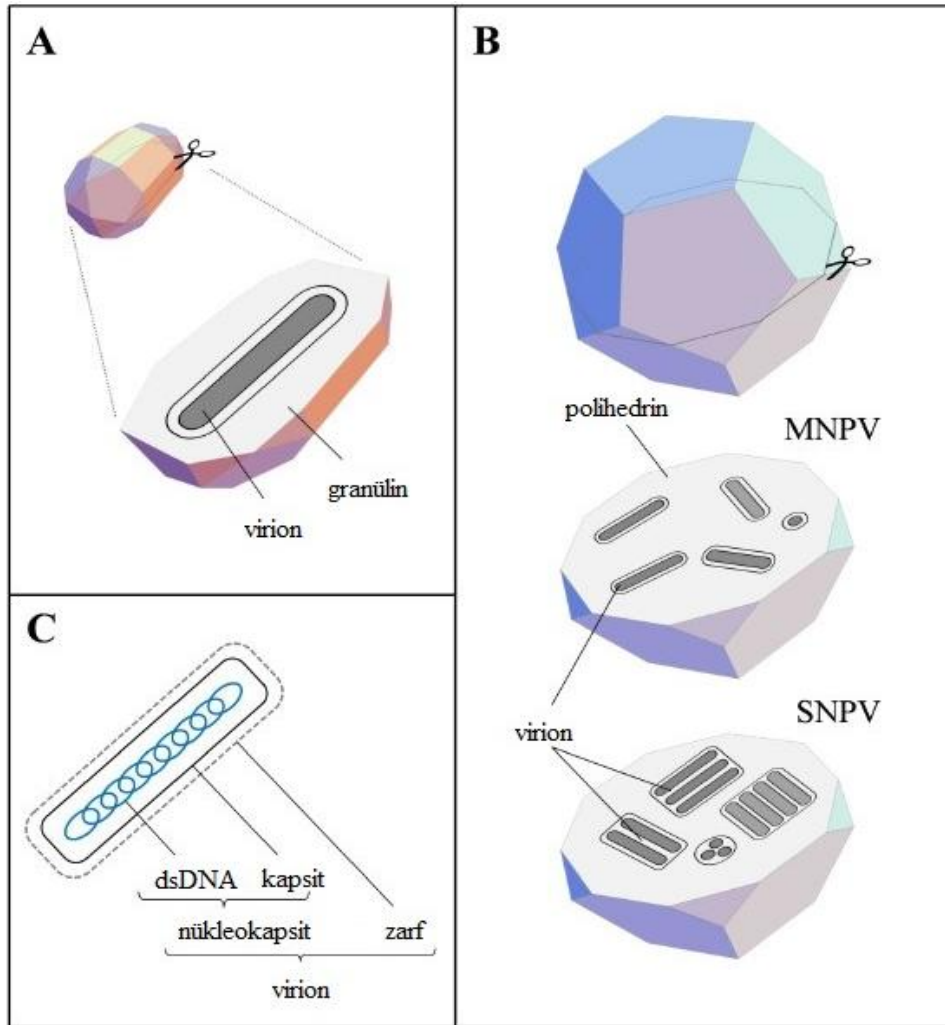
Bakülovirüslerin Kullanım Alanları	Biyolojik mücadele	• Tarım ve orman zararlılarına karşı tek başına ya da diğer etmenlerle birlikte
	Moleküler biyoloji	• İnsan ve hayvanlarda enfeksiyon oluşturan virüslerin moleküler mekanizmalarını anlama bakımından bir model olmaları
	Gen ifadesi	• Tıbbi, endüstriyel ve zirai mücadelede ilgi duyulan gen ürünlerinin üretilmesi için ifade vektörü olarak
	Gen tedavisi	• Hastalıkların tedavisi veya önlenmesi amacıyla gen terapi vektörü olarak kullanılmaları

1.5.1. Bakülovirüslerin Morfolojisi

Bakülovirüsler, 230–385 nm uzunluğunda ve 40–60 nm genişliğindeki çubuk (Latince ‘baculum’: çubuk) şeklinde nükleokapsitlerinden dolayı bu ismi almıştır (Miller, 1996). Polihedrin ve granül morfolojilerine göre, sırasıyla nükleopolihedrovirüsler (NPV) ve granülovirüsler (GV) olarak 1920 yılında iki gruba ayrılmıştır (Şekil 5) (Ackermann ve Smirnof, 1983). NPV’ler, tek bir lipoprotein yapıli membran zarfi içinde bir (SNPV) veya birden fazla (MNPV) nükleokapsit içerirler. SNPV’ler ile MNPV’ler arasındaki farklılığın taksonomik bir anlamı olmamakla birlikte bu fenotiplere yol açan genetik faktörlerin neler olduğu da bilinmemektedir (Rohrmann, 2013).

Bakülovirüslerin nükleokapsitleri zarflıdır. Yaşam döngüsü iki aşamalı olup, virionları tomurcuklanan virüsler (BV) ve gömülü virüsler (ODV) olmak üzere iki farklı fenotipe sahiptir. BV ve ODV’lerin ortamdaki kararlılıkları ve hedef böcek üzerindeki bulaşma özellikleri farklıdır. ODV’ler, polihedrin veya granülün içeren ve PIB olarak adlandırılan parakristalin protein ile kaplıdır. Bu yapı, virüsün böcek bağırsağındaki primer enfeksiyondan sorumlu olup, virüsün çeşitli çevresel koşullara dayanıklı olmasını, doğadaki kalıcılığını ve böcekten böceğe yayılımını kolaylaştırır. PIB’lerin yüzeyi, büyük oranda karbonhidrat içeren proteinden oluşan bir zarf veya kaliks ile kaplanmıştır (Rohrmann, 2013).

NPV'lerde bulunan PIB'ler 0,6-2 μm boyutlarında iken GV'lere ait olanlar 0,2–0,4 μm boyutlarında olup, ışık mikroskopunda görülebilecek büyüklüktedir (Bonning, 2005). İkinci bakülovirüs fenotipi olan BV'ler, zarflarını konak hücrelerden tomurcuklanarak alırlar. Larvalarda enfeksiyonun hücreden hücreye yayılmasını ve diğer dokulara iletilmesini sağlarlar. Hem ODV'ler hem de BV'ler genetik olarak özdeş olup, fonksiyon ve zarf bileşenleri bakımından farklıdır.

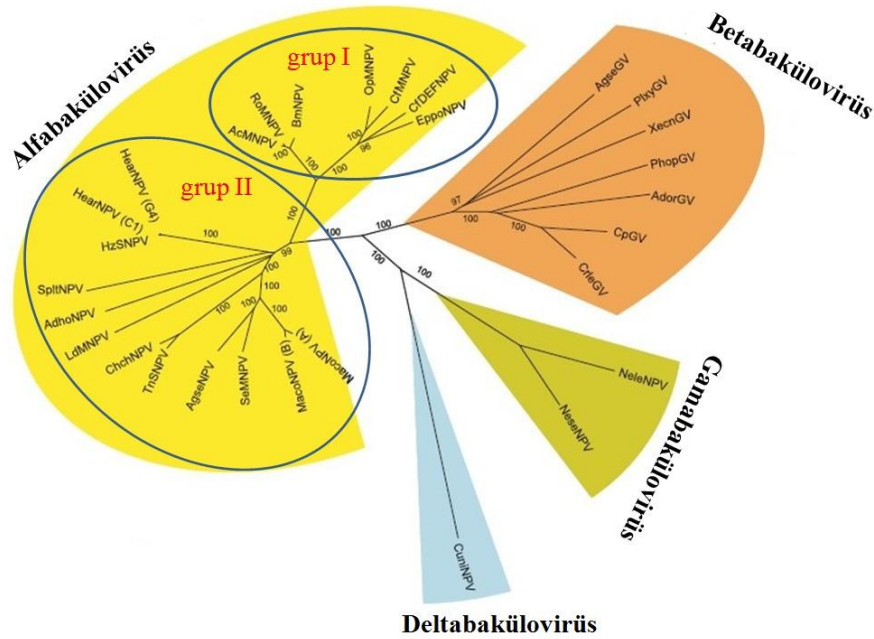


Şekil 5. Bakülovirüs morfolojisinin şematik görünümü. (A) Granülovirüs, (B) Nükleopolihedrovirüs, (C) Virion yapısı (Wennmann, 2014'den değiştirilerek kullanıldı).

1.5.2. Bakülovirüslerin Taksonomisi

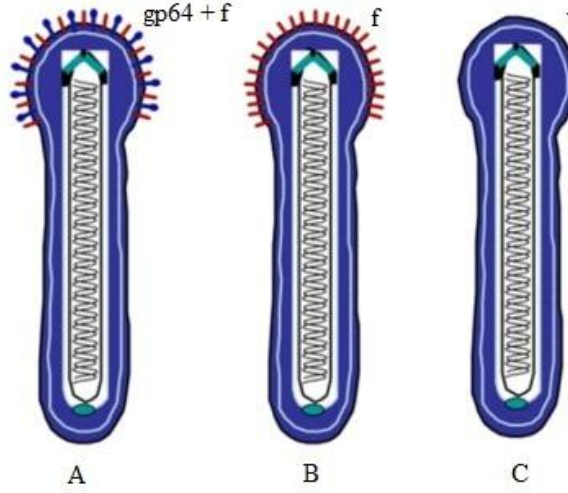
Bakülovirüsler, izole edildikleri konağa ve içerdikleri PIB türüne göre adlandırılmaktadır. Viral izolatin adı, konağın cins ve tür adlarının ilk iki harfi ile birlikte, nükleopolihedrovirüs veya granuloovirüs ile ilişkilendirilerek oluşturulur (Volkman vd., 1995).

Enfekte ettikleri böcek takımına göre Alfabakülovirüs, Betabakülovirüs, Gamabakülovirüs ve Deltabakülovirüs olmak üzere dört cinse ayrılmaktadır (Şekil 6) (Jehle vd., 2006). Bakülovirüslerin en geniş cinsi olan Alfabakülovirüsler (NPV) ve Betabakülovirüsler (GV), Lepidoptera takımındaki böcekleri enfekte etmektedir. Bununla birlikte, Alfabakülovirüsler BV'lerin içerdikleri füzyon proteinine göre grup I (glikoprotein, gp64) ve grup II (f protein) olarak iki alt gruba ayrılmaktadır (Miele vd., 2011; Wang vd., 2014). Bakülovirüsler adlandırılırken, tekli (S) veya çoklu (M) nükleokapsitlerin içeriğine göre de değerlendirilirdi (Bulach vd., 1999). Ancak, bu özellik Alfabakülovirüsler grup I ve grup II olarak ayrıldıktan sonra karmaşıklığa sebep olduğundan dolayı artık isimlendirme kriteri olarak kullanılmamaktadır (Herniou vd., 2003).



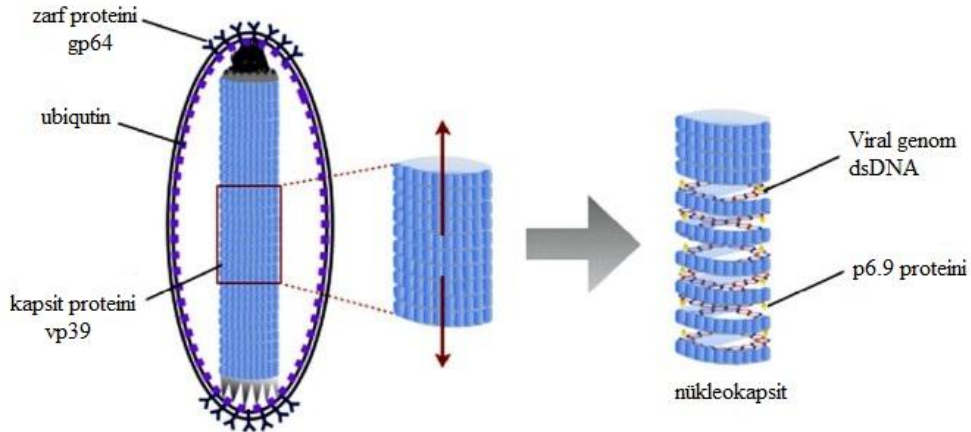
Şekil 6. Bakülovirüslerin sınıflandırılması

Elektron mikroskopik çalışmalara göre, grup I ve grup II'de bulunan Alfabakülovirüslerin BV yapılarının birbirlerine benzediği, uzun, oval yapıda olduğu ve apikal uçlarının 6-7 nm kalınlıkta olduğu belirlenmiştir (Şekil 7) (Wang vd., 2016).



Şekil 7. Bakülovirüs gruplarındaki BV'lerin apikal uç görünümü. A. Grup I Alfabakülovirüsler, B. Grup II Alfabakülovirüsler, Betabakülovirüsler ve Deltabakülovirüsler, C. Gamabakülovirüsler (Rohrmann, 2013).

Alfabakülovirüs grup II'de bulunan f proteini, Betabakülovirüsler ve Deltabakülovirüslerde de bulunmaktadır. Gamabakülovirüslerde ise füzyon proteini bulunmamaktadır (Şekil 8) (Rohrmann, 2013).



Şekil 8. *Autographa californica* MNPV (AcMNPV)'ye ait BV'nin yapısal modeli (Wang vd., 2016'dan değiştirilerek kullanıldı).

Gamabakülovirus ve Deltabakülovirüs grupları sırasıyla Hymenoptera ve Diptera takımlarındaki böcekleri enfekte eden bakülovirüs gruplarıdır. Bu zamana kadar Gamabakülovirüs grubuna ait yalnızca 3 [Neodiprion abietis nucleopolyhedrovirus (NeabNPV), Neodiprion lecontei nucleopolyhedrovirus (NeleNPV) ve Neodiprion sertifer nucleopolyhedrovirus (NeseNPV)] ve Deltabakülovirüs grubuna ait ise 1 tür [Culex nigripalpus nucleopolyhedrovirus (CuniNPV)] tanımlanmıştır (Jehle vd., 2006; Becnel vd., 2001; Moser vd., 2001). Sivrisinek larvalarını enfekte eden CuniNPV izolatının aynı zamanda, erginlerde de enfektif olduğu ve polihedrin geninin, diğer bakülovirüsler ile homolog olmadığı bilinmektedir (Herniou vd., 2011).

Bakülovirüsler, izole edildikleri konakçıya göre adlandırılırlar. Ancak bir virüs, birden fazla böcek türünde birden bulunabilir veya bir böcek türü, birkaç farklı virüsün konakçısı olabilir. Bu durum aynı virüs izolatına ait varyantların farklı bir virüs izolatı olarak isimlendirilmesine yol açabilir. Bu karışıklığı önlemek amacıyla, farklı izolatların nükleotit dizileri arasındaki evrimsel mesafe dikkate alınır. Nükleotitler arasındaki transisyon (pirimidin-pirimidin /pürin-pürin değişikliği) veya transversiyon (pirimidin-pürin değişikliği) oranını hesaplamak için Kimura-2 parametre analizi kullanılmaktadır (Kimura, 1980). Bakülovirüslerde korunmuş genlerinin peşpeşe eklenmesi sonucu izolatlar arasında çıkan oran 0,015 ve 0,050 arasında ise izolatların aynı tür olabileceği ancak konak spektrumu gibi farklı özelliklere de bakılması gerektiği, 0,015'den küçük ise aynı türün farklı varyantları, 0,050'den büyük ise farklı tür oldukları kabul edilir (Jehle vd., 2006).

1.5.3. Bakülovirüslerin Evrimi

Bakülovirüs evrimi hem kendisindeki hem de böcek popülasyonlarındaki genetik varyasyona bağlıdır. Yapılan filogenetik analizlere göre, bakülovirüslerin kaynağı Karbonifer dönemindeki böcek çeşitliliğinin arttığı Paleozoik çağına dayanmaktadır (65 milyon yıl önce) (Theze vd., 2011). Bakülovirüslerin özellikle lepidoptera takımındaki böceklerden izole edilmesinden dolayı onlar ile birlikte evrimleştiği bildirilmiştir (Zanotto vd., 1993). Çevre şartlarına karşı virionları koruyan PIB yapıları sayesinde bu zamana kadar geldikleri düşünülmektedir (Slack ve Arif, 2006).

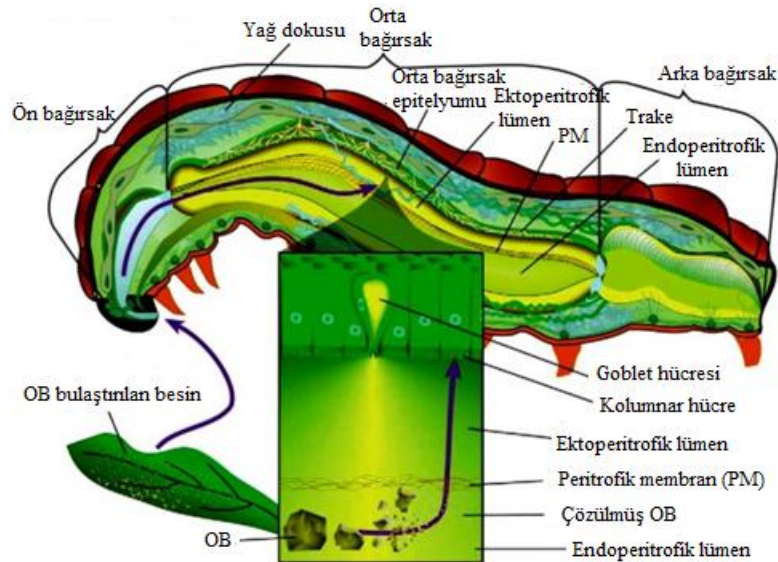
Bazı omurgasız türlerin larva ve erginlerinde bulunan nudivirüsler, bakülovirüslere en yakın olan entomopatojenik virüs familyasıdır (Wang ve Jehle, 2009). Nudivirüslerin bakülovirüslerden farklı olarak PIB içermedikleri biliniyordu ancak son yapılan

çalışmalarda bazı nudivürüs izolatlarının [Oryctes rhinoceros nudivirus (OrNV), Helicoverpa zea nudivirus 1 (HzNV-1) ve Gryllus bimaculatus nudivirus (GvNV)], Alfa, Beta ve Gama-bakülovirüslerdeki PIB matriks proteinleri ile homoloji gösterdiği belirlendi. Ayrıca, yapılan genom analizleri sonucunda nudivürüslerin bakülovirüsler ile en az 20 ortak homolog geninin olduğu belirlenmiştir (Wang vd., 2011). İki virüs ailesi arasındaki yapısal benzerlikler ve homolog genler, bu virüslerin ortak bir ataya sahip olduğunu düşündürmektedir (Wang ve Jehle, 2009).

Bakülovirüslerin evrimi hakkındaki güncel görüş, bağırsak dokusunu enfekte etmeyen virüslerden, bu dokuda enfeksiyona sebep olan virüslere evrildiği ve enfeksiyonu diğer dokulara yayma kabiliyeti kazandıkları şeklinde-dir (Herniou ve Jehle, 2007).

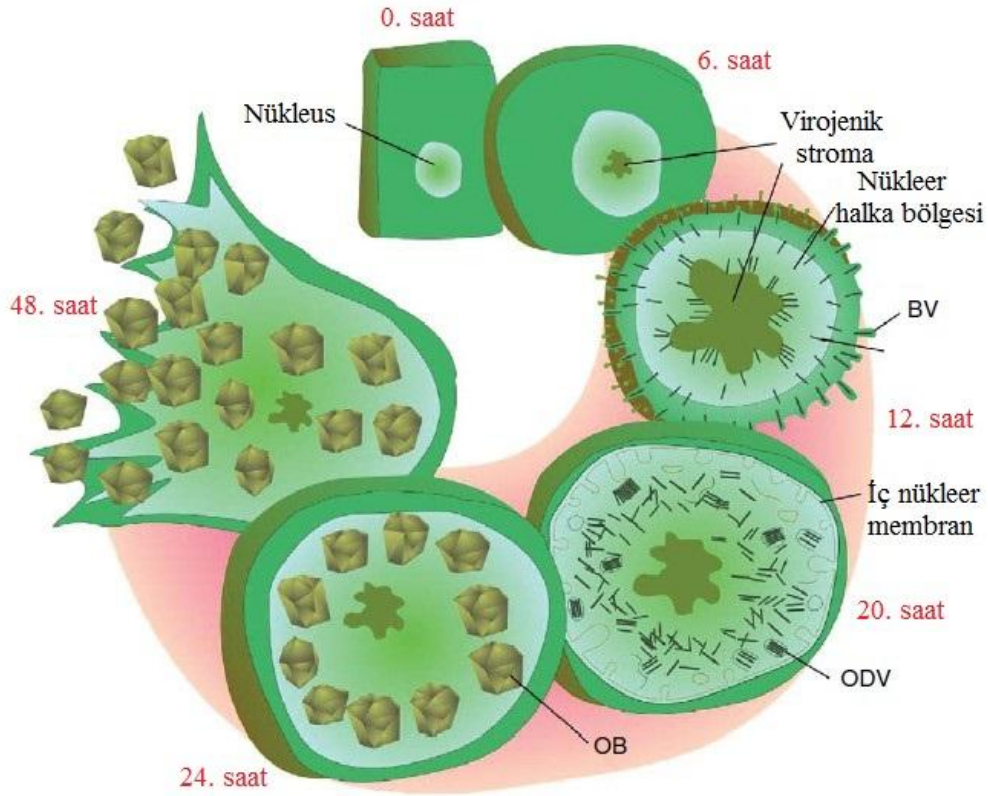
1.5.4. Bakülovirüslerin Enfeksiyon Döngüsü

Bakülovirüslerin enfeksiyon döngüsü, böcek larvalarının PIB'leri ağızdan alması ile başlar. Konakta bakülovirüs enfeksiyonu farklı virion fenotiplerine bağlı olarak iki aşamalı döngüye girer. Konak tarafından PIB'nin alımından hemen sonra, protein matriks larvaların alkali (pH > 10) orta bağırsaklarında çözülür ve ODV'ler salınır (Şekil 9).



Şekil 9. Bakülovirüs ile enfekte olan bir böceğin boyuna kesiti (Slack ve Arif 2006'dan değiştirilerek kullanıldı).

İlk olarak, virionların glikoprotein ve kitin içeren peritrofik membranı (PM) geçmesi gerekir (Hegedus vd., 2009). Bu membran, böcek bağırsak epitelini fiziksel hasar ve patojenlerden koruyan bir bariyer görevindedir. Bakülovirüslerde bulunan sinerjistik faktörler, peritrofik membranın parçalanmasını sağlayan viral enhansin proteinlerini (*vef*) kodlamaktadır. Sinerjistik faktörler ilk olarak, *Pseudaletia unipuncta* granulovirüs (PsunGV) izolatında bildirilmiştir (Tanada, 1959). Viral enhansin proteinleri, metallopeptidaz ailesinde bulunmaktadır (Lepore vd., 1996). Bu proteinleri kodlayan genler, bakülovirüs genomunda çoklu kopyalar halinde bulunabilirler. Örneğin *Xestia c-nigrum* granulovirüs (XcenGV) genomunda 4 adet *vef* geni yer almaktadır (Gueli Alletti, 2018). Peritrofik membranın enzimatik parçalanması ODV'lerin birincil enfeksiyonu başlattıkları orta bağırsak epitel hücrelerine girişini sağlamaktadır (Slack ve Arif, 2006). Peritrofik membrandan geçen ODV'ler, kolumnar epitel hücrelerdeki mikrovilluslarla kaynaşır (Faulkner vd., 1997; Haas-Stapleton vd., 2004) Nükleokapsitler, sitoplazmaya girip viral DNA'nın salındığı ve DNA replikasyonunun başladığı çekirdeğe gider (Friesen, 1997; O' Reilly vd., 1992). Bu göç ODV'lerin zarfında bulunan özel protein kompleksi (*per os infectivity factors*, *pif*'ler) yardımı ile olmaktadır. Birincil enfeksiyon sürecinde gerekli olan faktörleri kodlayan ve tüm bakülovirüslerde zorunlu olarak bulunan 9 adet *pif* geni tanımlanmıştır (*pif-0/p74*, *pif-1*, *pif-2*, *pif-3*, *pif-4*, *pif-5/odv-e56*, *pif-6*, *pif-7*, *pif-8/vp91/p95*) (Fang vd., 2009; Sparks vd., 2011; Nie vd., 2012; Zhu vd., 2013; Javed vd., 2017). Enfeksiyondan 8 saat sonra, yeni virüsler üretilmeye başlar ve enfekte hücrenin çekirdeği genişler. Tomurcuklanarak üretilen virüsler (BV), çıplak nükleokapsidlerden oluşur. Hücre dışına çıktıkları yerde zarf yapısı kazanırlar (Washburn vd., 2003). Böylece, bakülovirüs replikasyonunun birinci aşaması tamamlanır. Diğer vücut dokularında ise enfeksiyonun ikinci aşaması başlar. Hemolenf ve trake sistemi ile taşınan BV'ler, konağın birçok dokusunda enfeksiyona neden olur (Engelhard vd., 1994). Nükleokapsitler, nüklear membrandan zarflarını kazanır. Enfeksiyonun bir sonraki evresinde polihedrin/granülün sentezlenir ve yeni PIB'lerin oluşmasıyla ikinci enfeksiyon döngüsü de tamamlanır. Yoğun miktarda PIB içeren hücreler patlar ve vücudun kitlesel yıkımı sonunda konak ölür (Şekil 10).



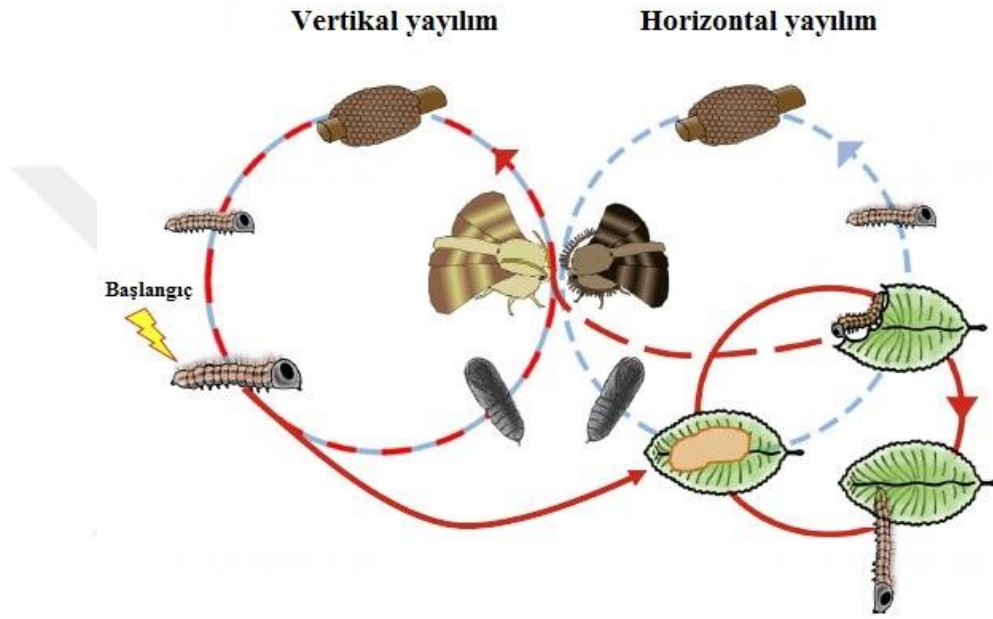
Şekil 10. Bakülovirüs enfeksiyon döngüsü (Slack ve Arif 2006'dan değiştirilerek kullanıldı).

1.5.5. Bakülovirüslerin Yatay ve Dikey Yayılımı

İkinci enfeksiyon döngüsü sonucunda, ölen konaktan salınan PIB'ler konakçının besin yüzeyine ve çevreye salınmaktadır (Slack ve Arif, 2006). Böylece, bakülovirüsler yatay yayılım ile bir böcekten diğerine geçebilmektedir. Aynı zamanda, dikey yayılım ile bir nesilden diğer nesile aktarılabilmektedir. Yatay yayılım, özellikle koloni halinde yaşayan tarım zararlısı böceklerin toplu halde hastalanarak ölmesi için etkili bir mekanizmadır.

Dikey yayılımın mekanizması ise daha karmaşıktır. Bakülovirüslerin dikey yayılım özelliği, laboratuvar ortamında yetiştirilen böceklerde enfeksiyonunun kendiliğinden oluşmasıyla belirlenmiştir (Rohrmann, 2013). Bu mekanizma özellikle yüksek sıcaklık gibi stres faktörlerinin varlığında daha sık ortaya çıkmaktadır. Bu kendiliğinden ortaya çıkan

salgınlar, konak larvanın tüm safhalarında görülebilmektedir (Khurad vd., 2004). Moleküler çalışmalar, bakülovirüs enfeksiyonunun konağın ergin formuna da geçtiğini, ölmeden hemen önce tekrar larvalara aktarıldığını (Burden vd., 2002; Cabodevilla vd., 2011) ve böylece nesiller boyunca enfeksiyonun devam ettiğini göstermiştir (Şekil 11) (Kukan, 1999).

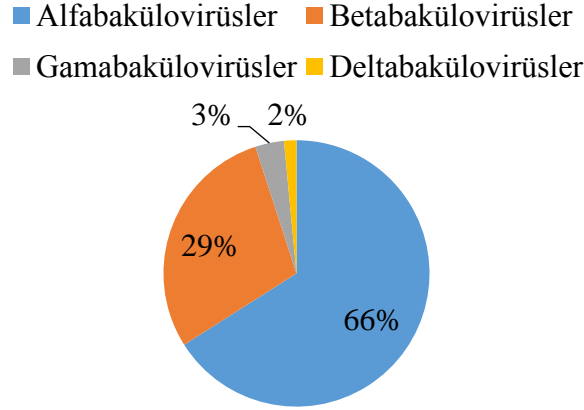


Şekil 11. Bakülovirüslerin yatay ve dikey yayılımı

1.5.6. Bakülovirüslerin Genom Özellikleri

Bakülovirüsler kapalı, dairesel çift zincirli 90-180 yapısal protein kodlayan, %32-57'lik Guanin-Sitozin (GC) içerikli, 25x250 nm büyüklükte ve 80-180 kb arasında DNA genomuna sahiptir (Herniou vd., 2011). Son yıllarda ilerleyen teknikler bakülovirüslere ait genom analizi çalışmalarının artışına yol açmıştır. Genom analizi tamamlanan bakülovirüs sayısının artmasıyla, bakülovirüslerin moleküler özellikleri ile ilgili kapsamlı bilgiler elde edilmiştir. Ayrıca bakülovirüs genlerinin birbirleri ile kıyaslanması, ayırt edici ve benzer olanların tanımlanmasını sağlamıştır. Şimdiye kadar, NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında, genom analizi yapılmış 85 adet bakülovirüs türü bulunmaktadır. Bu genomlardan 56 tanesi Alphabakülovirüs, 25 tanesi

Betabakülovirüs, 1 tanesi Deltabakülovirüs ve 3 tanesi Gamabakülovirüs grubuna aittir (Şekil 12) (www.ncbi.nlm.nih.gov).



Şekil 12. Genom analizi yapılan bakülovirüslerin dağılımı

Bakülovirüslerin, genom analizi ilk defa 1994 yılında, AcMNPV izolatu için yapılmıştır. Bu nedenle AcMNPV izolatu, NPV'lerin tip türü olarak kabul edilmektedir (Ayres vd., 1994). Bilinen en küçük bakülovirüs genomu *Neodiprion lecontei* NPV (81 kb, 89 ORF) (Lauzon vd., 2004) ve en büyük genom ise *Xestia c-nigrum* GV (178 kb, 181 ORF) izolatlarına aittir (Hayakawa vd., 1999). Bakülovirüs genomları arasındaki bu heterojen gen çoğalmas, eklemeler ve silinme gibi genetik rekombinasyon olaylarından kaynaklanmakta ve genetik çeşitliliğin yüksek olduğunu göstermektedir (Ferrelli vd., 2012).

Bu zamana kadar dizilenen bakülovirüslerin genomları esas alındığında, bunların yaklaşık 900 adet farklı gen içerdikleri belirlenmiştir ancak bu genlerin çoğunun işlevi tam olarak bilinmemektedir (Ferrelli vd., 2012). Bu genlerden 38 tanesi bakülovirüs *kor* genleri olarak bilinir ve tüm bakülovirüsler için ortak korunmuş genler olduğu kabul edilmektedir. Bu genlerin, viral replikasyon döngüsünde, bağırsak hücrelerinin birincil enfeksiyonunda, transkripsiyonda, DNA replikasyonunda, konukçu hücre ile etkileşimde önemli rollere sahip oldukları ve bu nedenle bakülovirüs enfeksiyonu için oldukça önemli oldukları bilinmektedir. Bakülovirüslerde bulunan *kor* genlerin görevleri Tablo 3'de belirtilmiştir (Garavaglia vd., 2012; Javed vd., 2017).

Tablo 3. Bakülovirüs kor genleri ve fonksiyonları

Kor genler	Fonksiyonları
DNA replikasyonu	
<i>lef-1</i>	DNA primaz
<i>lef-2</i>	DNA replikasyonu/primaz ile ilişkili faktör
<i>DNA polimeraz</i>	DNA replikasyonu
<i>helikaz</i>	Virion yapısı, paketlenme
<i>alk-ekzo</i>	DNA rekombinasyonu
Transkripsiyon	
<i>vlf-1</i>	<i>p10</i> ve <i>polh</i> genlerinin ifadesi
<i>p47</i>	RNA polimeraz alt ünitesi
<i>lef-4</i>	RNA polimeraz alt ünitesi/RNA şapkalama enzimi
<i>lef-5</i>	Transkripsiyon başlatma faktörü
<i>lef-8</i>	RNA polimeraz alt ünitesi
<i>lef-9</i>	RNA polimeraz alt ünitesi
Yapısal	
<i>vp1054</i>	Nükleokapsit proteini
<i>desmoplakin</i>	Nükleokapsitte mevcut
<i>gp41</i>	Tegüment proteini
<i>vp39</i>	Major kapsit proteini
<i>odv-e25</i>	ODV zarf proteini
<i>p6.9</i>	Nükleokapsit proteini
<i>odv-ec43</i>	ODV üretiminde
<i>p49</i>	BV üretimi
<i>odv-e18</i>	ODV zarf proteini
<i>odv-e27</i>	ODV zarf proteini
Ağızdan enfeksiyondan sorumlu	
<i>pif-0</i>	ODV'nin ortabağırsağına bağlanması
<i>pif-1</i>	ODV'nin ortabağırsağına bağlanması
<i>pif-2</i>	Ağızdan enfeksiyon
<i>pif-3</i>	Ağızdan enfeksiyon
<i>pif-4</i>	Ağızdan enfeksiyon
<i>pif-5</i>	ODV zarf proteini
<i>pif-6</i>	Ağızdan enfeksiyon
<i>pif-7</i>	Ağızdan enfeksiyon
<i>pif-8</i>	Viral kapsit ile ilişkili protein
Diğer	
<i>ac78</i>	Görevi bilinmiyor/Transmembran domaini
<i>ac81</i>	Görevi bilinmiyor
<i>p18</i>	Nükleokapsit çıkışı
<i>p40</i>	Protein kompleksinin alt ünitesi
<i>p48</i>	BV üretimi ve ODV zarf proteini
<i>ac53</i>	Nükleokapsit oluşumunda
<i>38k</i>	Nükleokapsit oluşumunda

Kor genlere ek olarak 14 adet genin de tüm alfabakülovirüslerde ortak olarak bulunduğu bilinmektedir (Herniou vd., 2003). Korunan genlerin dışında, her bakülovirüs, ilave farklı genlere sahiptir. Bu az sayıdaki genler, viral izolatu diğerlerinden farklı kılarak, virüsün patojenite, virülans, konukçu aralığı ve rekabet gücü gibi özelliklerini belirler. Bu nedenle yeni viral genomların dizilenmesiyle birlikte şimdiye dek bilinmeyen yeni genler de tanımlanmış olacaktır (Van Oears vd., 2005).

Gen olarak kabul edilmeyen homolog tekrar bölgeleri (hrs), bakülovirüslerde yaygın olarak bulunmaktadır. Bu bölgeler ilk defa hibridizasyon yöntemi ile tanımlanmıştır. Genomda Adenin-Timin (AT) bakımından zengin, replikasyon orjini ve transkripsiyon artırıcı olarak rol alan genler arası bölgelerdir (Cochran vd., 1982; McClintock ve Dougherty, 1988; Hilton ve Winstanley, 2007). Aynı zamanda, bu bölgelerin virüs üretimini ve virülansı da etkilediği bilinmektedir (Sun, 2015). Genom analizleri, bakülovirüslerin çeşitliliğinin, ayırt edici özelliklerinin ve evrimlerinin daha iyi anlaşılması açısından oldukça önemlidir (Zhang vd., 2005). Son zamanlarda ülkemizde bakülovirüslerin genom analizleri ile ilgili yapılan çalışmalar hız kazanmıştır (Eroglu vd., 2020; Gencer vd., 2020; Gencer vd., 2018).

1.5.7. Yeşilkurt Kökenli Bakülovirüsler

Kuzey Amerika'da 19. yüzyılda *H. armigera*'da solgunluk hastalığı olarak adlandırılan bir enfeksiyon (Mally, 1891) keşfedilmiştir ve sonraki çalışmalar ile bu enfeksiyona bir virüsün sebep olduğu bulunmuştur (Parsons, 1936; Sweetman, 1936; Stahler, 1939). Yirminci yüzyılın başlarında, ise elektron mikroskobu çalışmaları ile polihedrin yapısı gözlenerek, ilk Helicoverpa NPV'si tanımlanmıştır (Smith ve Rivers, 1956; Steinhaus, 1960; Gregory vd., 1969). Daha sonraki çalışmalarda, çok sayıda Helicoverpa NPV'nin genotipik izolatu belirlenmiştir (Smith ve Summers, 1978; Gettig ve McCarthy, 1982; McIntosh ve Ignoffo, 1983, 1986; Hughes vd., 1983; Monroe ve McCarthy 1984; Williams ve Payne, 1984; Brown vd., 1985). Bu izolatların kıyaslanması için restriksiyon endonükleaz analizleri (REN) kullanılmıştır (Smith ve Summers, 1978; Miller ve Dawes, 1978a, b). Hughes vd. (1983), benzer REN profiline sahip olan izolatlarda LC₅₀ değerlerinin de benzerlik gösterdiğini ve genotip ile virülansın ilişkili olduğunu belirtmiştir.

Rowley vd. (2011), izole edilen tüm *Helicoverpa/Heliothis* NPV'ler için Kimura-2 parametre analizini yapmıştır ve *H. armigera*, *H. zea* ve *H. virescens*'den izole edilen NPV'ler arasındaki benzerlik oranının 0,015'den küçük olduğunu belirlemiştir. Bu durumdan sonra 2013 ICTV (Uluslararası Virüs Sınıflandırma Komitesi) raporunda tüm *Helicoverpa/Heliothis* NPV'lerin tek bir tür olarak *H. armigera* NPV'ye dahil edilmesi gerektiği belirtilmiştir. Daha sonraki yıllarda izolatların birçoğunun genom analizlerinin yapılmasıyla birlikte bakülovirüslerdeki 38 kor gen baz alınarak, Kimura-2 parametre analizi tekrarlandı ve elde edilen sonuç daha önceki çalışmaların doğruluğunu teyit etti (Wennmann vd., 2018).

Şimdiye kadar izole edilen *Helicoverpa/Heliothis* NPV'lerden 26 tanesinin genomu dizilenmiştir (Tablo 4). Bu izolatlar *H. armigera*, *H. zea* ve *H. assulta* konaklarına aittir. Ancak, farklı konaklardan izole edilen bu virüslerin aslında *H. armigera* NPV'nin varyantları olduğu belirlenmiştir (Wennmann vd., 2018). Sekiz farklı ülkeden yapılan genom analizlerinin kaynak ülkeleri şöyledir: Çin'den 4 (Zhang vd., 2005; Woo vd., 2006; Tang vd., 2012), Avustralya'dan 12 (Zhang vd., 2014; Noune ve Hauxwell, 2015, 2016), İberya'dan 5 (Arrizubieta vd., 2015), Kenya'dan 1 (Ogembo vd., 2009), Hindistan'dan 1 (Raghavendra vd., 2017), Rusya'dan 1 (kaynağı bilinmiyor), Amerika'dan 1 (Chen vd., 2002) ve Brezilya'dan 1 (Ardisson-Araujo vd., 2015) adettir.

Tablo 4. Genom analizi yapılan *Helicoverpa/Heliothis* NPV'ler

İzolat adı	Genom büyüklüğü (kb)	GC içeriği (%)	Kaynak ülke	Erişim no
HaSNPV-AC53	130.442	39.1	Avustralya	KJ909666
HaSNPV-AC53-C1	130.460	39.1	Avustralya	KU738896
HaSNPV-AC53-C5	130.442	39.1	Avustralya	KU738898
HaSNPV-AC53-C6	130.435	39.1	Avustralya	KU738899
HaSNPV-AC53-T4.1	130.440	39.1	Avustralya	KU738902

Tablo 4'ün devamı

HaSNPV-AC53-T5	130.439	39.1	Avustralya	KU738904
HaSNPV-AC53-C9	130.437	39.1	Avustralya	KU738900
HaSNPV-AC53-T2	130.440	39.1	Avustralya	KU738901
HaSNPV-AC53-T4.2	130.443	39.1	Avustralya	KU738903
HaSNPV-AC53-C3	130.437	39.1	Avustralya	KU738897
HaSNPV-H25EA1	130.436	39.1	Avustralya	KJ922128
HaSNPV-AU	130.992	39	Avustralya	JN584482
HaSNPV-LB1	131.966	39.2	İberya	KJ701029
HaSNPV-SP1A	132.481	39.2	İberya	KJ701032
HaSNPV-SP1B	132.265	39.2	İberya	KJ701033
HaSNPV-LB3	130.949	39.2	İberya	KJ701030
HaSNPV-LB6	130.992	39.2	İberya	KJ701031
HaSNPV-NNg1	132.425	39.2	Kenya	AP010907
HaSNPV-C1	130.759	38.9	Çin	AF303045
HaSNPV-G4	131.405	39	Çin	AF271059
HaSNPV-L1	136.760	39.1	Hindistan	KT013224
HZSNPV-HS18	130.890	39.1	Rusya	KJ004000
HZSNPV-F16 (Elcar)	130.869	39.1	Amerika	AF334030
HZSNPV-Br/South	129.694	39.1	Brezilya	KM596835
HasNPV-DJ0031	129.801	38.8	Çin	MG569706
HearMNPV	154.196	40.1	Çin	EU730893

1.5.8. Bakülovirüslerin Biyolojik Mücadelede Kullanılabilirliği

Bakülovirüsler, kimyasal pestisitlere göre yüksek konak seçiciliğine sahip olması, doğaya ve canlılara zarar vermemesi ve doğada kendiliğinden yayılması gibi çeşitli avantajlara sahiptir (Fuxa vd., 2002). Aynı zamanda, kimyasal pestisitler gibi seri üretilebilir, formüle edilebilir, paketlenilebilir, depolanabilir ve pazarlanabilirler (Possee vd., 1997; Inceoglu vd., 2006).

Bakülovirüs tabanlı pestisitlerin temeli, kimyasal pestisitler için geliştirilen formülasyon teknolojilerinin kullanılması ile oluşturulmuştur (Steinke vd., 1995). İlk baküloviral ticari ürünü olan Elcar (*Helicoverpa zea* NPV), 1970'lerde Sandoz firması

tarafından üretilmiştir (Black vd., 1997). Dünyada, bu zamana kadar, ticari olarak geliştirilip piyasaya sürülen 60 adet bakülovirüs ürünü bulunmaktadır. Ancak, bunlardan çoğu aynı izolatın farklı varyantlarına aittir (Beas-Catena vd., 2014; Szewczyk vd., 2011). Bakülovirüs kaynaklı pestisitler birçok ülkede, yaygın olarak kullanılmaktadır (Tablo 5) (Moscardi, 1999). Özellikle Çin ve Brezilya, dünyada en çok bakülovirüs ürünü üreten ve kullanan ülkelerdir (Van Beek ve Davis, 2016). Viral pestisit kullanımının, hükümet politikaları ve çiftçilere verilecek eğitim programları ile diğer ülkelerde de yaygın hale getirilmesi önerilmektedir (Sun, 2015).

Tablo 5. Bakülovirüs orjinli bazı ticari biyopestisitler ve üreticileri

Konak Böcek	Bakülovirüs	Hedef bitki	Ürün ismi	Referans
<i>Adoxophyes orana</i>	GV	Elma, armut	Capex 2	Dickler, 1991
<i>Agrotis segetum</i>	GV	Sebzeler	Agrovir	Caballero vd., 1991
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	NPV	Soya fasulyesi	Baculo-soja, Multigen, Baculovirus Nitral, Coopervirus SC, Protege	Moscardi, 1999
<i>Autographa californica</i>	NPV	Yonca, sebzeler	Gusano Biological, VPN-80TM	Thakore vd., 2006
<i>Cydia pomonella</i>	GV	Elma, armut, ceviz	Cyd-X, Virosoft CP4, Madex, Granupom, Granusal, Carpovirusine, Virin-CyAp, Carposin, Carpovirus SC	Vincent vd., 2007
<i>Helicoverpa armigera</i>	NPV	Pamuk, biber, soya fasulyesi, domates	Virin-HS, DOA BIO V2	Erlandson, 2008
<i>Helicoverpa zea</i>	NPV	Pamuk, sebzeler	GemStar, Biotrol, Elcar	Erlandson, 2008
<i>Hyphantria cunea</i>	NPV	Ormancılık	Virin-ABB	Moscardi, 1999
<i>Lymantria dispar</i>	NPV	Ormancılık	Disparvirus, Gypchek, Virin-ENSH,	Erlandson, 2008

Bakülovirüslerin çoğaltılabilmesi için canlı hücelere ihtiyaç vardır. Bu nedenle ya böcek hücre kültüründe (*in vitro*) ya da böcek konaklarında (*in vivo*) üretilmelidir (Khetan, 2001). Ancak, *in vitro* üretimin *in vivo* üretime göre yaklaşık 10 kat daha pahalı olduğu bilinmektedir (Burges ve Jones, 1998). Bu nedenle bakülovirüslerin büyük ölçekli ticari üretimi, *in vivo* olarak yapılmaktadır (Şekil 13) (Nguyen vd., 2011).



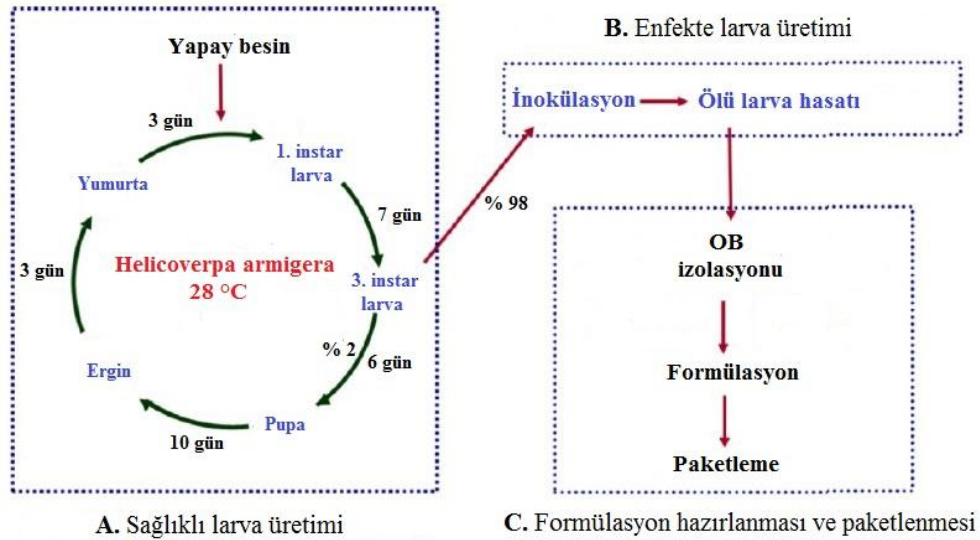
Şekil 13. Büyük ölçekli bakülovirüs üretimi için böcek yetiştirme ortamı (Sun, 2015).

Bakülovirüslerin zirai mücadelede kullanılmaları önerilmekle birlikte yavaş öldürme ve olumsuz çevre koşullarına karşı dayanıksız olmaları önemli dezavantajlardandır. Bu yüzden, öldürme hızını arttırmaya yönelik daha etkili virüslerin belirlenmesi veya rekombinant DNA teknolojisiyle daha kısa sürede etkili olan rekombinant virüslerin geliştirilmesi önerilmektedir (Martens vd., 1990). Çevresel koşullara karşı daha dirençli izolatların tespit edilmesi veya yeni formülasyonlarla daha dirençli hale getirilmeleri arzu edilen uygulamalardır. Örneğin, bakülovirüslerin, doğada yüksek sıcaklık ve UV ışınları gibi çevre şartlarına karşı dayanıksız olması gibi dezavantajları (Beas-Catena et al., 2014), hazırlanan formülasyonlarla ortadan kaldırılabilmektedir.

1.5.9. Bakülovirüs Kaynaklı Biyopestisitlerin Geliştirilmesi

Formülasyon, aktif madde içeriği virüs olan bir süspansiyonun uygun sistemler kullanılarak, biyopestisit haline dönüştürülmesi sürecidir. Bakülovirüs kaynaklı biyopestisit üretimi için, öncelikle böcek yetiştirme tesisinin olması daha sonra da toplu larval enfeksiyon ve üretilen virüslerden, PIB saflaştırılması gerekmektedir. Daha sonra üretilen saf virüsler formülasyon haline getirilerek paketlenmelidir (Şekil 14) (Nguyen vd., 2011).

Hazırlanan ürünün ticari nitelikte olabilmesi için, kontaminasyonunun önlenmesi, çevresel faktörlerden korunması, raf ömrünün uzatılması ve uygulama verimliliğinin en üst seviyeye çıkartılması gerekmektedir. Bu nedenle belirli katkı maddelerini içeren formülasyonlar hazırlanmaktadır (Jones ve Burges, 1997; Lasa vd., 2008; Tamez-Guerra vd., 2002). Bakülovirüsler, böceklere ağız yoluyla bulaştığı için uygulanan formülasyonun tadının güzel olması ve besin kaynağına eşit şekilde yayılması gerekmektedir (Burges ve Jones, 1998). Aynı zamanda kimyasal ürünler gibi iki yıl raf ömrüne sahip olmalı, maliyet ve yüksek verimden de ödün verilmemelidir (Jones ve Burges, 1997; Behle vd., 2003).



Şekil 14. Bakülovirüs formülasyonu hazırlama süreci. A. Sağlıklı larva üretimi, B. Enfekte larva üretimi, C. Formülasyon hazırlanması ve paketlenmesi (Sun, 2015'den değiştirilerek kullanıldı).

Bakülovirüsler, uygun koşullar altında depolandıklarında uzun yıllar boyunca virülans kaybetmeden kalabilseler de (Sireesha vd., 2010), alan uygulamalarında güneşten gelen özellikle UV-B (Ultraviyole-B, 280-320 nm) ışınlarından etkilenmektedirler (Lasa vd., 2007). UV-B ışınları, viral DNA tarafından emilerek, pirimidin dimerleri (T-T, T-C) oluşturmaktadır. Bu dimerler virüs replikasyonunu ve transkripsiyonunu engelleyerek, virüsün kısa sürede aktivitesini kaybetmesine sebep olmaktadır (Hunter-Fujita vd., 1998). Bu nedenle hazırlanan formülasyonlarda UV koruyucular kullanılmaktadır. Özellikle optik parlatici olarak bilinen stilben kökenli maddelerin, bakülovirüsleri hem UV ışınlarından koruduğu hem de böcek bağırsağını parçalamasından dolayı virülansı arttırdığı bilinmektedir (Ibargutxi vd., 2008; Lasa vd., 2007). Bir bakülovirüs formülasyonda olması gereken katkı maddeleri Tablo 6’da belirtilmiştir (Haase vd., 2015).

Tablo 6. Bakülovirüs formülasyonlarında kullanılan katkı maddeleri ve görevleri

Katkı maddesi	Görevleri
Sümfaktanlar	Yüzey gerilimini azaltarak, ürünün yaprak üzerinde eşit bir şekilde dağılmasını sağlar. Yağ formülasyonlarında, yağın su ile karışmasını sağlayan emülsifiyer madde olarak da kullanılır.
Yapıştırıcılar	Damlaların yaprak yüzeyine yapışmasını artırır.
Kıvam arttırıcılar	Formülasyonu homojen bir karışım halinde tutar.
Bağlayıcılar	PIB'nin formülasyondaki taşıyıcı maddeye yapışma eğilimini artırır.
Beslenme uyarıcılar	Formülasyonun tadını güzelleştirerek, zararlının yemesini kolaylaştırır.
UV koruyucular	PIB'lerin UV ışınları tarafından inaktive olmasını önlerler. Ayrıca, bazıları böceklerdeki peritrofik membran yapısına zarar vererek, virülansın artmasına yardımcı olur.

Bakülovirüs tabanlı formülasyonlar sıvı, yağ, granül, ıslanabilir toz veya enkapsülasyon formunda hazırlanabilmektedir. Bu formülasyon çeşitlerinin birbirlerine göre bazı avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır (Behle vd., 2003; Jones ve Burges, 1997; Lasa vd., 2008; Tamez-Guerra vd., 2000).

Sıvı formülasyonlar, saf virüs süspansiyonları doğrudan yoğunlaştırılarak ve PIB'lerin virülansının devamlılığı için eklenen koruyucu maddeler ile birleştirilerek hazırlanırlar. Bakülovirüsler için en çok tercih edilen formülasyon tipi genellikle sıvı

olanlardır (Lagnaoui vd., 1997). Üretim maliyeti ve kullanım kolaylığı açısından katı formülasyonlardan daha uygundur. Ancak, dışardan gelen kontaminantlardan kolaylıkla etkilenirler. Bu durum, pH değerinin 4-6 arasında tutulması ve kontaminantların üremesinin engellenmesi için katkı maddelerinin eklenmesi ile aşılabilmektedir (Jones ve Burges, 1997; Hunter-Fujita vd., 1998).

Yağ formülasyonları, viral süspansiyonun mineral veya bitkisel yağ ile karıştırılması ile elde edilen formülasyonlardır. Sıvı formülasyonların aksine yağ formülasyonları katı formülasyonlar gibi kararlıdır. Emülgatör içeriğinden dolayı su ile kolaylıkla karıştırılarak uygulanabilir.

Islanabilir toz formülasyonların parçacık büyüklüğü nispeten büyüktür ve suyla karıştırılması zordur. Granül formülasyonlar, katkı maddelere ve hazırlık aşaması için ilave maliyete ihtiyaç duymaktadır (Burges ve Jones, 1998). Islanabilir toz ve granül formülasyonlar, ambalaj boyutlarının daha ufak olmasından dolayı daha kolay depolanır (Seaman, 1990). Ancak, hava akımının yaklaşık 120 °C olduğu bir sprey kurutucuda hazırlanmalıdır. Yüksek sıcaklıkta virülans kaybı çok olacağından dolayı bakülovirüsler için dezavantajlıdır.

Bakülovirüsler, mısır nişastası, lignin veya kaolin gibi kil tabanlı maddelerin kullanılması ile mikrokapsül haline getirilerek de formüle edilmektedir (Tamez-Guerra vd., 2002). Ancak bu maddeler, yüksek pH seviyesine sahip olduklarından dolayı kısa sürede PIB'lerin çözünmesine, virülansın düşmesine ve ürünün raf ömrünün kısa olmasına sebep olmaktadır (Batista vd., 2001).

Kimyasal pestisit ile üretilen ürünlerin pazar payının düşmesi ve biyolojik mücadele ürünlerine olan ilginin artması sonucunda, kimyasal pestisit üreten bazı uluslararası kuruluşlar biyopestisit şirketleri satın almıştır (Moore, 2015). Bu yaklaşım ile birlikte, bakülovirüs üretim ve formülasyon teknolojilerinin geliştirilmesini ve yenilikçi teknolojilere yapılan yatırımın çarpıcı biçimde arttığını görebiliriz.

İlk ticari Heliiothis NPV ürünü (Elcar) şu an 'Gemstar' ismi ile piyasada satılmaktadır. Ayrıca, çeşitli ülkelerden pek çok Heliiothis NPV ürünü de geliştirilmiştir (Black vd., 1997; Cunningham, 1998; Grzywacz vd., 2004; Reddy ve Sannaveerappanava, 2011) (Tablo 7). Özellikle Avustralya, Hindistan ve Çin'de geliştirilen bu ürünler farklı mahsullerde, yıllık 100.000 hektarın üzerinde alana uygulanmaktadır (Moscardi vd., 2011, Yang vd., 2012). Çin'de, birçok ticari şirket tarafından, Heliiothis NPV kaynaklı yıllık 100 ton biyoinsektisit üretilmektedir. Ancak, yabancı NPV ürünlerinin kullanılmasının, doğal

suşlar üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olabileceği (Munoz vd., 1997) ve konağın duyarlılığının, yabancı izolatlara göre değişebileceği öne sürülmüştür (Milks, 1997). Bu nedenle, her coğrafi bölgede mevcut olan yeni türlerin tanımlanması için mikrobiyal kontrol ajanları olarak gelişmeye uygun yerel izolatların seçimi gereklidir (Figueiredo vd., 2009).

Tablo 7. Heliiothis NPV orjinli bazı ticari ürünler

Ürün ismi	Kaynağı	Firması	Üretim yeri	Formül tipi
Elcar	H. zea NPV	Sandoz	Kaliforniya	Sıvı
Gemstar	H. zea NPV	Certis	Amerika	Sıvı
Helicovex	H. armigera NPV	Andermatt	İsviçre	Sıvı
Vivus-max	H. armigera NPV	Agbiotech	Avustralya	Sıvı
Keyun NPV	H. armigera NPV	Jiuyan Baiyun Industry Compony	Çin	Granül
Helimar	H. armigera NPV	Multiplex	Hindistan	Sıvı
Biokill-H	H. armigera NPV	Indiamart	Hindistan	Sıvı
Helitec	H. armigera NPV	Kenya Biologist	Kenya	Sıvı
Diplomata	H. armigera NPV	Agroservice	Brezilya	Sıvı

1.6. Tezin Amacı

Son yıllarda pek çok ülkede yeşilkurtların kimyasal ilaçlara karşı direnç geliştirdiği bildirilmiştir (Joussen ve Heckel, 2016). Bu durum sonucunda, direnç geliştiren larvalara uygulanan ilaç miktarı gittikçe artmakta ve kimyasal ilaçların tarım ürünleri üzerinde daha fazla kalıntısı kalmaktadır. Ayrıca, doğa ve insan sağlığı üzerinde de daha ciddi boyutta

zararlar oluşturmaktadır. Bu durumda, hem ülkemizde hem de dünyada yeşilkurt türlerine karşı mikrobiyal mücadele etmenlerinin geliştirilmesine ihtiyaç doğmuştur. Biyolojik gerekliliğinin yanısıra, ülkemizde üretilecek yerel bir biyopreparat bu alandaki dışa bağımlılığımızın azaltmasına önemli katkı sağlayacaktır.

Bu doktora tezinde yeşilkurt türlerine karşı yerel ve etkin bakülovirüs izolatlarının elde edilmesi, morfolojik ve moleküler özelliklerinin detaylı bir şekilde aydınlatılması, biyopestisit olarak kullanılma potansiyellerinin araştırılması, virülansı en yüksek olan izolatın genom analizinin yapılması ve formülasyon haline getirilmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda, ülkemizde ilk kez yeşilkurt türlerine karşı bir mikrobiyal preparat geliştirilmiş ve biyolojik preparatların ülkemizde de üretilebilmesi açısından büyük bir adım atılmış olacaktır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Yeşilkurtların Araziden Toplanması

Virüs taraması için yeşilkurt larvaları 2014-2017 yılları, Haziran-Ağustos ayları arasında Adana, Osmaniye ve Şanlıurfa illerinde farklı konukçu bitkiler üzerinden toplandı. Doğada kendiliğinden ölü olarak bulunan örnekler ayrı ayrı mikrosantrifüj tüplerine konularak, laboratuvara getirildi. Viral enfeksiyonun başlangıç seviyesinde olduğu durumlarda, larvalarda ayırt edici belirtiler olmaması göz önüne alındı. Bu yüzden bulunan tüm canlı larvalar laboratuvara getirildi ve gelişimleri gözlemlendi. Taze marul yaprakları ile beslenen canlı larvalardan gelişim sürecinde ölenler, virüs taramasında kullanılmak üzere -20 °C’de muhafaza edildi.

2.2. Yeşilkurtların Laboratuvarda Yetiştirilmesi

Doğadan toplanan sağlıklı yeşilkurt larvalarının, iklim dolabında (26 °C, 16 saat aydınlık – 8 saat karanlık zaman aralığı, %60 nem) muhafaza edilerek, pupaya girmeleri sağlandı. Yaklaşık 7 gün sonra pupalardan kelebek çıkışı görüldü. Kelebekler, pamuklar yardımıyla ballı su ile beslendi. Çiftleşen erginler, 2 gün içerisinde yumurta bıraktı ve 3-5 gün sonrasında açılan yumurtalardan larva çıkışı gözlemlendi. Larvaların beslenmesi için yapay besiyeri hazırlandı. Besiyerini hazırlamak için bir gece önceden suda bekletilmiş kuru fasulyeden 270 gr. alındı. Üzerine 4 gr. askorbik asit, 1.25 gr. sorbik asit, 2.5 gr. methyl-4-hydroxybenzoate ve 3 gr. buğday ruşeymi eklenerek, blenderda karıştırıldı. Daha sonra, 35 gr. yeast ekstrakt 400 ml suda çözülerek ilave edildi. Son olarak, 14 gr. agar agar 400 ml suda çözülerek, 5 dk. Mikrodalga fırında kaynatıldıktan sonra karışıma eklendi (Assemila vd., 2012). Steril bir kap içerisine boşaltılan besiyerinin soğuyarak, katılaşması beklendi. Daha sonra 20 dakika UV-B (15 watt, 306 nm) ışığı altında yüzey sterilizasyonu yapılarak, kullanılabilecek kadar +4 °C’de muhafaza edildi. Larvalara verilen yapay besin iki günde bir yenilendi. Larvalarda 3. dönem aşamasından sonra kannibalizm (yamyamlık) görülmesinden dolayı bu aşamaya kadar birlikte beslenen larvalar daha sonra ayrı ayrı

kaplara alınarak yetiştirilmeye devam edildi. Virüs izolatlarının çoğaltılması ve virülans testlerinde kullanılması amacıyla, larvaların laboratuvar kültürü devam ettirildi.

2.3. Virüs Taraması

Arazide toplanan örnekler, ölü bulunan veya viral enfeksiyon belirtilerine sahip olan larvalar ve kendiliğinden ölen larvalar olarak gruplandırıldı. Mikrosantrifüj tüpleri içine alınan örnekler üzerine 200'er µl dH₂O eklendikten sonra larvalar el homojenizatörü ile ezildi. Elde edilen homojenatların 100 µl'si virüs taraması için kullanıldı, geriye kalan miktar ise -20 °C'de muhafaza edildi.

2.3.1. Mikroskopik Yöntemle Virüs Taraması

Entomopatojen virüsler ile enfekte olan larvalarda, virüs türüne bağlı olarak bazı karakteristik belirtiler hem makroskopik hem de mikroskopik olarak gözlenebilir. Larva vücudunun renginin değişimi ve sıvılaşarak parçalanması, enfeksiyon kaynağının tahmin edilmesi için ilk belirleyici özelliktir. Bu çalışmada elde edilen ölü larvaların bazılarında kahverengi-sarı renk değişimi bazılarında da vücudun erimesi gözlemlendi. Makroskopik gözlemlerden sonra tüm örnekler ışık mikroskopunda incelendi. Larvaların ezilmesi ile elde edilen homojenattan lam-lamel arası preparasyon yapılarak, virüslere ait gömülü yapıların olup olmadığı kontrol edildi.

2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemiyle Virüs Taraması

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile virüs taraması için öncelikle hazırlanan homojenatlardan 100'er µl yeni bir tüpe alındı ve üzerine eşit hacimde 3 X DAS (0.3 M Na₂CO₃, 0.5 M NaCl, 0.03 M EDTA; pH 10.5) solüsyonu eklendi. Karışım 30 dk. oda sıcaklığındaki rotatorda 40 rpm'de inkübe edildi. Gömülü yapıdaki virüsler için yapılan bu ön uygulamadan sonra doku PCR kitinin (Finnzymes Phire Animal Tissue Direct) prosedürüne göre; homojenatın 10 µl'si üzerine 20 µl dilüsyon tamponu ve 0.5 µl DNA release solüsyonu eklenerek vortekslendi. Önce oda sıcaklığında 5 dk., daha sonra 98

°C’de 2 dk. inkübe edildi. 6000 g’de santrifüj yapılarak, süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpün aktarıldı. Elde edilen bu süpernatant, virüs taraması çalışmalarında DNA yerine kullanılmak üzere -20 °C’de muhafaza edildi.

PCR reaksiyonu için GoTaq enzimi kullanıldı. Çeşitli DNA virüslerine ait gen bölgelerini çoğaltan dejenerat primerler (Tablo 8) ile virüs taraması yapıldı. PCR reaksiyonu, 3 µl kalıp DNA, 10 µl (10X) PCR tamponu, 1 µl (10 mM) dNTP karışımı, 1’er µl ileri ve geri primerler (10 µM), 6 µl MgCl₂ (25 mM), 0.25 µl GoTaq DNA polimeraz (2.5 u) ve 50 µl’ye tamamlanacak şekilde dH₂O ilave edilerek hazırlandı. Pozitif kontrol olarak laboratuvarında bulunan farklı virüs DNA’ları, negatif kontrol olarak ise dH₂O kullanıldı.

Tablo 8. Virüs taramasında kullanılan primerler

Virüs adı	Hedef gen	Baz sırası
Bakülovirüs	<i>Polh</i>	F: 5’-AACAGCTATGTGTCIGGIGCRAA-3’ R: 5’-GTAAAACGACAGTTYIKIGCICC-3’
Bakülovirüs	<i>lef8</i>	F: 5’-GTAAAACGACAGTTYTTYACYGGNGARATGA-3’ R: 5’-AACAGCTATATGGNAYRTANGGRTCYTCNGC-3’
Bakülovirüs	<i>lef9</i>	F: 5’-TGTAACGACAGTTTGTCDCCRT-3’ R: 5’-CAGGAAACAGCTATAARAAYGGITA-3’
Bakülovirüs	<i>gran</i>	F: 5’-TCAGCTCATCAACTC-3’ R: 5’-GACAAATTGTTCACTAGT-5’
Entomopoks virüs	<i>sph</i>	F: 5’-AATTGAWRTNKWNAAYAYWCNGG-3’ R: 5’-GCRAAYARNAHWRNCCNGG3’
Entomopoks virüs	<i>fus</i>	F: 5’-GTACGTATATCATGATTGGA-3’ R: 5’-AACAGAGAATATGATGTCTA-3’
Askovirüs	<i>dnapol</i>	F: 5’-TGTAACGACAGTCTY-3’ R: 5’-CAGGAAATATGACCGGA-3’
Askovirüs	<i>mcp</i>	F: 5’-GCCGCKTTAARWTGCCGGT-3’ R: 5’-CGGTAGRCTTYGATGWAGTC-3’
İridovirüs	<i>mcp</i>	F: 5’-CGTGGATCTGAACTT-3’ R: 5’-GCAGCAAGGATCATTATC-3’
İridovirüs	<i>dnapol</i>	F: 5’-CCAGGAAAACATATAAG-3’ R: 5’-CACCTCTTTCATTTTAGG-3’
Densovirüs	<i>ns3</i>	F: 5’-GTGCCTTTCGTGATG-3’ R: 5’-TTAGCTTGAGTTGTCC-3’
Densovirüs	<i>vp</i>	F: 5’-GTTACATCATTGATTATTAACG-3’ R: 5’-AGAAGTGTAATTCCTAGACCATTTC T-3’

Reaksiyon döngüsü, denatürasyon için 94 °C'de 2 dk. bekletildikten sonra, primer bağlanması için 42-58 °C'de 0.5-1 dk., uzama için 72 °C'de 3 dk.'ya ayarlanarak 35 döngü şeklinde yapıldı ve son uzama aşaması için de 72 °C'de 7 dk. bekletildi. Reaksiyon sonrasında örnekler 0.5 µg/ml etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde 30 dk. yürütüldü ve jel görüntüleme sisteminde (Gel Logic; Kodak) görüntülendi.

Bant elde edilen örnekler agaroz jelden kesilerek, Nucleospin Extract II DNA Saflaştırma (Macherey-Nagel) kiti ile temizlendi. Mikrosantrifüj tüplerine bırakılan jel parçalarının üzerlerine, her 10 mg jel parçası için 20 µl bağlanma tamponu (NT) ilave edildi. Karışım 55 °C'de yaklaşık 30 dk. jel parçaları tamamen eriyinceye kadar bekletildi. Her 3 dk'da bir alt üst edilerek karıştırıldı. Bu süre sonunda tamamen eriyen solüsyon, toplama tüplerinde bulunan kolonlara aktarıldı. Kolonlar, 11.000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi ve toplama tüpünde biriken sıvı atıldı. Kolonlara 700 µl yıkama tamponu (NT3) ilave edildi. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve yıkama işlemi tekrarlandı. Kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak, 25 µl elüsyon tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 2 dk. bekletilen tüp, 2 dk. 11.000 x g'de santrifüj edildi. Kolonlar atılarak, mikrosantrifüj tüpünde toplanan DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu nanodrop ile ölçüldü. Ölçüm sonucunda DNA miktarı 50 ng/µl ve üzerinde olan örneklerden 20'şer µl hazırlanarak, Macrogen Firmasına (Hollanda) dizi analizi için gönderildi. Elde edilen diziler GenBank (NCBI) verileri ile karşılaştırıldı.

2.4. Virüs İzolatlarının Çoğaltılması ve Saflaştırılması

Dizi analizleri sonucunda bakülovirüs olduğu tespit edilen izolatlar, çalışmanın diğer aşamalarında kullanılmak üzere çoğaltıldı. Çoğaltma işlemi için, her bir izolat için izole edildikleri türe ait 100'er adet 3. dönem sağlıklı yeşilkurt larvası kullanıldı. İzolatların çoğaltılması için 16 saat aç bırakılan larvalar damlacık yedirme metodu ile enfekte edildi. Bu metota göre 1:1 oranında damlacık boyası (%20 sukroz ve %2 kırmızı gıda boyası) ve virüs süspansiyonu karıştırılarak, her bir larvaya 1 µl verildi (Hughes vd, 1986). Enfekte edilen larvalar, ayrı ayrı 25 ml'lik plastik kaplara alındı ve larvalara 100 mg yapay besin verildi. Daha sonra 14 gün boyunca iklim dolabında (26 °C'de, %60 nem ortamında) inkübasyona bırakıldı. Larvalardaki ölüm oranı her gün kontrol edildi ve besinler iki günde

bir yenilendi. Enfeksiyon sonucu ölen larvalar toplandı ve virüs saflaştırılması yapılana kadar $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

Virüs izolatlarının saflaştırılması, %30'luk sukroz gradienti ile yapıldı. Larvalar homojenizatörde tamamen ezildi ve çift kat steril tülbentten süzülerek, yeni tüpe aktarıldı. Homojenat 5000 rpm'de 30 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atılarak, pellet 1 ml dH₂O'da çözüldü. Çözülen pellet, 3 ml %30'luk sukroz üzerine nazikçe 1 ml virüs solüsyonu ilave edilerek, aynı şartlarda santrifüj edildi. Sukrozdan ayrılan saf virüs bandı dikkatlice alınarak yeni tüpe aktarıldı. Sukrozdan tamamen arındırmak için yıkama işlemi yapıldı ve 15 dk. santrifüj edildi. Oluşan pellet 5 ml dH₂O'da çözümlenerek, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi (O'Reilly vd., 1992).

2.5. Virüs İzolatlarının Tanımlanması

2.5.1. Mikroskopik Yöntemlerle Virüs İzolatlarının Tanımlanması

2.5.1.1. Işık Mikroskopisi

Saflaştırılan virüs izolatlarından 3'er µl alınarak lam-lamel arası preparatlar hazırlandı. Preparatların hepsinde bakülovirüslere ait gömülü yapılar (PIB) mikroskopta (Nikon Eclipse LH-M100C-1) 40X büyütmede gözlemlendi. Daha sonra lamel kaldırılarak, lam üzerindeki süspansiyonlar kurutuldu ve üzerlerine immersiyon yağı damlatılarak 100X'lik büyütmede PIB yapıları fotoğraflandı (Nikon Coolpix 5000).

2.5.1.2. Elektron Mikroskopisi

2.5.1.2.1. Taramalı Elektron Mikroskopisi

Virüs izolatları ayrı ayrı stablar üzerine 20'şer µl damlatılarak, bir gece $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'lik etüvde kurutuldu. Daha sonra, püskürtmeli bir kaplayıcıda (Quorum Technology SC7620-CF) altın tozu ile kaplanarak, taramalı elektron mikroskopunda (Zeiss EVO LS10) incelendi.

2.5.1.2.2. Transmisyon Elektron Mikroskopisi

Virüs izolatlarının her birinden 200' er µl alınarak, 13.000 rpm'de 5 dk. çöktürüldü. Pelletde bulunan PIB yapıları üzerine fosfat tuzu tamponu (PBS) ilave edilerek, 2 kez santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pellet üzerine 0.1 M PBS içerisinde %2.5 glutaraldehit (2ml) ilave edilerek, 1 gece boyunca +4 °C'de fiksasyona bırakıldı. Birincil fiksasyon sonrasında hücreler 2 kez PBS ile yıkama yapılarak santrifüj edildi. Yıkamalar sonrasında %1'lik 2 ml. ozmiyum tetroksit eklendi. İkincil fiksasyon, +4 °C'de 1 saat boyunca gerçekleştirildi. Fiksasyonun ardından 2 kez PBS ile yıkandı. Bir pastör pipet yardımıyla %5'lik eriyik agar 50 ml'lik tüp içerisindeki pellete eklendi ve lam üzerine damlatıldı. Donan agar parçaları bistüri ucu yardımıyla ufak parçalar halinde kesildi ve üzerine uranil asetat eklenerek, 15 dakika +4 °C'de inkübe edildi. Uranil asetat sonrası agara gömülü hücreler, +4 °C'de 10'ar dk. sırasıyla %30, %50, %70, %90 (iki kez)'lık alkol serilerinden geçirildi. Daha sonra saf propilen oksitte +4 °C'de 10 dk. bekletildi. Üzerine 1:1 oranında propilen oksit/epon karışımı ilave edilerek, +4 °C'de 10 dk. bekletildi. Saf epon karışımı eklenerek, 48 saat +4 °C'de tutuldu ve araldite gömüldü. Ultramikrotomla (LEICA ULTRACUT R) 60 nm kalınlığında kesitler alındı ve kesitler bakır gridler üzerine yerleştirildi. Kesitler, uranil asetat+kurşun sitrat boyası ile boyanarak, transmisyon elektron mikroskobu (JEOL JEM 1220)'nda incelendi.

2.5.2. Moleküler Yöntemlerle Virüs İzolatlarının Tanımlanması

2.5.2.1. DNA Ekstraksiyonu

Viral DNA ekstraksiyonu için, her izolattan 100 µl alındı ve üzerine 3 X DAS (0.3 M Na₂CO₃, 0.5 M NaCl, 0.03 M EDTA; pH 10.5) solüsyonu eklenerek, 30 dk. oda sıcaklığında 40 rpm hızda rotatorda inkübe edildi. Daha sonra oda sıcaklığında 20.300 x g'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar atıldı. Pellet 300 µl lizis tamponu (10 mM Tris, 100 mM EDTA, %1 SDS; pH 8.0) ve 25 µl proteinaz K ile çözülerek, 50 °C'de gece boyu inkübe edildi. Üzerine 40 µl RNaz eklenerek, 37 °C'de 30 dk. inkübe edildi ve sonra 1 dk. buz üzerinde bekletildi. Buzdan alınan solüsyona 100 µl protein presipitasyon solüsyonu eklendi ve 5 dk. buzda bekletildi. Sürenin sonunda, +4 °C'de 16.000 x g'de 10

dk. santrifüj edildi. Süpernatant yeni tüpe alındı ve üzerine 500 µl izopropanol eklenerek +4 °C’de 16.000 x g’de 2 dk. santrifüj edildi. Süpernatant dökülerek, pellet iki kez %70’lik etanol (EtOH) ile yıkandı. Tüpler, 37 °C’de 20 dk. ağzı açık bırakılarak EtOH’un uçması sağlandı ve 30 µl dH₂O eklenerek 55 °C’de 10 dk. bekletildi (Nakai ve Kunimi, 1997). İzole edilen DNA’ların temizliği ve miktarı Nanodrop (Thermo Scientific) ile ölçüldü.

2.5.2.2. Hedef Gen Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması

İzole edilen DNA’lar, bakülovirüslere ait polihedrin (*polh*), geç ifade faktörü 8 (*lef8*) ve geç ifade faktörü 9 (*lef9*) korunmuş kısmi gen bölgelerine ait primerler (Tablo 8) kullanılarak, PCR ile çoğaltıldı. PCR reaksiyonu 2.3.2’de belirtilen miktarlarda ve koşullarda GoTaq enzimi ile yapıldı. PCR ürünleri, agaroz jelde görüntülendi ve elde edilen bantlar jelden kesilerek temizlendi. DNA’ların konsantrasyonları nanodropta ölçüldü ve 20 µl’lik hacim içinde 50 ng/µl konsantrasyonda hazırlanarak, dizi analizi için Makrogen Firmasına (Hollanda) gönderildi.

2.5.3. Virüs İzolatlarının Filogenetik Analizi

Elde edilen diziler NCBI verileri ile karşılaştırıldı ve yüksek benzerlik gösteren örnekler ile birlikte bir adet dış grup analizde kullanılmak üzere seçildi (Tablo 9). Filogenetik analiz için tüm genler peşpeşe (*polh/lef8/lef9*) eklendi ve veriler BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999) programında düzenlendi. Filogenetik ağaç çizimi için MEGA 6 (Tamura vd., 2007) programında bulunan Neighbor-Joining analizi ve Bootstrap metodu (1000 tekrarlı) kullanıldı.

Tablo 9. Filogenetik analizde kullanılan *Heliothis* NPV izolatları

Viral İzolatlar	Suşlar	Kaynak	<i>polh</i>	<i>lef8</i>	<i>lef9</i>
H. armigera MNPV	3154	Rusya	HQ246031	HQ246047	HQ246039
H. armigera MNPV	120	Polonya	HQ246024	HQ246040	HQ246032
H. armigera MNPV	1072	Çin	HQ246028	HQ246044	HQ246036
H. armigera MNPV	443	Hindistan	HQ246026	HQ246042	HQ246034

Tablo 9'un devamı

H. gelotopoeon SNPV	-	Arjantin	KP340517	KP340515	KP340516
H. zea SNPV	1578	Teksas	HQ246088	HQ246115	HQ246142
H. armigera SNPV	1073	Çin	HQ246081	HQ246108	HQ246135
H. armigera SNPV	138	Polonya	HQ246073	HQ246100	HQ246127
H. armigera NPV	O1	Türkiye	MG870623	MH161371	MH161372
H. armigera NPV	O2	Türkiye	MN249090	MN249088	MN249089
H. armigera NPV	S1	Türkiye	MN249085	MN249086	MN249087
H. armigera NPV	S2	Türkiye	MN249091	MN249092	MN249093
H. armigera NPV	TR	Türkiye	MH161372	MG870624	MG870625
H. armigera SNPV	126	Hindistan	HQ246072	HQ246099	HQ246126
H. armigera SNPV	75	Sudan	HQ246071	HQ246098	HQ246125
H. armigera SNPV	1186	Güney Afrika	HQ246085	HQ246112	HQ246139
H. armigera GV	-	ABD	EU255577	EU255577	EU255577

2.5.4. Virüs İzolatlarının Kimura-2 Parametre Analizi

Bu analiz, farklı *Heliothis* konaklarından izole edilen virüs izolatlarının birbirlerinin varyantı olup olmadığını belirlemek amacıyla yapıldı. Analiz için izolatların ve filogenetik ağaçta kullanılan örneklerin *polh*, *lef8* ve *lef9* nükleotit dizileri peşpeşe sıralanarak, BioEdit programında karşılaştırıldı ve eşleşmeyen kısımlar kesildi. Çalışmanın devamında, MEGA 6 programında bulunan Kimura-2 parametre analizi kullanıldı (MEGA software 6.0.6 versiyon).

2.5.5. Virüs İzolatlarının Restriksiyon Endonükleaz Profili

Viral genomlar, yaklaşık büyüklüklerinin hesaplanması ve kesim noktalarındaki farklılıkların belirlenmesi amacı ile *KpnI* enzimi ile kesildi. Kesim reaksiyonu: 3 µl 10X tampon, 0.5 µl *KpnI* (10 U/ µl) (Promega, ABD) enzimi, 10 µl genomik DNA (1 µg) ve 16.5 µl dH₂O olacak şekilde toplam 30 µl hacimde her enzim ve örnek için ayrı ayrı hazırlandı. İnkübasyon, 37 °C'de 4 saat yapıldı. Aynı şekilde lamda faj (λ) DNA'sı da *NarI* ve *HindIII* enzimleri ile ayrı ayrı kesilerek markır oluşturuldu. Kesim reaksiyonları %0.7'lik agaroz jelde 16 voltda 16 saat yürütüldü. Jel, 15 dk. etidyum bromürde

bekletildikten sonra görüntüledi. Kodak Molecular Imaging Software 4.0.5 programı kullanılarak kesim sonucundaki bantların moleküler ağırlıkları hesaplandı.

2.6. Virüs İzolatlarının Virülans Özelliklerinin Belirlenmesi

2.6.1. Tarama Testleri

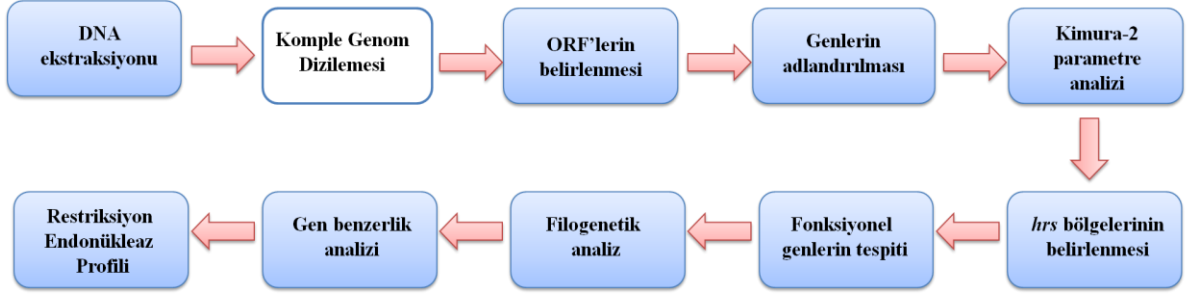
Virülansı en etkili olan suşun belirlenmesi için tüm izolatların konsantrasyonu 1×10^7 PIB/ml olacak şekilde ayarlandı ve baş çevreleri ölçülerek 2. dönem olduğu belirlenen *H. armigera*, *H. peltigera*, *H. virescens* ve *H. nubigera* larvaları 2.4'de anlatılan damlacık yedirme metodu ile enfekte edildi. Kontrol grubunda dH₂O kullanıldı. Her biyotest için 30 larva kullanıldı ve 14 gün boyunca her gün kontrol edildi. Tüm biyotestler 3 kez tekrarlandı ve ölüm oranları Abbott formülüne göre hesaplandı (Abbott, 1925).

2.6.2. Doz Denemeleri

Tarama testi sonucunda HearNPV-TR izolatının tüm *Heliothis*'ler üzerinde yüksek öldürücü etkiye sahip olduğu belirlendi. Bu nedenle doz denemesi testleri HearNPV-TR izolatı kullanılarak yapıldı. HearNPV-TR'nin 6 farklı dozu (1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 ve 1×10^8 PIB/ml) ülkemizdeki 4 *Heliothis* türünün 2. dönem larvalarına uygulandı. Doğadan toplanan larvalar laboratuarda yetiştirilerek baş çevreleri ölçüldü ve biyotestler 2.4'de belirtilen şartlarda gerçekleştirildi.

2.7. Genom Analizi

Ülkemizdeki tüm *Heliothis* türleri üzerinde etkili bir izolat olduğu belirlenen HearNPV-TR'nin genomu analiz edildi. Analiz için Şekil 15'de belirtilen iş akışı izlendi. İş akışında sadece 2. aşama olan genom dizisinin belirlenmesi kısmı Macrogen (Güney Kore) firması tarafından hizmet alımıyla yapıldı.



Şekil 15. Genom analizi iş akışı

2.7.1. DNA Ekstraksiyonu ve Konsantrasyon Tayini

Virüs izolatının genomik DNA ekstraksiyonu için, 2.5.2.1.'de belirtilen Nakai ve Kunimi (1997) tarafından geliştirilen metot kullanıldı. DNA'nın konsantrasyonu ve temizliği (260/280 oranı) nanodrop ile belirlendi. Aynı zamanda DNA bandının varlığı ve temizliği %0.7'lik agaroz jelde 30 dakika 80 voltta yürütülerek teyit edildi.

2.7.2. Genom Dizilemesi

Firma (Macrogen, Güney Kore) tarafından yapılan genom dizisinin belirlenmesinde kullanılması gereken program tarafımızca belirlendi. En güvenilir yöntemlerden biri olan üçüncü nesil dizileme analizi, Pacific Bioscience (PacBio) tercih edildi. PacBio, uzun okuma methoduna dayalı bir analizdir ve her seferinde 20.000 dizi okuma özelliğine sahiptir. Bu metoda göre, DNA dizi analizi için, viral DNA'nın kalitesi tayin edildikten sonra firma tarafından Şekil 16'da belirtilen iş akışı izlendi.



Şekil 16. Dizileme ve analiz iş akışı

2.7.2.1. Viral DNA'nın Kalite Tayini

Firma tarafından ilk olarak, ham verilerin oluşturulması için gerekli olan dizileme aşaması gerçekleştirildi. Bu aşamada öncelikle tarafımızca gönderilen DNA örneğinin analize uygun olup olmadığı test edildi. Bunun için floresan bir boya olan ve yalnızca sağlam çift zincirli DNA'ya bağlanan pikogreen boyası kullanılarak, DNA miktarı Victor 3 fluorometry cihazında ölçüldü. Ayrıca, DNA'nın varlığı da %1'lik agaroz jelde 30 dakika, 100 voltta elektroforez yapılarak teyit edildi. DNA'nın analiz için uygun olduğuna karar verildikten sonra, dizileme ve ön işleme aşamalarına geçildi.

2.7.2.2. Dizi Analizi

SMRTbell (TM) halkasal kalıp okunmasında ve platform çalışmasının kalite kontrolünde DNA polimeraz okumaları tercih edildi. Polimeraz okumaları, sadece yüksek kaliteli bölgeleri içerecek şekilde kesildi. Her bir polimeraz okuması bir veya daha fazla alt okuma oluşturmak için parçalandı. Illumina verilerinde, 5' ve 3' adaptör eklenmesini takiben, DNA'nın veya cDNA'nın rastgele bölünmesi ile dizi kütüphanesi hazırlandı. Bu

kütüphane, parçaların kütüphane adaptörlerini tamamlayan bir yüzeye bağlı olarak yakalandığı akış hücresine yüklendi. Dizileme verileri analiz için ham verilere dönüştürüldü ve ön işlem aşamasına geçildi. Tek geçişli okumalar ham okumalarla eşleştirildi. Okumaların düzeltilmesi ve filtrelenmesi yapıldı. Tüm genom birleştirildikten sonra, bazların toplam sayısı ve %GC miktarı hesaplandı. Birleştirilen okuma dizileri, HiSeq verileri kullanılarak düzeltildi. *De novo* birleştirmede, PacBio okumaları için Unicycler programı (v0.4.6) kullanıldı. Mümkün olan en iyi birleştirme için, hem Illumina okumaları hem de PacBio verileri birlikte değerlendirilerek karma birleştirme yapıldı.

2.8. Viral Genomun Biyoinformatik Analizi

Firma tarafından hazırlanan veriler bize gönderildikten sonra yapılan işlemler, alt başlıklar halinde ifade edildi.

2.8.1. Açık Okuma Zincirlerinin (ORF) Belirlenmesi

Genom dizisi, Benchling (Better tools, faster research) programına aktarıldı. Bakülovirüslerde ilk ORF'nin polihedrin olması kural olduğu için (Vlak ve Smith, 1982; Hayakawa vd., 1999; Ijkel vd., 1999), bu ORF en başa alınarak firmadan gelen veriler düzenlendi. HearNPV-TR genomundaki ORF'lerin bulunması için, *H. armigera* NPV Avustralya izolatı (Accession no: KJ909666) referans olarak tercih edildi. Aynı zamanda, 50 aminoasitten büyük protein kodlama kapasitesine sahip diziler, ORF'ler olarak belirlendi.

2.8.2. Genlerin Adlandırılması

Genlerin adlandırılması, NCBI Blastp programında diğer bakülovirüs genleri ile karşılaştırılarak yapıldı. Tüm genler adlandırıldıktan sonra halkasal genom haritası Benchling programı ile oluşturuldu.

2.8.3. Kimura-2 Parametre Analizi

Bölüm 2.5.4.'de bakülovirüslere ait üç korunmuş kısmi gen bölgesine (*polh*, *lef8*, *lef9*) göre yapılan bu analiz, HearNPV-TR'in genom analizi yapıldıktan sonra belirlenen 38 kor gene göre tekrar yapıldı. Analiz için Alfabakülovirüs I, Alfabakülovirüs II ve Betabakülovirüs sınıflarında bulunan 51 adet bakülovirüs genomu kullanıldı. Tüm izolatlara ait kor genler peş peşe sıralanarak, BioEdit programına aktarıldı. Çakışmayan kısımlar kesilerek veriler düzenlendi ve MEGA 6 programında bulunan Kimura-2 parametre analizi kullanıldı. Böylece farklı *Heliothis* konaklarından izole edilen viral izolatların birbirlerinin varyantı olup olmadığı teyit edildi.

2.8.4. Homolog Tekrar Bölgelerinin Belirlenmesi

Homolog tekrar bölgeleri (hrs), AT içeriği yüksek, tekrarlayan ve kusurlu palindromları bulunan ve çoğu bakülovirüs genomunda mevcut olan bölgelerdir. Hrs bölgeleri, genomlar içindeki konuma, kopya sayısına ve farklı bakülovirüsler arasındaki nükleotit dizilerine göre değişmektedir. Bu bölgelerin, replikasyon kaynakları ve transkripsiyon artırıcı olarak hareket ettiği bilinmektedir (Theilmann ve Stewart, 1992; Pearson ve Rohrmann, 1995). HearNPV-TR genomuna ait hrs bölgeleri Benchling programı ile belirlendi.

2.8.5. Fonksiyonel Genlerin Tespiti

Bakülovirüslerde genler yaptıkları görevlere göre sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflar viral replikasyon, transkripsiyon, translasyon, apoptozis inhibisyonu, virüs inşası gibi temel fonksiyonlarda rol alan birçok geni içermektedir (Ferrelli vd., 2012). Ayrıca, bakülovirüslerde işlevleri açıkça tanımlanamayan bazı korunmuş genler de bulunmaktadır. HearNPV-TR genomunda belirlenen ORF'ler taranarak bu işlevlerden sorumlu olan tüm genler sınıflandırıldı. Böylece HearNPV-TR genomunda mevcut olan veya olmayan genler net olarak belirlendi.

2.8.6. Filogenetik Analiz

HearNPV-TR genomunun, NCBI veritabanında bulunan Alfabakülovirüs I, Alfabakülovirüs II ve Betabakülovirüs sınıflarına ait toplam 51 adet bakülovirüs genomu ile filogenetik analizi yapıldı. Bu analizde, tüm genomların 38 kor genine ait aminoasit dizileri peşpeşe sıralanarak, BioEdit (7.1.3.0) programında karşılaştırıldı. Çakışmayan kısımlar kesildikten sonra veriler MEGA (6.06) programına yüklendi. Filogenetik ağaç, Maximum Likelihood methodundaki 1000 tekrarlı Jones-Taylor-Thornton (JTT) modeli kullanılarak çizildi.

2.8.7. Gen Benzerlik Analizi

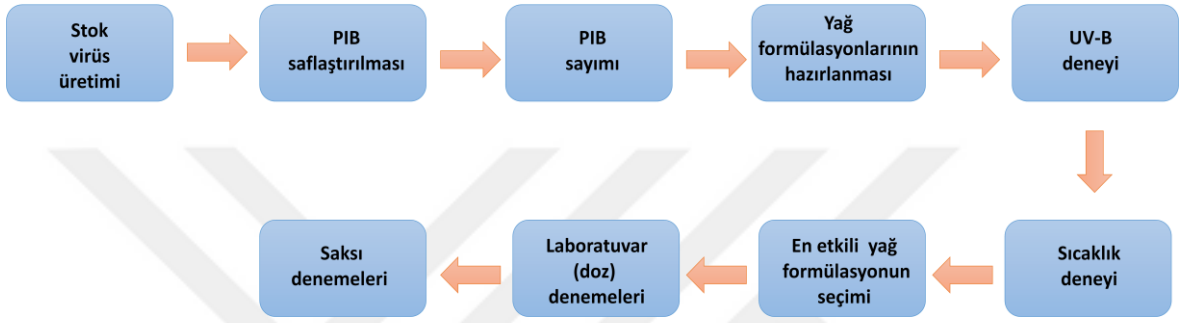
Gen benzerlik analizi, HearNPV-TR genomu ile diğer bakülovirüs genomlarındaki ortak ORF'lerin belirlenmesi için yapıldı. Bu analize hem genomlar arasında paylaşılan hem de paylaşılmayan tüm genler dahil edildi. Bir önceki adımda tespit edilen ve isimlendirilen genlerin benzerlikleri, Alfabakülovirüs sınıfının tip türü olan AcMNPV, Betabakülovirüslerin tip türü olan CpGV ve *H. armigera* NPV'lerden HasNPV, HaSNPV-C1, HaSNPV-G4, HaSNPV-AU olmak üzere dört farklı izolata ait genom ile karşılaştırıldı. Bunun için literatürde diğer bakülovirüsler için yapılan numaralandırma dikkate alınarak önce genlere numaralar verildi. Numaralandırılan genler, Microsoft excell yazılımına girildi. Gene parity plot analizi olarak adlandırılan işlemde X eksenini bir virüsün gen sırasını Y eksenini diğer virüsün gen sırasını ifade edecek şekilde düzenlendi. Bu analizin sonucunda iki genomda da olan genler ortak düzlemde çakıştı. Birinde olup diğerinde olmayan genler ise X ve Y eksenleri üzerinde nokta halinde görüldü. Böylece, Gene parity plot analizi ile genomların gen organizasyonu arasındaki farklar karşılaştırılmış oldu.

2.8.8. Restriksiyon Endonükleaz Profili

HearNPV-TR genomundaki *XhoI* ve *KpnI* restriksiyon endonükleaz enzimlerinin ayrı ayrı kesim bölgeleri Benchling programı kullanılarak, diğer *Heliothis* NPV genomları ile (HasNPV, HaSNPV-C1, HaSNPV-G4 ve HaSNPV-AU) *in silico* olarak kıyaslandı.

2.9. Virüs İzolatından Biyopreparat Hazırlanması

Laboratuvar denemeleri sonucunda ülkemizdeki tüm *Heliothis* türleri üzerinde etkili olduğu belirlenen HearNPV-TR izolatının doğadaki çevre şartlarına karşı da dirençli hale gelmesi için üç farklı yağ oranı içeren formülasyonları hazırlandı. Formülasyon çalışmalarında Şekil 17’de belirtilen iş akışı izlendi.



Şekil 17. Formülasyon çalışmaları iş akışı

2.9.1. Stok Virüs Üretimi

2.9.1.1. Virüs Çoğaltılması ve PIB Saflaştırılması

Formülasyon hazırlanması için öncelikle HearNPV-TR izolatının canlı konak üzerinde çoğaltılması sağlandı. Laboratuvarda kültürü bulunan *H. armigera*'nın yumurtadan yeni çıkan 100 adet larvası, 10^7 PIB/ml dozundaki HearNPV-TR ile damlacık yedirme metodu kullanılarak enfekte edildi. *Heliothis* larvalarında 3. dönemdan sonra kannibalizm (yamyamlık) görüldüğünden dolayı her bir larva yapay besin bulunan kaplara tek tek yerleştirildi. Tipik virüs enfeksiyon belirtileri gözleninceye kadar iklim dolabında yetiştirilmeye devam edildi. Ölen larvalar aynı tüpte toplandı ve üzerine eşit hacimde dH₂O eklenerek, homojenizatörde ezildi. Elde edilen süspansiyondan 2.4’de belirtildiği gibi PIB’ler saflaştırıldı.

2.9.1.2. Konsantrasyon Tayini

Saflaştırılan stok virüs süspansiyonunun konsantrasyonunun belirlenmesi için, 100 kat seyreltilen solüsyondan Thoma lamı üzerine 10 µl damlatıldı ve lamel ile kapatılarak, 40X büyütmede ışık mikroskopunda PIB'ler sayıldı.

2.9.2. Yağ Tabanlı Formülasyon Hazırlanması

HearNPV-TR izolatını çevre şartlarına karşı korumak ve doğada aktivitesini kaybetmesini önlemek için yağ tabanlı formülasyonları hazırlandı. Yağ olarak nispeten maliyeti düşük olan ayçiçek yağı kullanıldı. Formülasyonda bulunan yağ oranının bitki fotosentezini etkilemeyecek düzeyde olmasına dikkat edildi ve etki düzeyini saptamak amacı ile üç farklı yağ oranında (%5, %7.5, %10) 'Helicopel' adını verdiğimiz formülasyonlar hazırlandı. Ayrıca, PIB süspansiyonunu hem daha dayanıklı hale getirmek hem de ticari olarak satılan diğer ürünler kadar etkili kılmak için Tablo 10'da görevleri ile birlikte belirtilen bazı doğal katkı maddeleri de formülasyona eklendi.

Tablo 10. Hazırlanan Helicopel biyopreparatının içeriği

İçindekiler	Görevi	Miktarı
HearNPV-TR saf PIB'si	Aktif içerik (PIB süspansiyonu)	%25
Rafine ayçiçek yağı	UV koruyucu	%5, %7.5, %10
E323 Soya lesitini	Emülsifiye madde, yağ ve su- PIB süspansiyonunun homojen karışmasını sağlar	%5
E422 Gliserin	Buharlaşmayı önlemek ve beslenme arttırıcı, tat verici	%5
E415 Ksantan gum	Kıvam arttırıcı	%1
Silwet L-77	Yüzey gerilimini azaltıcı	%0.5
Kalkoflor M2R	Böcek bağırsağını parçalayıcı	%0.2
E284 Borik asit	Fizyolojik stres oluşturucu	%1
Distile su	Son hacim tamamlanır	~ %50

2.9.3. Ultraviyole-B ve Sıcaklık Deneyleri

Ham PIB süspansiyonu, doğada yüksek sıcaklık ve güneş ışınlarından gelen UV-B dalgasına (285-315 nm dalga boyundaki) karşı oldukça duyarlıdır. Bu nedenle hazırlanan formülasyonlar, ham PIB solüsyonu ve ticari bir Heliiothis NPV ürünü, laboratuvar ortamında yapılan UV-B ve sıcaklık deneyleri ile kıyaslandı. Aynı zamanda üç farklı yağ oranı içeren formülasyonlardan hangisinin UV-B ve sıcaklık için yeterli korumaya sahip olduğu belirlendi. Buna göre PIB süspansiyonları, 24 gözlü kaplara 250'şer µl hacimde konuldu ve 15 watt, 306 nm dalga boyundaki UV-B (Fotodyne, Almanya) ışınlarına 1 saat, 3 saat ve 5 saat olmak üzere üç farklı süre maruz bırakıldı. Belirtilen süreler sonunda toplanan solüsyonlar 3. dönem *H. armigera* larvalarına damlacık yedirme metodu ile verildi ve solüsyonların UV'den etkilenme oranları larvalar üzerinde tespit edildi. Aynı şekilde 24 gözlü kaplara konulan tüm PIB solüsyonları 28 °C, 35 °C ve 42 °C sıcaklıklardaki etüvlerde 1 saat, 3 saat ve 5 saat inkübe edildi. Tüm deneyler 3 tekrarlı olarak hazırlandı. Sıcaklığa maruz bırakılan solüsyonlar larvalara verildi ve solüsyonların sıcaklıktan etkilenme oranları belirlendi. Deneylerin sonucu 14 gün sonra alındı ve %5 yağ içeren formülasyonun virüs enfeksiyonu için yeterli korumayı sağladığı belirlendi. Bu konsantrasyon, bundan sonraki doz denemesi ve saksı denemesi çalışmaları için kullanıldı.

2.9.4. Doz Denemesi

Helicopel'in %5 yağ içeren dozun denemesi, *H. armigera*'nın 3. dönem larvaları üzerinde test edildi. Ayrıca ham PIB (HearNPV-TR) ve Heliiothis NPV içerikli ticari ürün de kullanılarak kıyaslama yapıldı. PIB süspansiyonlar 1×10^3 - 1×10^{10} PIB/ml arasında sekiz farklı dozda hazırlanarak damlacık şeklinde larvalara yedirildi. Kontrol grubundaki larvalara dH₂O verildi. Her test için 30 larva kullanıldı ve deneyler 3 tekrarlı yapıldı. Ölüm oranları 14 gün boyunca günlük olarak takip edildi ve elde edilen veriler Abbott formülüne göre hesaplandı (Abbott, 1925). Lethal konsantrasyonlar (LC₅₀ ve LC₉₅) probit analizi ile belirlendi (Finney, 1971).

2.9.5. Saksı Denemesi

Deneyden 20 gün önce, 80 x 29 x 20 cm uzunluğundaki dikdörtgen saksılara marul fideleri dikildi ve büyümeleri beklendi. Tez kapsamında hazırlanan %5 yağ içeren Helicopel, ticari Heliiothis NPV ürünü ve kontrol grubu olmak üzere üç farklı uygulama için 3 tekrarlı olacak şekilde marul saksısı düzenekleri kuruldu. Bu test için viral formülasyonların doz denemesinde belirlenen LC₉₅ değeri (1×10^8 PIB/ml), kontrol grubu için ise dH₂O kullanıldı ve solüsyonlar püskürtme tabancası ile yapraklara uygulandı. Marul yaprakları kuruduktan sonra üzerlerine 3. dönem 30'ar adet *H. armigera* larvası bırakıldı. Kontrol grubundaki tüm yapraklar larvalar tarafından tüketildiğinde (10. gün), deney sonlandırıldı ve yapraklarda görülen zararlar birbirleri ile kıyaslandı.

2.9.6. Veri Analizleri

Tüm virülans çalışmaları sonucunda elde edilen ölüm oranları Abbott formülüne göre (Abbott, 1925) hesaplandı. Veriler, GraphPad Prism 5 Yazılım programı kullanılarak, probit ve tek-yönlü ANOVA ile analiz edildi.

3. BULGULAR

3.1. Virüs Tespiti

Yeşilkurt larvalarında virüs taraması yapabilmek için 2014-2017 yılları Haziran-Ağustos ayları arasında larvalar doğal ortamlarından toplandı. Adana, Osmaniye ve Şanlıurfa illerinde farklı konukçu bitkiler üzerinden *H. armigera* türüne ait 720, *H. peltigera* türüne ait 357, *H. nubigera* türüne ait 148 ve *H. viriplaca* türüne ait 122 larva elde edildi (Tablo 11). Arazi çalışmaları sırasında kendiliğinden ölü olarak bulunan örnekler ayrı tüplere konularak laboratuvara getirildi. Virüs enfeksiyonundan şüphelenilen örnekler makroskopik olarak incelendiğinde, kütikulanın eriyerek böcek vücudunun cıvık bir hal aldığı ve sarımsı-kahverengi bir renge dönüştüğü gözlemlendi.

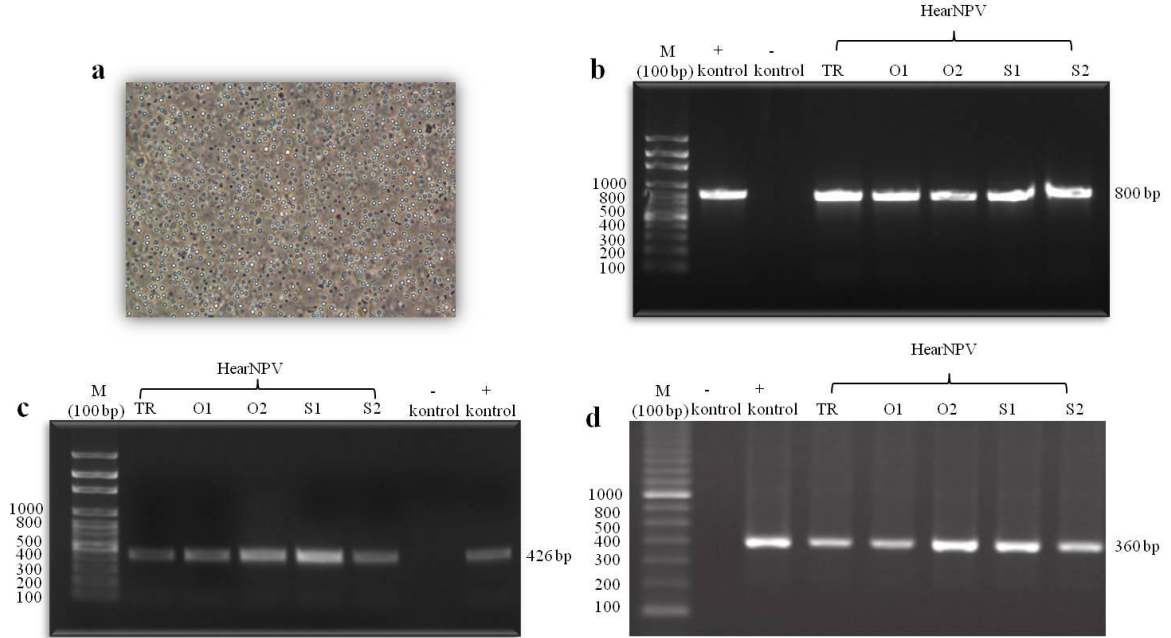
Tablo 11. Arazi çalışmalarında toplanan yeşilkurt örneklerine ait veriler

Tür ismi	<i>H. armigera</i>		<i>H. peltigera</i>	<i>H. viriplaca</i>	<i>H. nubigera</i>
Bölge	Osmaniye	Şanlıurfa	Adana	Şanlıurfa	Şanlıurfa
Konukçu bitki	Pamuk, Ayçiçeği	Pamuk	Aspir	Nohut	Nohut
Örnekleme mevsimi	2017	2017	2014	2016	2016
İncelenen larva sayısı	494	226	357	148	122
Enfekte larva sayısı	9	4	5	4	-

Virüs varlığından şüphelenilen örneklerin mikroskopik incelemesi için ilk önce ışık mikroskobu kullanıldı. Her bir numune için lam-lamel arası preparatlar hazırlanarak, polihedral inklüzyon cisimlerinin (PIB) varlığı araştırıldı. Bu yapıları içeren örnekler dijital kamera ile görüntülendi (Şekil 18a).

Makroskopik ve mikroskopik olarak virüs enfeksiyonları belirlenen larval örneklerden virüs taraması için farklı DNA virüslerine ait primerler kullanılarak doku PCR

yapıldı. Örneklerin 5 tanesinde bakülovirüs genlerine ait (*lef8*, *polh*, *lef9*) bantlar gözlemlendi (Şekil 18b, c, d).



Şekil 18. Yeşilkurt larvalarında virüs enfeksiyonları. M: Markır. (a) Işık mikroskopisinde gözlem. (b) Bakülovirüs *lef8* genine göre, (c) Bakülovirüs *polh* genine göre ve (d) Bakülovirüs *lef9* genine göre PCR analiz görüntüsü.

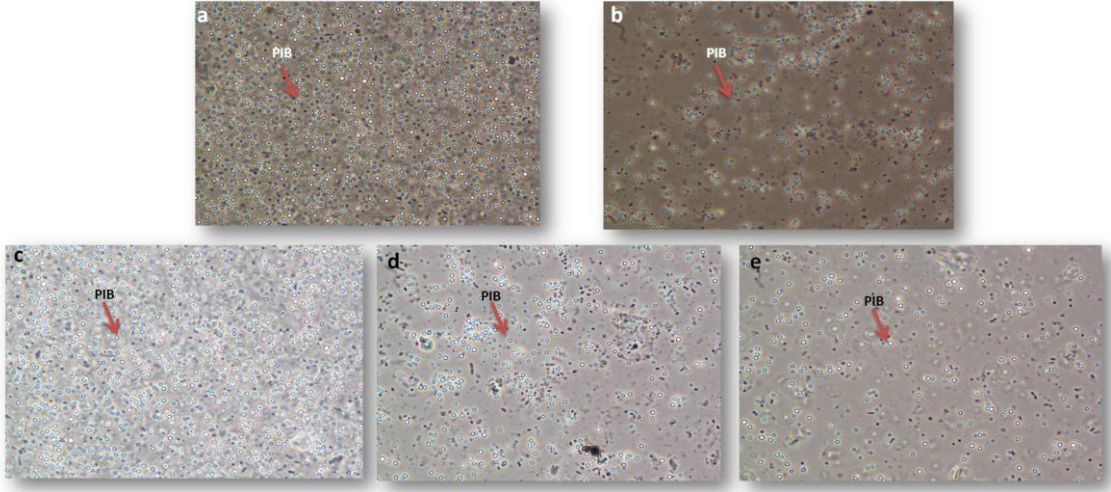
Doku PCR'ı sonucunda çoğaldığı belirlenen bakülovirüs *lef8* (800 baz çifti), *polh* (426 baz çifti) ve *lef9* (360 baz çifti) genlerine ait DNA örneklerinin DNA dizileri belirlendi. Diziler NCBI veri tabanında bulunan örnekler ile karşılaştırıldı. Tüm örneklerle ait dizi verilerinin erişim numarası Tablo 9'da belirtildi. Karşılaştırmalar sonucunda tüm örneklerin nükleopolihedrovirüs olduğu belirlendi. Ayrıca, örneklerden ikisinin SNPV (HearNPV-TR, HearNPV-S1) ve diğerlerinin MNPV (HearNPV-O1, HearNPV-O2, HearNPV-S2) izolatlarına benzerlik gösterdiği belirlendi (Tablo 12).

Tablo 12. Yeşilkurt örneklerinden elde edilen viral enfeksiyon kaynakları

Tür ismi	<i>H. armigera</i>		<i>H. peltigera</i>	<i>H. viriplaca</i>	<i>H. nubigera</i>
Bölge	Osmaniye	Şanlıurfa	Adana	Şanlıurfa	Şanlıurfa
Enfeksiyon kaynağı	MNPV	SNPV	SNPV	MNPV	-
İzolat adı	HearNPV-O1 HearNPV-O2	HearNPV-S1	HearNPV-TR	HearNPV-S2	-

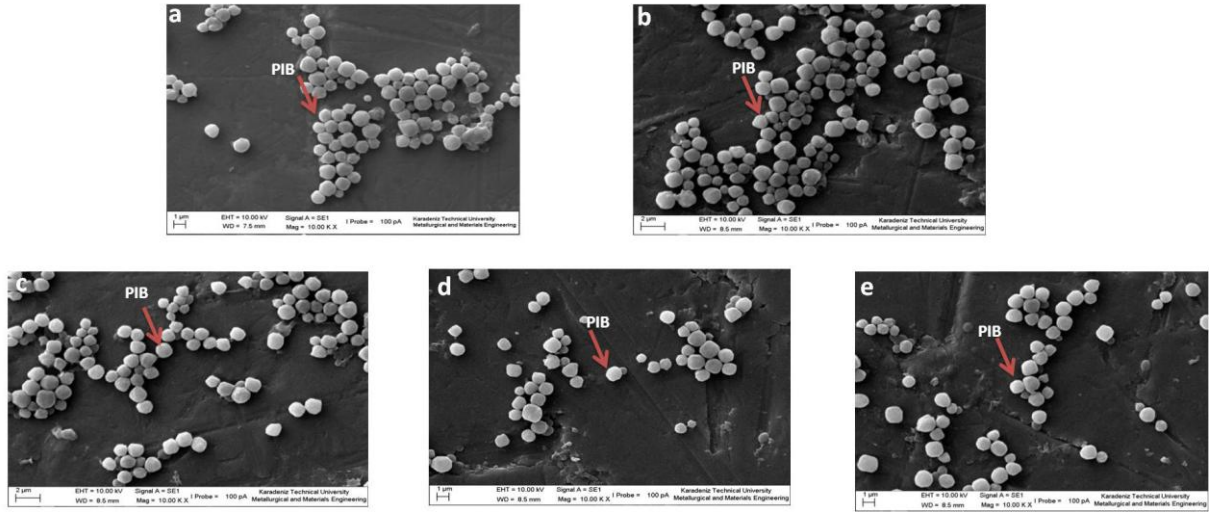
3.2. İzolatların Gömülü Yapılarının Morfolojik Özellikleri

Örneklerin hepsi 2.4’de belirtilen metoda göre böcek dokularından saflaştırıldı ve mikroskopi çalışmaları yapıldı. Gerçekleştirilen morfolojik ve moleküler taramalar sonucunda virüs varlığı tespit edilen örnekler ışık mikroskobunda 100X büyütmede görüntülendi (Şekil 19).



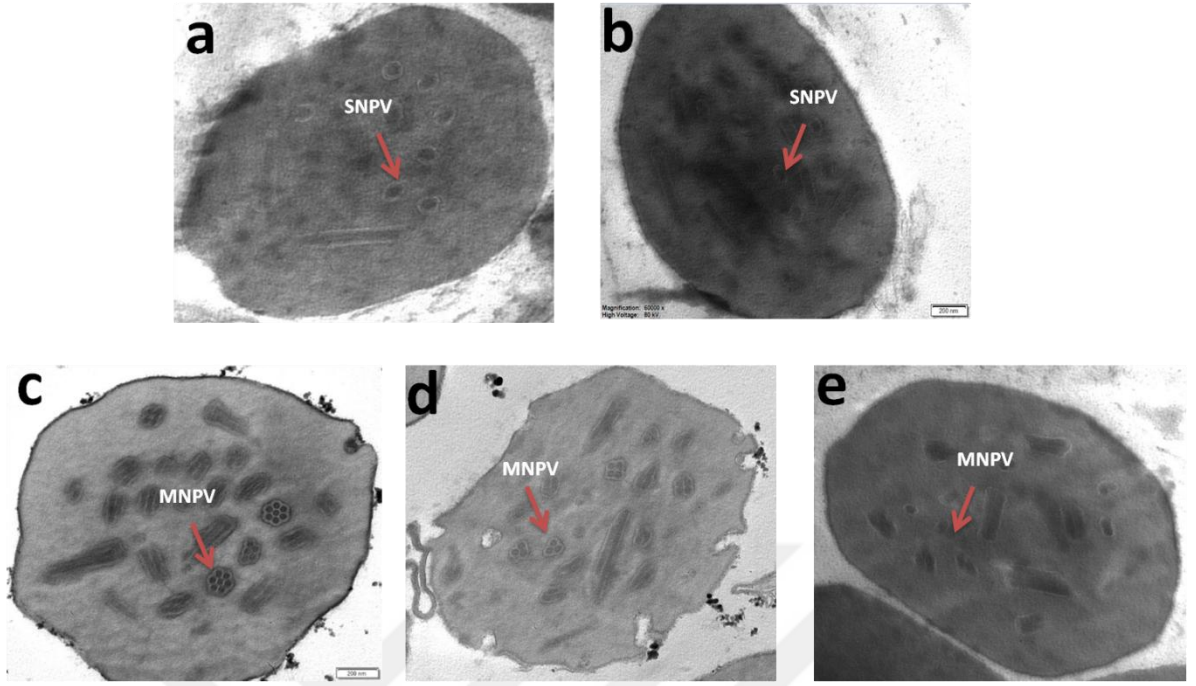
Şekil 19. Heliothis NPV örneklerinin ışık mikroskobu görüntüleri. Oklar polihedral inklüzyon yapılarını (PIB) göstermektedir (100X). a. HearNPV-TR, b. HearNPV-S1, c. HearNPV-O1, d. HearNPV-O2, e. HearNPV-S2.

Örneklerde bulunan PIB yapılarının şekli ve boyutu taramalı elektron mikroskobunda 10.000X büyütmede gözlemlendi. İncelemelerde 5 virüs izolatının da düzensiz yapıda oldukları gözlemlendi (Şekil 20). PIB boyutları HearNPV-TR (0.73-1.66 μm), HearNPV-S1 (1.23-1.31 μm), HearNPV-O1 (1.13-1.37 μm), HearNPV-O2 (1.05-1.18 μm) ve HearNPV-S2 (1.28-2.26 μm) olarak belirlendi (Tablo 13).



Şekil 20. Heliobacterium NPV'lerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri. Oklar polihedral inklüzyon yapılarını (PIB) göstermektedir (10.000 X). a. HearNPV-TR, b. HearNPV-S1, c. HearNPV-O1, d. HearNPV-O2, e. HearNPV-S2.

İnklüzyon yapılarının detaylarını belirlemek için yapılan geçirimli elektron mikroskobu çalışmalarında, iki izolatın tekli (HearNPV-TR, HearNPV-S1), üç izolatın ise çoklu (HearNPV-O1, HearNPV-O2, HearNPV-S2) nükleokapsit içerdiği gözlemlendi (Şekil 21). Nükleokapsit boyutları ise HearNPV-TR (184×41 nm), HearNPV-S1 (222×69 nm), HearNPV-O1 (279×56 nm), HearNPV-O2 (232×48 nm) ve HearNPV-S2 (146×34 nm) izolatları için tabloda verildi (Tablo 13).



Şekil 21. Heliothis NPV'lerin geçirimli elektron mikroskobu görüntüleri. Oklar inklüzyon yapılarında gömülü olan zarflı nükleokapsitleri göstermektedir. Şekil 21a ve 21b'de tek nükleokapsit (SNPV), 21c, 21d ve 21e'de ise çok nükleokapsitler (MNPV) gösterilmektedir. a. HearNPV-TR, b. HearNPV-S1, c. HearNPV-O1, d. HearNPV-O2, e. HearNPV-S2.

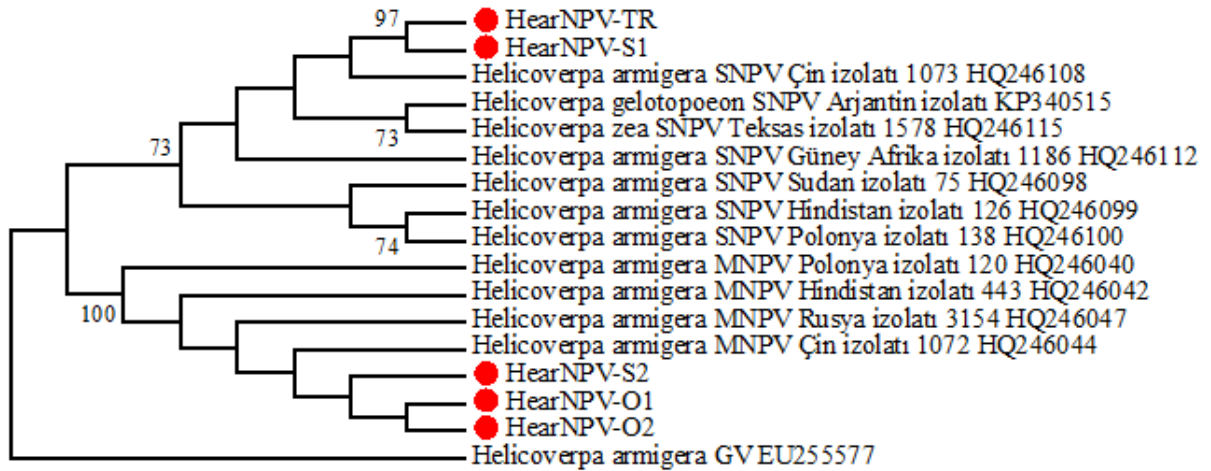
Tablo 13. Heliothis NPV izolatlarının boyutları

İzolat	PIB	Nükleokapsit
HearNPV-TR	0.73-1.66 μm	184 \times 41 nm
HearNPV-S1	1.23-1.31 μm	222 \times 69 nm
HearNPV-O1	1.13-1.37 μm	279 \times 56 nm
HearNPV-O2	1.05-1.18 μm	232 \times 48 nm
HearNPV-S2	1.28-2.26 μm	146 \times 34 nm

3.3. Virüs İzolatlarının Moleküler Özellikleri

3.3.1. Virüs İzolatlarının Filogenetik Analizleri

Helicoverpa/Heliothis NPV örneklerinin, bakülovirüslere ait korunmuş *polh*, *lef8* ve *lef9* genlerine ait bir önceki basamakta belirlenmiş olan kısmi gen dizileri peşpeşe eklenerek, NCBI veri tabanında bulunan diğer Heliothis (Helicoverpa) NPV dizileriyle birlikte filogenetik analizlere tabi tutuldu. Tekli nükleokapsit içeren HearNPV-TR ve HearNPV-S1 örneklerinin H. armigera SNPV Çin izolatına (HQ246108), çoklu nükleokapsit içeren HearNPV-O1, HearNPV-O2 ve HearNPV-S2 örneklerinin ise, H. armigera MNPV Çin izolatına (HQ246044) yakın olduğu belirlendi. Dış grup olarak, H. armigera GV izolatı kullanıldı (Şekil 22).



Şekil 22. Helicoverpa/Heliothis NPV'lerin *polh*, *lef8*, *lef9* genlerine göre filogenetik analizleri

Farklı *Helicoverpa/Heliothis* türlerinden elde edilen Helicoverpa/Heliothis NPV izolatlarının birbirlerinin varyantı olup olmadığının belirlenmesi için *polh*, *lef8* ve *lef9* genlerine ait nükleotit dizileri peşpeşe sıralandı ve filogenetik analizde kullanılan diğer Heliothis NPV izolatları ile birlikte Kimura-2 parametre analizi yapıldı. Tüm Heliothis SNPV örnekleri arasında 0.050'den küçük bir fark olduğu görüldüğü için hepsinin H. armigera SNPV varyantları oldukları belirlendi (Tablo 14).

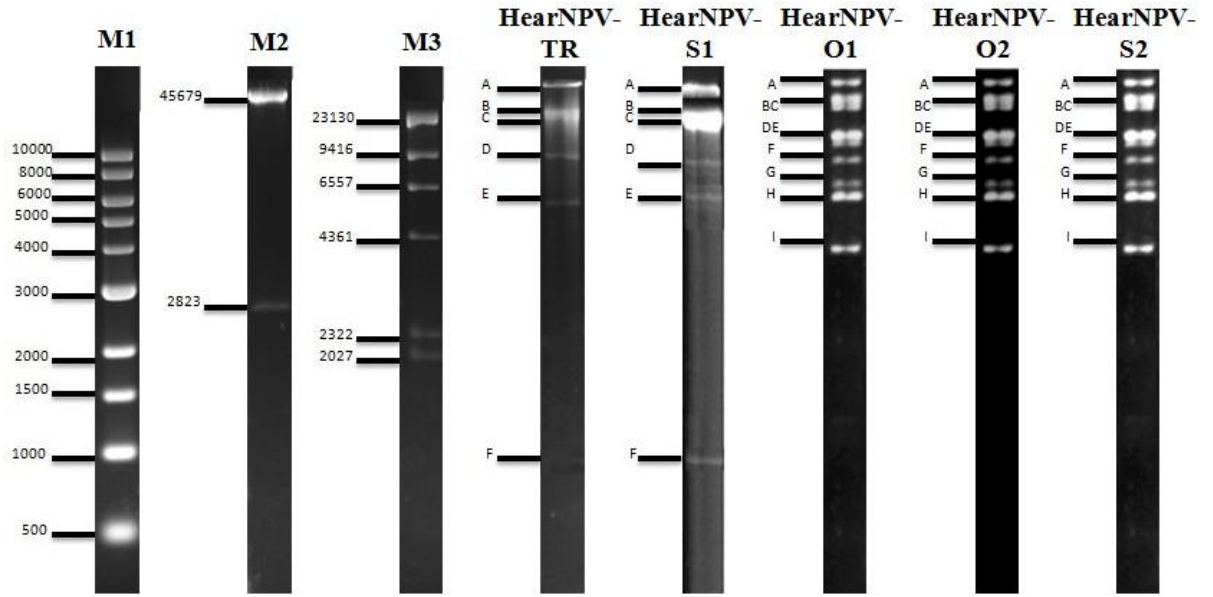
Tablo 14. *Helicoverpa/Heliothis* NPV örneklerinin kısmi *polh*, *lef8*, *lef9* gen bölgelerine göre Kimura-2 analizi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1 HearNPV-TR																
2 HearNPV-O1	0.468															
3 HearNPV-O2	0.468	0.009														
4 HearNPV-S1	0.002	0.463	0.463													
5 HearNPV-S2	0.468	0.002	0.006	0.463												
6 HQ246040	0.468	0.004	0.002	0.463	0.006											
7 HQ246042	0.468	0.004	0.006	0.463	0.002	0.006										
8 HQ246047	0.468	0.006	0.006	0.463	0.002	0.002	0.004									
9 HQ246044	0.468	0.004	0.004	0.463	0.002	0.002	0.004	0.004								
10 HQ246098	0.006	0.472	0.472	0.034	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472							
11 KP340515	0.009	0.459	0.459	0.027	0.459	0.459	0.459	0.459	0.459	0.018						
12 HQ246099	0.006	0.473	0.473	0.034	0.473	0.473	0.473	0.473	0.473	0.004	0.018					
13 HQ246100	0.006	0.473	0.473	0.034	0.473	0.473	0.473	0.473	0.473	0.004	0.018	0.002				
14 HQ246108	0.002	0.463	0.463	0.025	0.463	0.463	0.463	0.463	0.463	0.022	0.009	0.022	0.022			
15 HQ246112	0.004	0.472	0.472	0.041	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472	0.025	0.016	0.025	0.025	0.020		
16 HQ246115	0.002	0.459	0.459	0.027	0.459	0.459	0.459	0.459	0.459	0.018	0.009	0.018	0.018	0.009	0.016	
17 EU255577	0.613	0.608	0.608	0.613	0.608	0.608	0.608	0.608	0.608	0.613	0.613	0.613	0.613	0.613	0.613	0.613

3.3.2. Virüs İzolatlarının Restriksiyon Endonükleaz Profilleri

Helicoverpa/Heliothis NPV izolatlarının hem yaklaşık genom büyüklüklerinin belirlenmesi hem de restriksiyon profilleri arasında farklılık olup olmadığının belirlenmesi için DNA'ları *KpnI* enzimi kullanılarak kesildi. Kesim reaksiyonu sonucunda, *KpnI* enziminin HearNPV-O1, O2 ve S2 izolatları için 9, TR ve S1 izolatları için ise 6 fragment oluşturduğu tespit edildi (Şekil 23).

Bantların büyüklükleri λ DNA/*HindIII* kesim markır ve 1 kb'lik markır esas alınarak hesaplandı. Hesaplamalar sonucunda viral genom büyüklüklerinin birbirine yakın (129.9-130.4) olduğu, ancak SNPV (HearNPV-TR ve S1) ve MNPV (HearNPV-O1, O2 ve S2) izolatlarının kesim bölgelerinin birbirlerinden farklı olduğu belirlendi (Tablo 15).



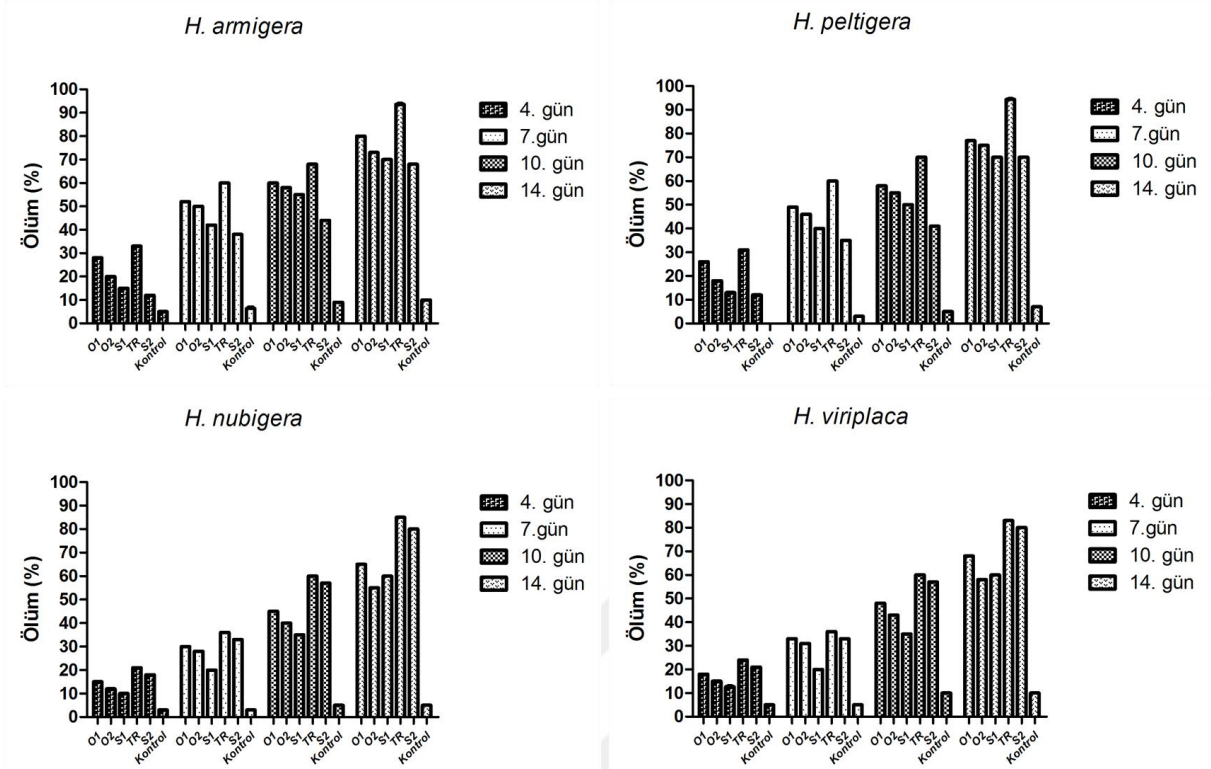
Şekil 23. *Helicoverpa/Heliothis* NPV izolatlarının *KpnI* restriksiyon endonükleaz profilleri. M1: 1 kb markır, M2: λ DNA/*HindIII*, M3: λ DNA/*NarI*.

Tablo 15. *Helicoverpa/Heliothis* NPV izolatlarının restriksiyon fragmentleri

Fragment	HearNPV- TR	HearNPV- S1	HearNPV- O1	HearNPV- O2	HearNPV- S2
A	54.0	54.0	31.0	31.0	31.0
B	36.0	34.5	24.0	24.0	24.0
C	24.0	25.0	20.0	20.0	20.0
D	9.5	9.5	15.0	15.0	15.0
E	6.0	6.0	12.0	12.0	12.0
F	0.9	0.9	10.0	10.0	10.0
G			8.0	8.0	8.0
H			6.0	6.0	6.0
I			4.0	4.0	4.0
Toplam	130.4 kb	129.9 kb	130.0 kb	130.0 kb	130.0 kb

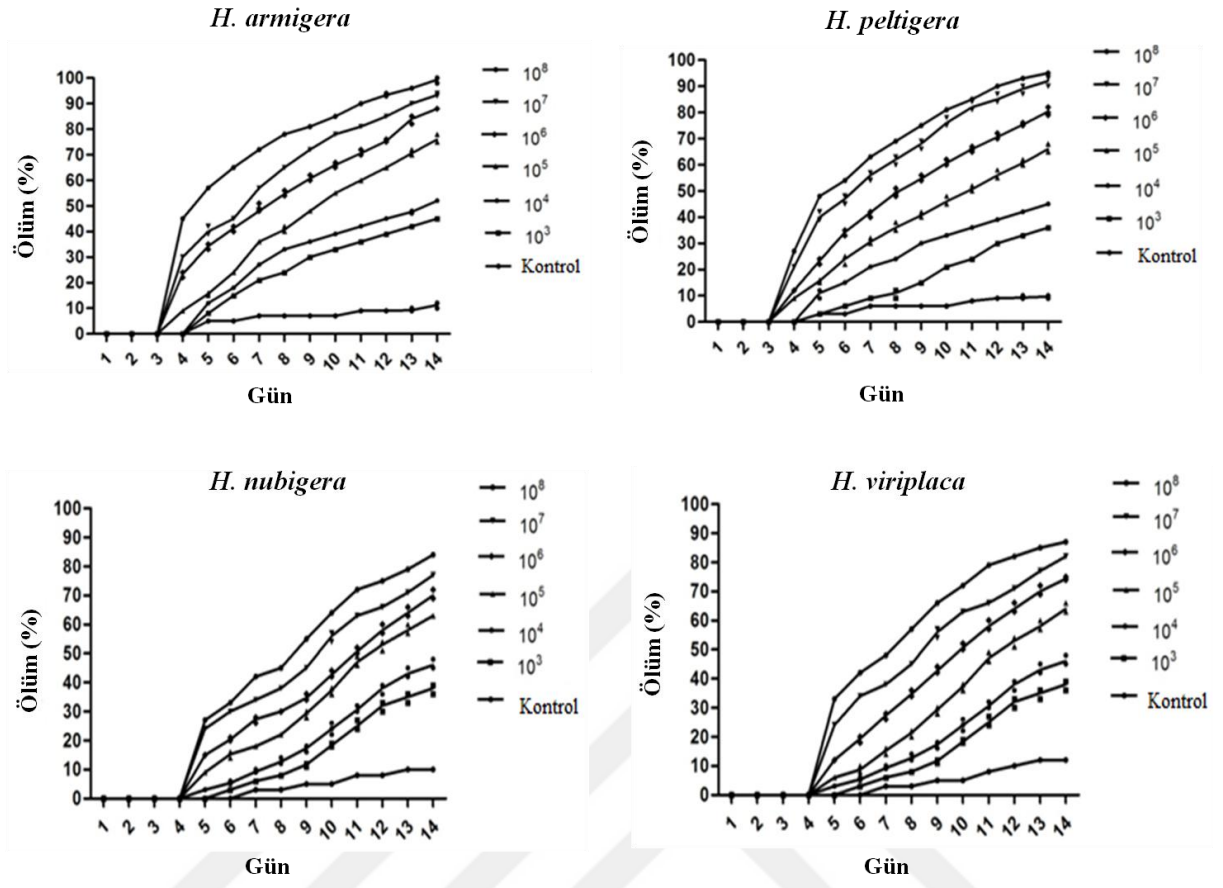
3.4. Virüs İzolatlarının Virülans Özellikleri

Elde edilen *Helicoverpa/Heliothis* NPV izolatlarının ülkemizdeki 2. dönem *Helicoverpa/Heliothis* türleri üzerindeki virülans etkisinin belirlenmesi ve en etkili izolatın seçilmesi için ilk önce tarama testleri yapıldı. On dört günlük enfeksiyon sonunda O1, O2, S1, TR ve S2 izolatlarının *Helicoverpa/Heliothis* türleri üzerindeki virülans etkileri sırasıyla şu şekildedir: %78, %72, %70, %94, %68 (*H. armigera*), %73, %72, %70, %92, %94 (*H. peltigera*), %63, %58, %60, %83, %80 (*H. nubigera*) ve %64, %57, %60, %80, %78 (*H. virescens*) (Şekil 24) (Eroglu vd., 2019). Elde edilen sonuçlara göre ülkemizde bulunan dört *Helicoverpa/Heliotis* türü üzerinde en etkili olan viral izolatının HearNPV-TR olduğu belirlendi ve bundan sonraki doz denemesi, genom analizi ve formülasyon çalışmalarına bu izolat ile devam edildi.



Şekil 24. *Helicoverpa/Heliothis* NPV izolatlarının yeşilkurt larvaları üzerindeki tarama testleri

HearNPV-TR izolatının 6 farklı konsantrasyonu (1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 ve 1×10^8 PIB/ml) hazırlanarak 2. dönem *Helicoverpa/Heliothis* larvaları üzerinde test edildi. Tüm türlerde, virüs konsantrasyonu arttıkça ölüm oranlarının da paralel şekilde arttığı gözlemlendi (Şekil 25). On dört gün sonra, canlı kalan larvaların pupaya girdiği ve ergin hale geldiği gözlemlendikten sonra deney sonlandırıldı. En yüksek virülans 1×10^8 PIB/ml dozunda sırasıyla %98 (*H. armigera*), %93 (*H. peltigera*), %88 (*H. nubigera*) ve %87 (*H. virescens*) olarak belirlendi. LC_{50} değerleri ise sırasıyla 1.5×10^3 (*H. armigera*), 4.1×10^3 (*H. peltigera*), 3.9×10^4 (*H. nubigera*) ve 5.2×10^4 (*H. virescens*) olarak hesaplandı (Tablo 16).



Şekil 25. HearNPV-TR izolatının yeşilkurt larvaları üzerindeki doz denemeleri

Tablo 16. HearNPV-TR izolatının yeşilkurt larvaları üzerindeki doz denemeleri

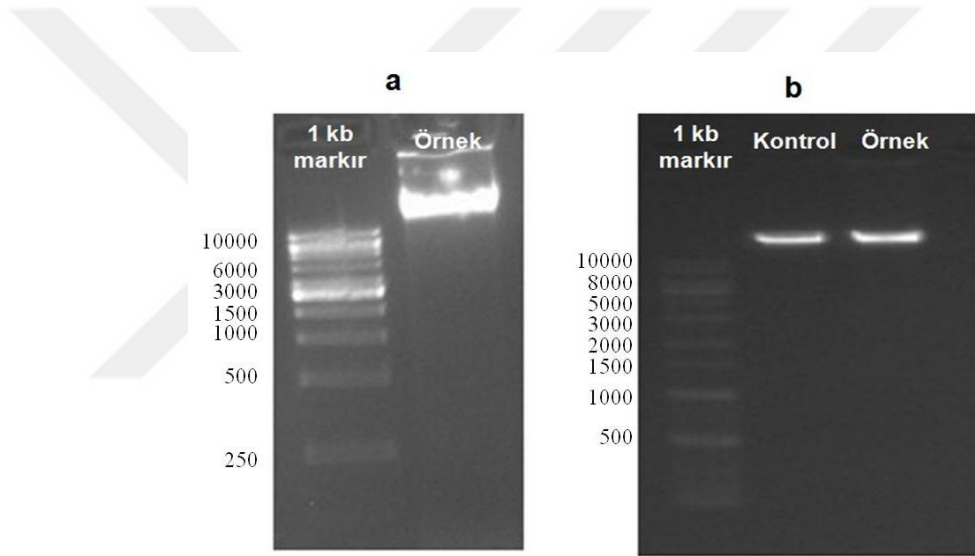
Tür	Mortalite	LC ₅₀ (FL, %95)	Eğim ± SE	χ ²	df
<i>H. armigera</i>	%98	1.5×10^3	0.40 ± 0.06	1.6	2
<i>H. peltigera</i>	%93	4.1×10^3	0.45 ± 0.06	1.8	2
<i>H. nubigera</i>	%88	3.9×10^4	0.50 ± 0.08	2.0	2
<i>H. viriplaca</i>	%87	5.2×10^4	0.55 ± 0.08	2.2	2

FL: Güven aralığı, SE: Standart hata, df: Serbestlik derecesi, χ²: Ki-kare. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma metodu kullanıldı.

3.5. Genom Analizi

3.5.1. DNA ekstraksiyonu ve Konsantrasyon Tayini

Viral genomik DNA ekstraksiyonu sonucunda elde edilen DNA'nın yoğunluğu nanodrop cihazında 82 ng/ μ l olarak, saflık anlamında 260/280 oranı ise 1.81 olarak belirlendi. Ayrıca, %0.7'lik agaroz jelde 30 dakika 80 voltta yürütülerek jeldeki görüntüsü elde edildi (Şekil 26a). DNA, ilgili firmaya gönderildi ve firma tarafından %1'lik agaroz jelde 30 dakika, 100 voltta elektroforez edilerek saflığının analize uygun olduğu teyit edildi (Şekil 26b).

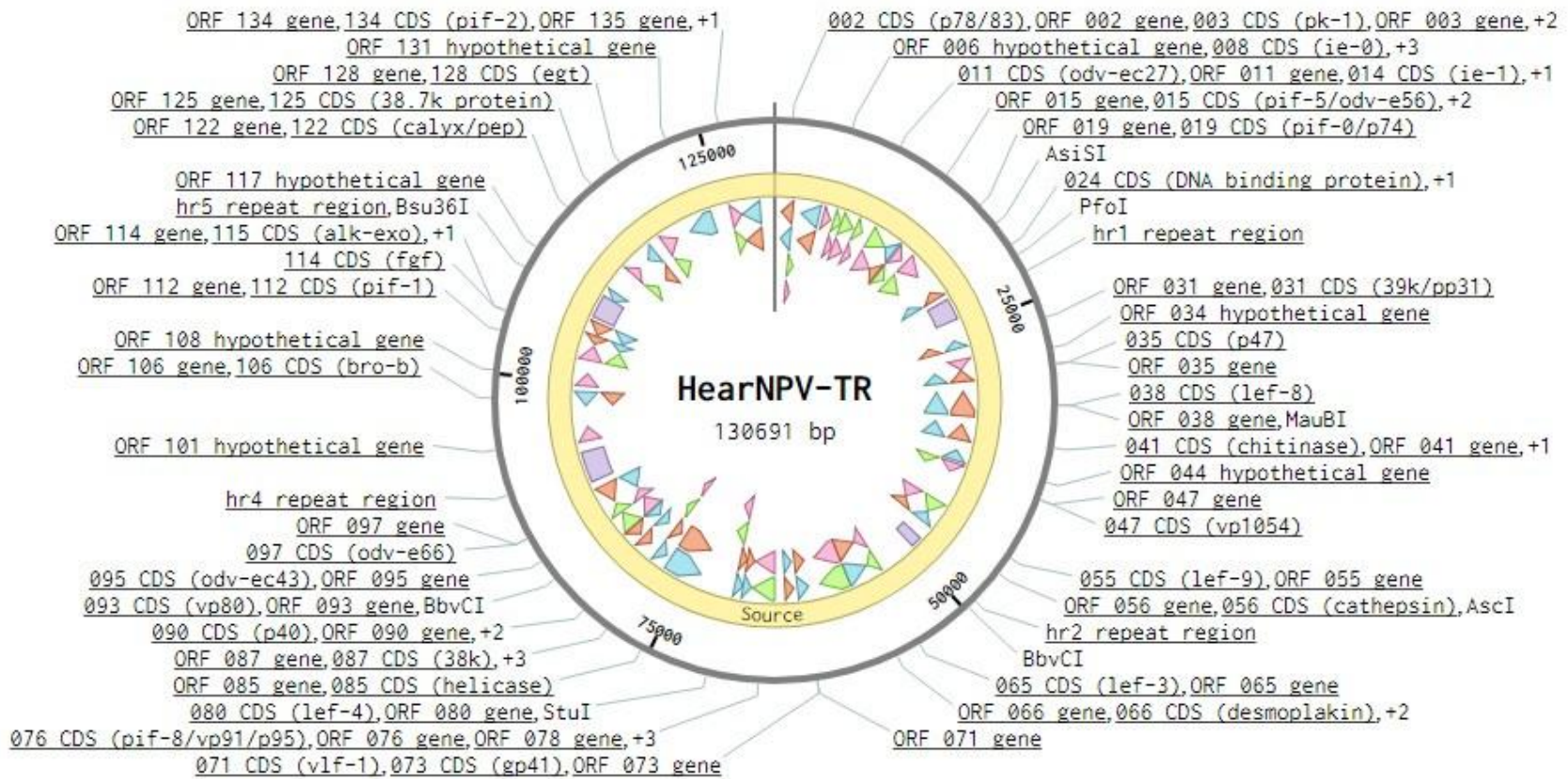


Şekil 26. Genomik DNA dizileme için hazırlanan DNA'nın agaroz jel analizi. a. Bizim tarafımızdan, b. Firma tarafından.

3.5.2. Viral Genomun Biyoinformatik Analizi

3.5.2.1. Açık Okuma Zincirleri (ORF)

DNA dizi analizi sonucunda HearNPV-TR'nin toplam genomu 130,691 kb (Erişim numarası: MK507817), GC içeriği ise %38.9 olarak belirlendi. Genomdaki 50 aminoasitten fazla büyüklüğe sahip olan 137 ORF'nin yeri, halkasal genom haritasında gösterildi (Şekil 27). Genomda bulunan 137 ORF'nin 69 tanesinin saat yönünde, 68 tanesinin de bunların tersi yönde olduğu belirlendi (Eroglu vd., 2020).



Şekil 27. HearNPV-TR'nin halkasal genom haritası

3.5.2.2. Genlerin Adlandırılması

HearNPV-TR'nin tüm ORF'leri Alfabakülovirüs sınıfının tip türü olan AcMNPV, Betabakülovirüslerin tip türü olan CpGV ve *H. armigera* NPV'lerden HasNPV, HaSNPV-C1, HaSNPV-G4 ve HaSNPV-AU izolatlarının genomlarındaki ORF'ler ile karşılaştırıldı (Tablo 17). HearNPV-TR'nin 98 ORF'sinin fonksiyonu, referans olarak kıyaslanan genomlar ile homoloji gösterdi. Kalan 39 ORF'nin ise fonksiyonu bilinmediğinden dolayı varsayılan olarak adlandırıldı. HearNPV-TR genomunda, tüm bakülovirüslerde olmak zorunda olan 38 kor genin bulunduğu da tespit edildi. HearNPV-TR'nin genom büyüklüğü diğer *Helicoverpa* NPV genomları ile kıyaslandığında HasNPV genomundan 890 bp daha büyük olduğu, HaSNPV-C1, HaSNPV-G4 ve HaSNPV-AU genomlarından ise sırasıyla 68 bp, 714 bp ve 301 bp daha küçük olduğu görüldü. Toplam genom benzerliklerine bakıldığında ise, HearNPV-TR ile HasNPV ve HaSNPV-C1 genomları ile %98, HaSNPV-G4 ve HaSNPV-AU genomları ile de %99 benzerlik gösterdiği görüldü.

Tablo 17. HearNPV-TR genomunun ORF pozisyonları

ORF numaraları (% aa benzerliği)										
ORF	İsim	Pozisyon	Boyut (nt)	Boyut (aa)	AcMNPV L22858	HasNPV MG569706	HaSNPV-C1 AF303045	HaSNPV-G4 AF271059	HaSNPV-AU JN584482	CpGV NC_002816
1	<i>polh</i>	1→741	741	247	8 (86)	1 (99)	1 (99)	1 (99)	1 (99)	1 (57)
2	<i>p78/83</i>	738←1988	1251	417	9 (27)	2 (95)	2 (94)	2 (96)	2 (96)	51 (34)
3	<i>pk-1</i>	1937→2806	870	290	10 (39)	3 (100)	3 (99)	3 (99)	3 (100)	3 (37)
4	<i>hoar</i>	2929←4908	1980	660		4 (92)	4 (94)	4 (91)	4 (92)	
5	<i>varsayılan</i>	5042→5218	177	59				5 (95)	5 (95)	
6	<i>varsayılan</i>	5364→6245	882	294		5 (95)	6 (95)	6 (95)	6 (94)	
7	<i>varsayılan</i>	6455←6616	162	54			7 (90)	7 (100)	7 (96)	
8	<i>ie-0</i>	6604→7461	858	286	141 (33)	6 (98)	8 (98)	8 (98)	8 (98)	
9	<i>p49</i>	7478→8884	1407	469	142 (50)	7 (99)	9 (99)	9 (99)	9 (99)	15 (34)
10	<i>odv-e18</i>	8895→9140	246	82	143 (75)	8 (100)	10 (100)	10 (99)	10 (100)	14 (46)
11	<i>odv-ec27</i>	9155→10009	855	285	144 (50)	9 (99)	11 (99)	11 (100)	11 (99)	97 (29)
12	<i>ac145</i>	10002→10331	330	110	145 (48)	10 (100)	12 (100)	12 (100)	12 (100)	9 (42)
13	<i>ac146</i>	10358←10969	612	204	146 (29)	11 (97)	13 (97)	13 (98)	13 (98)	
14	<i>ie-1</i>	10972→12957	1986	662	147 (34)	12 (95)	14 (96)	14 (97)	14 (97)	7 (22)
15	<i>pif-5/odv-e56</i>	13011←14075	1065	355	148 (52)	13 (97)	15 (97)	15 (97)	15 (97)	18 (44)
16	<i>me53</i>	14236→15315	1080	360	139 (24)	14 (99)	16-17 (98)	16-17 (98)	16 (98)	
17	<i>varsayılan</i>	15318→15485	168	56		15 (95)	18 (95)	18 (95)	17 (95)	
18	<i>varsayılan</i>	15538←15819	282	94		16 (94)	19 (94)	19 (94)	18 (94)	
19	<i>pif-0/p74</i>	15825→17906	2082	694	138 (53)	17 (99)	20 (99)	20 (98)	19 (99)	60 (40)
20	<i>p10</i>	17959←18267	309	103			21 (98)	21 (98)	20 (98)	

Tablo 17'nin devamı

21	<i>P26</i>	18305←19108	804	268	136 (35)	19 (99)	22 (99)	22 (99)	21 (99)	
22	<i>varsayılan</i>	19220→19423	204	68				23 (99)	22 (99)	
23	<i>lef-6</i>	19500←20063	564	188	28 (32)	20 (99)	24 (99)	24 (99)	23 (99)	
24	<i>DNA bağlanma proteini</i>	20077←21048	972	324	25 (32)	21 (100)	25 (100)	25 (100)	24 (100)	
25	<i>ac26</i>	21192→21668	477	159	26 (37)	22 (99)	26 (99)	26 (99)	25 (99)	
	<i>hr1 tekrar bölgesi</i>	21669-23932	2264							
26	<i>varsayılan</i>	23838→23990	153	51						
27	<i>varsayılan</i>	23933←24700	768	256	34 (37)	23 (100)	27 (100)	27 (99)	26 (99)	
28	<i>ubikuitin</i>	24540→24791	252	84	35 (75)	24 (100)	28 (100)	28 (100)	27 (100)	54 (78)
29	<i>varsayılan</i>	24837→25361	525	175		25 (100)	29 (100)	29 (100)	28 (100)	
30	<i>lese-25 benzeri protein</i>	25381→25953	573	191		26 (99)	30 (99)	30 (99)	29 (98)	
31	<i>39k/pp31</i>	26017←26952	936	312	36 (34)	27 (99)	31 (99)	31 (99)	30 (99)	
32	<i>lef-11</i>	26918←27370	453	151		28 (98)	32 (98)	32 (98)	31 (98)	58 (38)
33	<i>ac38 benzeri protein</i>	27270←27986	717	239	38 (52)	29 (99)	33 (99)	33 (99)	32 (99)	69 (44)
34	<i>varsayılan</i>	28217→29293	1077	359		30 (98)	34 (98)	34 (98)	33 (97)	
35	<i>p47</i>	29367←30605	1239	413	40 (54)	31 (99)	35 (99)	35 (98)	34 (99)	68 (44)
36	<i>lef-12</i>	30678→31349	672	224	41 (31)	32 (97)	36 (97)	36 (97)	35 (97)	
37	<i>ac43</i>	31435→31677	243	81	43 (33)	33 (96)	37 (96)	37 (96)	36 (96)	
38	<i>lef-8</i>	31674←34379	2706	902	50 (62)	34 (99)	38 (99)	38 (99)	37 (99)	131(50)
39	<i>varsayılan</i>	34330→35010	681	227		35 (99)	39 (99)	39 (99)	38 (100)	
40	<i>varsayılan</i>	35007→35303	297	99		36 (90)	40 (90)	40 (90)	39 (94)	
41	<i>kitinaz</i>	35311←37038	1728	576	126 (66)	37 (99)	41 (98)	41 (98)	40 (99)	10 (59)

Tablo 17'nin devamı

42	<i>ac52</i>	37115←37660	546	182	52 (27)	38 (99)	42 (99)	42 (99)	41 (99)	
43	<i>ac53</i>	37758→38186	429	143	53 (43)	39 (99)	43 (99)	43 (100)	42 (100)	
44	<i>varsayılan</i>	38193←39329	1137	379		40 (99)	44 (100)	44 (100)	43 (99)	
45	<i>varsayılan</i>	39337←39576	240	80		41 (100)	45 (100)	45 (100)	44 (100)	
46	<i>lef-10</i>	39494→39739	246	82	53a (38)	42 (99)	46 (99)	46 (100)	45 (100)	
47	<i>vp1054</i>	39612→40664	1053	351	54 (41)	43 (99)	47 (99)	47 (99)	46 (98)	138 (29)
48	<i>varsayılan</i>	40784→40990	207	69		44 (100)	48 (100)	48 (100)	47 (100)	
49	<i>ac56</i>	40991→41185	195	65	56 (37)	45 (100)	49 (100)	49 (100)	48 (98)	
50	<i>ac57</i>	41471→41962	492	164	57 (42)	46 (100)	50 (99)	50 (99)	49 (99)	
51	<i>ac59</i>	42043←42525	483	161	59 (46)	47 (100)	51 (99)	51 (97)	50 (97)	
52	<i>chaB</i>	42537←42806	270	90	60 (42)	48 (100)	52 (99)	52 (99)	51 (99)	26 (24)
53	<i>fp</i>	43018←43728	711	237	61 (63)	49 (100)	53 (100)	53 (100)	52 (98)	118 (34)
54	<i>varsayılan</i>	43801→44028	228	76			54 (100)	54 (100)	53 (98)	
55	<i>lef-9</i>	44138→45697	1560	520	62 (64)	50 (100)	55 (100)	55 (99)	54 (99)	117 (55)
56	<i>katepsin</i>	45781←46884	1104	368	127 (46)	51 (100)	56 (99)	56 (99)	55 (100)	11 (41)
57	<i>varsayılan</i>	46925←47530	606	202		52 (99)	57 (99)	57 (99)	56 (99)	
58	<i>gp37</i>	47583←48422	840	280	64 (60)	53 (99)	58 (99)	58 (99)	57 (99)	13 (42)
	hr2 tekrar bölgesi	48423-49571	1149							
59	<i>bro-a</i>	49572→49997	426	142		54 (86)	60 (86)	60 (86)	58 (86)	
	hr3 tekrar bölgesi	50087-50800	714							
60	<i>varsayılan</i>	51605←51811	207	69						
61	<i>he65</i>	51860→52588	729	243	105 (34)	55 (99)	61 (100)	61 (100)	59 (100)	
62	<i>iap-2</i>	52664←53416	753	251	71 (31)	56 (99)	62 (99)	62 (99)	60 (99)	94 (30)
63	<i>varsayılan metil transferaz</i>	53464←54309	846	282	69 (42)	57 (99)	63 (99)	63 (99)	61 (99)	

Tablo 17'nin devamı

64	<i>pif-6</i>	54257←54658	402	134	68 (47)	58 (100)	64 (100)	64 (100)	62 (99)	114 (34)
65	<i>lef-3</i>	54669→55817	1149	383	67 (25)	59 (99)	65 (99)	65 (99)	63 (99)	
66	<i>desmoplakin</i>	55924←58281	2358	786	66 (29)	60 (99)	66 (99)	66 (99)	64 (99)	
67	<i>dnapol</i>	58312→61374	3063	1021	65 (46)	61 (99)	67 (99)	67 (99)	65 (99)	111 (37)
68	<i>ac74</i>	61451←61924	474	158	74 (26)	62 (100)	68 (100)	68 (100)	66 (100)	
69	<i>varsayılan</i>	61975←62367	393			63 (100)	69 (100)	69 (100)	67 (100)	
70	<i>ac76</i>	62364←62621	258	86	76 (40)	64 (100)	70 (100)	70 (100)	68 (100)	107 (38)
71	<i>vlf-1</i>	62662←63900	1239	413	77 (74)	65 (100)	71 (99)	71 (100)	69 (99)	106 (33)
72	<i>ac78</i>	63913←64257	345	115	78 (42)	66 (100)	72 (100)	72 (100)	70 (100)	
73	<i>gp41</i>	64314←65282	969	323	80 (59)	67 (100)	73 (100)	73 (100)	71 (100)	104 (35)
74	<i>ac81</i>	65212←65976	765	255	81 (52)	68 (100)	74 (100)	74 (99)	72 (99)	103 (49)
75	<i>telokin benzeri protein</i>	65810←66487	678	226	82 (34)	69 (100)	75 (99)	75 (99)	73 (99)	
76	<i>pif/vp91/p95</i>	66417→68867	2451	817	83 (40)	70 (99)	76 (99)	76 (99)	74 (99)	101 (31)
77	<i>varsayılan</i>	68870←69046	177	59						
78	<i>cg30</i>	69012←69926	915	305	88 (27)	71 (99)	77 (99)	77 (99)	75 (99)	
79	<i>vp39</i>	69952←70833	882	294	89 (43)	72 (99)	78 (100)	78 (100)	76 (100)	96 (32)
80	<i>lef-4</i>	70790→72217	1428	476	90 (44)	73 (99)	79 (99)	79 (100)	77 (99)	95 (32)
81	<i>p33</i>	72270←73034	765	255	92 (53)	74 (100)	80 (100)	80 (100)	78 (100)	93 (40)
82	<i>p18</i>	72994→73524	531	177	93 (55)	75 (100)	81 (100)	81 (100)	79 (100)	92 (35)
83	<i>odv-e25</i>	73570→74262	693	231	94 (42)	76 (100)	82 (100)	82 (100)	80 (100)	91 (52)
84	<i>varsayılan</i>	74294←74776	483	161		77 (96)	83 (96)	83 (96)	81 (95)	
85	<i>helikaz</i>	74795←78556	3762	1254	95 (42)	78 (99)	84 (99)	84 (99)	82 (99)	90 (35)
86	<i>pif-4</i>	78513→79034	522	174	96 (48)	79 (100)	85 (100)	85 (99)	83 (99)	89 (41)
87	<i>38k</i>	79093←80178	1086	362	98 (44)	80 (99)	86 (99)	86 (99)	84 (99)	88 (39)
88	<i>lef-5</i>	79954→80901	948	316	99 (43)	81 (100)	87 (100)	87 (100)	85 (100)	87 (38)
89	<i>p6.9</i>	80895←81203	309	103		82 (88)	88 (94)	88 (94)	86 (94)	

Tablo 17'nin devamı

90	<i>p40</i>	81268←82377	1110	370	101 (40)	83 (99)	89 (99)	89 (99)	87 (99)	85 (26)
91	<i>varsayılan</i>	82423←82791	369	123		84 (99)	90 (99)	90 (99)	88 (99)	
92	<i>p45/p48</i>	82791←83924	1134	378	103 (50)	85 (99)	91 (99)	91 (99)	89 (99)	83 (37)
93	<i>vp80</i>	84020→85837	1818	606		86 (99)	92 (99)	92 (99)	90 (99)	
94	<i>pif-7</i>	85834→86010	177	59	110 (32)		93 (98)	93 (98)	91 (98)	
95	<i>odv-ec43</i>	86025→87110	1086	362	109 (52)	87 (99)	94 (99)	94 (99)	92 (99)	55 (33)
96	<i>pif-9/ac108</i>	87156→87440	285	95	108 (47)	88 (100)	95 (100)	95 (100)	93 (100)	
97	<i>odv-e66</i>	87507←89525	2019	673	46 (43)	89 (99)	96 (99)	96 (99)	94 (99)	37 (44)
98	<i>p13</i>	89546←90376	831	277		90 (99)	97 (99)	97 (99)	95 (99)	47 (51)
	hr4 tekrar bölgesi	89300-92545	3246							
99	<i>pif-3</i>	93623→94222	600	200	115 (43)	91 (100)	98 (100)	98 (100)	96 (100)	35 (35)
100	<i>varsayılan</i>	94226→94582	357	119		92 (95)	99 (94)	99 (94)	97 (94)	
101	<i>varsayılan</i>	94678→96210	1533	511		93 (99)	100 (99)	100 (99)	98 (99)	
102	<i>ac106</i>	96289→97050	762	254	106 (47)	94 (99)	101 (99)	101 (99)	99 (98)	52 (39)
103	<i>varsayılan</i>	97067→97399	333	111		95 (97)	102 (97)	102 (97)	100 (97)	
104	<i>iap-3</i>	97456←98262	807	269	27 (34)	96 (97)	103 (97)	103 (97)	101 (97)	17 (38)
105	<i>varsayılan</i>	98259←98552	294	98			104 (100)	104 (100)	102 (100)	
106	<i>bro-b</i>	98518←100023	1506	502	2 (36)	97 (99)	105 (99)	105 (99)	103 (99)	
107	<i>sod</i>	100173→100652	480	160	31 (76)	98 (99)	106 (99)	106 (98)	104 (99)	59 (63)
108	<i>varsayılan</i>	100659→102032	1374	458		99 (97)	107 (97)	107 (97)	105 (97)	
109	<i>varsayılan</i>	102067←102645	579	193		100 (98)	108 (98)	108 (99)	106 (99)	
110	<i>varsayılan</i>	102766→103161	396	132		101 (98)	109 (98)	109 (98)	107 (98)	
111	<i>ac117</i>	103139→103447	309	103	117 (33)	102 (100)	110 (100)	110 (100)	108 (100)	
112	<i>pif-1</i>	103515→105101	1587	529	119 (47)	103 (99)	111 (99)	111 (99)	109 (99)	75 (33)
113	<i>varsayılan</i>	105098→105334	237	79			112 (97)	112 (97)	110 (97)	
114	<i>fgf</i>	105357←106262	906	302	32 (28)	104 (97)	113 (97)	113 (98)	111 (98)	123 (23)
115	<i>alk-ekzo</i>	106395←107675	1281	427	133 (41)	105 (98)	114 (97)	114 (97)	112 (97)	125 (36)

Tablo 17'nin devamı

116	<i>varsayılan</i>	107695←108084	390	130		106 (98)	115 (98)	115 (97)	113 (97)	
	hr 5 tekrar bölgesi	107012-109435	2424							
117	<i>varsayılan</i>	110513←111439	927	309		107 (98)	115a (97)	115a (98)	114 (98)	
118	<i>ac111</i>	111638→111853	216	72	111 (36)	108 (97)	116 (99)	116 (99)	115 (99)	
119	<i>lef-2</i>	111962←112675	714	238	6 (41)	109 (96)	117 (96)	117 (96)	116 (99)	41 (27)
120	<i>p24</i>	113036→113779	744	248	129 (32)	110 (99)	118 (99)	118 (99)	117 (99)	71 (36)
121	<i>gp16</i>	113837→114127	291	97		111 (98)	119 (98)	119 (98)	118 (98)	
122	<i>kaliks/pep</i>	114179→115201	1023	341	131 (30)	112 (100)	120 (99)	120 (99)	119 (100)	
123	<i>varsayılan</i>	115253→115744	492	164		113 (99)	121 (99)	121 (99)	120 (97)	
124	<i>odv-c21</i>	115874→116464	591	197		114 (97)	122 (96)	122 (97)	121 (97)	
125	<i>38.7k protein</i>	116508←117671	1164	388	13 (30)	115 (95)	123 (95)	123 (95)	122 (94)	
126	<i>lef-1</i>	117673←118410	738	246	14 (38)	116 (98)	124 (98)	124 (98)	123 (97)	74 (40)
127	<i>varsayılan</i>	118385←118822	438	146		117 (92)	125 (92)	125 (89)	124 (92)	
128	<i>egt</i>	118967→120514	1548	516	15 (44)	118 (98)	126 (98)	126 (98)	125 (98)	141 (42)
129	<i>varsayılan</i>	120672→121292	621	207		119 (99)	127 (99)	127 (99)	126 (99)	
130	<i>varsayılan</i>	121243→122043	801	267		120 (99)	128 (98)	128 (98)	127 (98)	
131	<i>varsayılan</i>	122113←124947	2835	945		121 (97)	129 (97)	129 (97)	128 (97)	
132	<i>pkip-1</i>	125285→125794	510	170		122 (99)	130 (99)	130 (96)	129 (99)	
133	<i>arif-1</i>	125912←126709	798	266	21 (26)	123 (98)	131 (98)	131 (97)	130 (98)	
134	<i>pif-2</i>	126981→128132	1152	384	22 (61)	124 (98)	132 (99)	132 (99)	131 (98)	48 (48)
135	<i>f-protein</i>	128173←130206	2034	678		125 (99)	133 (99)	133 (99)	132 (99)	31 (27)
136	<i>varsayılan</i>	130348←130893	546	182		126 (100)	134 (100)	134 (99)	133 (100)	
137	<i>varsayılan</i>	131075→131662	588	196		127 (100)	135 (98)	135 (97)	134 (98)	

3.5.2.3. Homolog Tekrar Bölgeleri

Gen olarak kabul edilmeyen homolog tekrar bölgeleri (hrs), bakülovirüslerde yaygın olarak bulunmaktadır. HearNPV-TR genomunda uzunlukları sırasıyla 2264 bp, 1149 bp, 714 bp, 3246 bp ve 2424 bp olan 5 adet hrs bölgesi olduğu belirlendi. HearNPV-TR genomundaki hr1, hr2 ve hr4 bölgelerinin HasNPV, C1, G4 ve AU genomlarındaki hrs bölgeleri ile %97-99 oranında yüksek benzerlik gösterdiği ancak, hr3 (%87-89) ve hr5 bölgelerinin (%77-89) düşük benzerlik gösterdiği belirlendi.

3.5.2.4. Fonksiyonel Genlerin Tespiti

HearNPV-TR genomunda bulunan genler fonksiyonlarına göre replikasyon, transkripsiyon, yapısal, yardımcı, beslenmeden sorumlu, bilinmeyen ve diğerleri olmak üzere 7 gruba ayrıldı (Tablo 18).

HearNPV-TR'nin genomunda replikasyondan sorumlu 9 gen olduğu belirlendi. Bu genlerden 4 tanesi (*dnapol* ORF67, *helikaz* ORF85, *lef-2* ORF119 ve *lef-1* ORF126) kor genidir. Geri kalan 5 gen ise (*ie-1* ORF14, *me53* ORF16, *dbp* ORF24, *lef-11* ORF32 ve *lef-3* ORF65) bakülovirüslerde korunmuş olan genlerdendir.

Bakülovirüslerde replikasyondan sorumlu olduğu bilinen *helikaz-2*, *dna-ligaz*, *dUTPaz*, *RNAaz reduktaz-1*, *RNAaz reduktaz-2*, *pcna*, *lef-7*, *ie-2* ve *pe38* (Lauzon vd., 2004) genleri HearNPV-TR'nin genomunda bulunmamaktadır.

Bakülovirüslerde transkripsiyondan sorumlu olduğu bilinen tüm genler HearNPV-TR'nin genomunda mevcuttur. Bu genlerden 6 tanesi (*p47* ORF35, *lef-8* ORF38, *lef-9* ORF55, *vlf-1* ORF71, *lef-4* ORF80 ve *lef-5* ORF88) kor genidir.

Virüsün paketlenmesi ve salınması gibi görevlerden sorumlu olan yapısal genlerden 19 tanesi genomda bulunmaktadır. Diğer bakülovirüslerde olan *vef-1*, *vef-2*, *vef-3*, *gp50* ve *gp64* adlı yapısal genler ise HearNPV-TR'nin genomunda bulunmamaktadır.

Hücre döngüsü ve konak proteinleri ile etkileşimden sorumlu olan 8 yardımcı gen genomda yer almaktadır ve bunlardan sadece *alk-ekzo* geni kor genidir. Genomda bulunmayan yardımcı genler ise *ptp-1*, *ptp-2*, *ctl-1* ve *ctl-2* genleridir.

Ağızdan enfeksiyondan sorumlu olan pif genlerinin hepsi (*pif-0* – *pif-9*) kor genidir ve genomda bulunmaktadır.

Bakülovirüslerde programlanmış hücre ölümünü engelleyen toplam 5 gen vardır (Roulston vd., 1999). Aynı zamanda bu genler, izolatin konak spektrumu için de önemlidir (Wu vd., 2016). Bu genlerden yalnızca 2 tanesi (*iap-2* ORF62 ve *iap-3* ORF104) genomda mevcuttur. Ayrıca, genomda bulunan kor genlerden 11 tanesinin görevi bilinmemektedir.

Bakülovirüs tekrar genleri (*bro*), bazı omurgasız DNA virüslerinde, özellikle bakülovirüslerde yaygın olarak bulunur (Bideshi vd., 2003). Konak DNA replikasyonu ve transkripsiyonu üzerinde etkili olan DNA bağlanma proteinlerini içerir (Zemskov vd., 2000). HearNPV-TR genomunda, büyüklükleri 142 aa (*bro-a*) ve 502 aa (*bro-b*) olan 2 adet *bro* geni vardır.

Tablo 18. HearNPV-TR genomundaki fonksiyonel genlerin sınıflandırılması

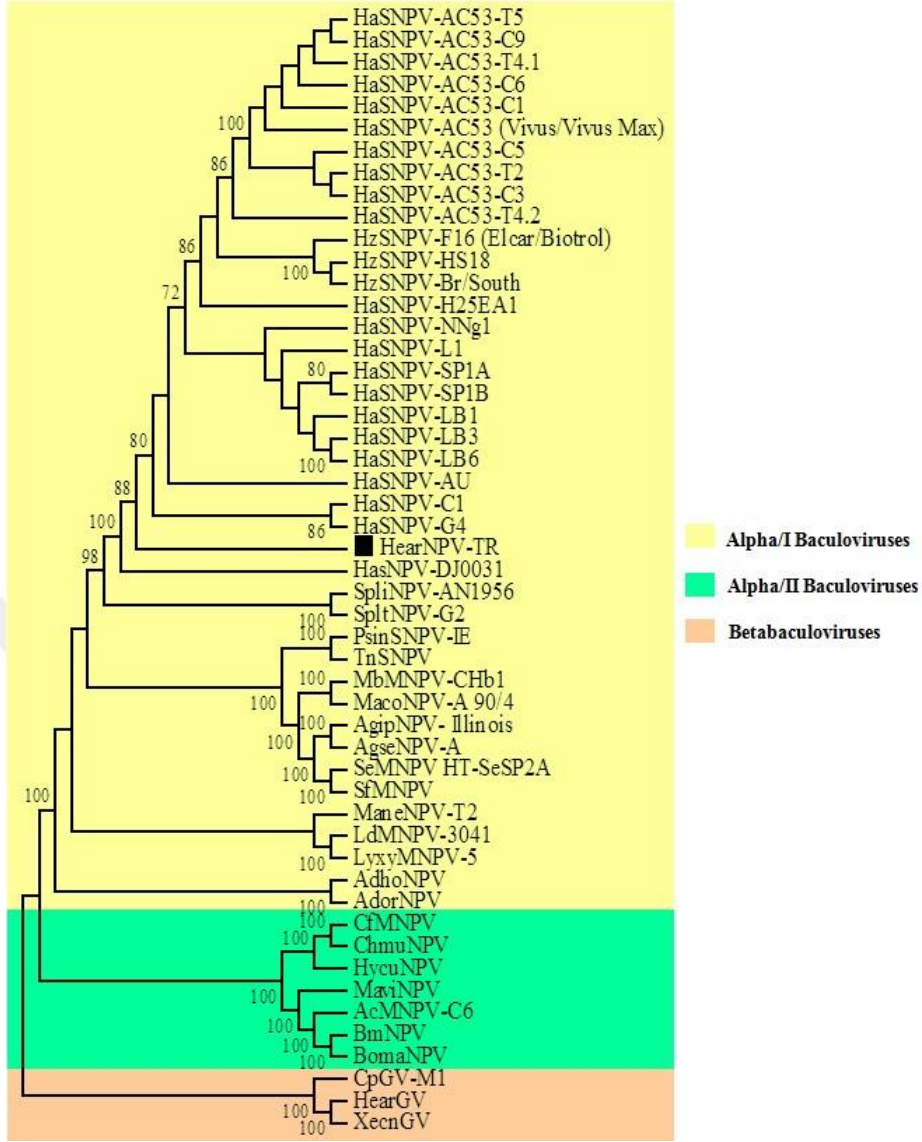
Gen fonksiyonu	HearNPV-TR genomunda mevcut olan genler	HearNPV-TR genomunda mevcut olmayan genler
Replikasyon	<i>ie-1</i> (ORF14), <i>me53</i> (ORF16), <i>dbp</i> (ORF24), <i>lef-11</i> (ORF32), <i>lef-3</i> (ORF65), <i>dnapol</i> (ORF67), <i>helikaz</i> (ORF85), <i>lef-2</i> (ORF119), <i>lef-1</i> (ORF126)	<i>helikaz-2</i> , <i>dna-ligaz</i> , <i>dUTPaz</i> , <i>RNaz reduktaz-1</i> , <i>RNaz reduktaz-2</i> , <i>pcna</i> , <i>lef-7</i> , <i>ie-2</i> , <i>pe38</i>
Transkripsiyon	<i>ie-0</i> (ORF8), <i>lef-6</i> (ORF23), <i>39k/pp31</i> (ORF31), <i>p47</i> (ORF35), <i>lef-12</i> (ORF36), <i>lef-8</i> (ORF38), <i>lef-10</i> (ORF46), <i>lef-9</i> (ORF55), <i>he65</i> (ORF61), <i>varsayılan met transf.</i> (ORF63), <i>vlf-1</i> (ORF71), <i>lef-4</i> (ORF80), <i>lef-5</i> (ORF88), <i>kip-1</i> (ORF132)	
Yapısal proteinler	<i>polh</i> (ORF1), <i>p78/83</i> (ORF2), <i>pk-1</i> (ORF3), <i>odv-e18</i> (ORF10), <i>odv-ec27</i> (ORF11), <i>p10</i> (ORF20), <i>vp1054</i> (ORF47), <i>fp</i> (ORF53), <i>gp37</i> (ORF58), <i>gp41</i> (ORF73), <i>vp39</i> (ORF79), <i>odv-e25</i> (ORF83), <i>p6.9</i> (ORF89), <i>odv-e66</i> (ORF97), <i>p24</i> (ORF120), <i>gp16</i> (ORF121), <i>kaliks</i> (ORF122), <i>odv-c21</i> (ORF124), <i>f protein</i> (ORF135)	<i>vef-1</i> , <i>vef-2</i> , <i>vef-3</i> , <i>gp50</i> , <i>gp64</i>
Yardımcı genler	<i>ubikuitin</i> (ORF28), <i>kitinaz</i> (ORF41), <i>katepsin</i> (ORF56), <i>sod</i> (ORF107), <i>fgf</i> (ORF114), <i>alk-ekzo</i> (ORF115), <i>egt</i> (ORF128), <i>arif-1</i> (ORF133)	<i>ptp-1</i> , <i>ptp-2</i> , <i>ctl-1</i> , <i>ctl-2</i>

Tablo 18'in devamı

Ağızdan enfeksiyondan sorumlu genler	<i>pif-5/odv-e56</i> (ORF15), <i>pif-0/p74</i> (ORF19), <i>pif-6</i> (ORF64), <i>pif-8/vp91/p95</i> (ORF76), <i>pif-4</i> (ORF86), <i>pif-7</i> (ORF94), <i>pif-9/ac108</i> (ORF96), <i>pif-3</i> (ORF99), <i>pif-1</i> (ORF112), <i>pif-2</i> (ORF134)	
Apoptozis inhibitör genleri	<i>iap-2</i> (ORF62), <i>iap-3</i> (ORF104)	<i>iap-1</i> , <i>iap-4</i> , <i>p35/ac135</i>
Görevi bilinmeyen genler	<i>p49</i> (ORF9), <i>ac145</i> (ORF12), <i>ac146</i> (ORF13), <i>ac26</i> (ORF25), <i>lese25</i> (ORF30), <i>ac38</i> (ORF33), <i>ac43</i> (ORF37), <i>ac52</i> (ORF42), <i>ac53</i> (ORF43), <i>ac56</i> (ORF49), <i>ac57</i> (ORF50), <i>ac59</i> (ORF51), <i>chaB</i> (ORF52), <i>desmoplakin</i> (ORF66), <i>ac74</i> (ORF68), <i>ac76</i> (ORF70), <i>ac78</i> (ORF72), <i>ac81</i> (ORF74), <i>telokin</i> (ORF75), <i>p33</i> (ORF81), <i>p18</i> (ORF82), <i>38k</i> (ORF87), <i>p40</i> (ORF90), <i>p48/p45</i> (ORF92), <i>odv-ec43</i> (ORF95), <i>p13</i> (ORF98), <i>ac106</i> (ORF102), <i>ac117</i> (ORF111), <i>ac111</i> (ORF118), <i>38.7k protein</i> (ORF125)	<i>ac4</i> , <i>ac5</i> , <i>ac7</i> , <i>ac11</i> , <i>ac12</i> , <i>ac13</i> , <i>ac17</i> , <i>ac18</i> , <i>ac19</i> , <i>ac29</i> , <i>ac30</i> , <i>ac33</i> , <i>ac34</i> , <i>ac39</i> , <i>ac44</i> , <i>ac45</i> , <i>ac55</i> , <i>ac58</i> , <i>ac63</i> , <i>ac70</i> , <i>ac72</i> , <i>ac73</i> , <i>ac75</i> , <i>ac84</i> , <i>ac85</i> , <i>ac87</i> , <i>ac91</i> , <i>ac97</i> , <i>ac107</i> , <i>ac110</i> , <i>ac112</i> , <i>ac113</i> , <i>ac114</i> , <i>ac116</i> , <i>ac118</i> , <i>ac120</i> , <i>ac121</i> , <i>ac122</i> , <i>ac124</i> , <i>ac132</i> , <i>ac140</i> , <i>ac149</i> , <i>ac150</i> , <i>ac152</i> , <i>ac154</i>
Diğer genler	varsayılan (ORF5, ORF6, ORF7, ORF17, ORF18, ORF22, ORF26, ORF27, ORF29, ORF34, ORF39, ORF40, ORF44, ORF45, ORF48, ORF54, ORF57, ORF60, ORF69, ORF77, ORF84, ORF91, ORF100, ORF101, ORF103, ORF105, ORF108, ORF109, ORF110, ORF113, ORF116, ORF117, ORF123, ORF127, ORF129, ORF130, ORF131, ORF136, ORF137), <i>hoar</i> (ORF4), <i>p26</i> (ORF21), <i>vp80</i> (ORF93), <i>bro-a</i> (ORF59), <i>cg30</i> (ORF78), <i>bro-b</i> (ORF106)	

3.5.2.5. Filogenetik Analiz

Daha önce (2.5.4.'de) bakülovirüslere ait üç korunmuş kısmi gen bölgesine (*polh*, *lef8*, *lef9*) göre yapılan filogenetik analiz, HearNPV-TR'ın genom analizi yapıldıktan sonra belirlenen 38 kor gene göre tekrar yapıldı. Bunun için, HearNPV-TR ile Alfabakülovirüs I, II ve Betabakülovirüs gruplarındaki 50 adet genomun, 38 kor genine ait aminoasit dizisi peş peşe sıralanarak, filogenetik analiz yapıldı. Filogenetik ağaçta Alfabakülovirüs I, II ve Betabakülovirüs gruplarında bulunan genomlar kendi aralarında kümelendi. HearNPV-TR genomu, *H. assulta* NPV Çin, *H. armigera* NPV Çin (C1 ve G4) ve *H. armigera* NPV Avustralya izolatlarına yakınlık gösterdi (Şekil 28). Bu analizde kullanılan genomlara ait bilgiler Tablo 19'da gösterildi.



Şekil 28. HearNPV-TR genomunun bilinen bakülovirüs genomları ile filogenetik olarak karşılaştırılması

Şu ana kadar, *Helicoverpa* SNPV'den 25 adet izolatin genomu dizilenmiştir. Bu izolatlara *H. armigera*, *H. zea* ve *H. assulta* konaklarına aittir. Bu çalışmada ilk defa *H. peltigera* konağından izole edilen NPV'nin genomu analiz edildi. Ancak, farklı konaklardan izole edilen çoğu bakülovirüs izolatinin aslında aynı türün varyantları olabileceği bildirilmiştir (Jehle vd., 2006; Rowley vd., 2011; Wennmann vd., 2018). Bu durum, Kimura-2 parametre analizi ile saptanır. HearNPV-TR genomu, tüm *Helicoverpa* SNPV genomları ile kıyaslandı. Analiz sonucuna göre, HearNPV-TR ile *Helicoverpa* izolatlara arasındaki nükleotid lokus uzaklıklarının 0.050'den küçük olduğu görüldü. Buna göre, HearNPV-TR izolatinin *H. armigera* SNPV varyantı olduğu belirlendi (Tablo 20).

Tablo 19. Filogenetik analizde kullanılan bakülovirüs genomları

Genomlar	İzolat adı	Genom büyüklüğü	GC içeriği (%)	Nükleotit Benzerliği (%)	Kaynak	Erişim numarası
Alfa/I Bakülovirüsler						
Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus	AcMNPV-C6	133.894	40.7	81	ABD	L22858
Bombyx mori nucleopolyhedrovirus	BmNPV	126.879	40.3	76	Hindistan	JQ991010
Bombyx mandarina nucleopolyhedrovirus	BomaNPV	126.770	40.2	76	Çin	FJ882854
Choristoneura fumiferana multiple nucleopolyhedrovirus	CfMNPV	129.593	50.1	82	Kanada	AF512031
Choristoneura murinana nucleopolyhedrovirus	ChmuNPV	124.688	50	70	Almanya	KF894742
Hyphantria cunea nucleopolyhedrovirus	HycuNPV	132.959	45.5	75	Japonya	AP009046
Maruca vitrata nucleopolyhedrovirus	MaviNPV	111.953	38.6	79	Tayvan	EF125867
Alfa/II Bakülovirüsler						
Agrotis ipsilon nucleopolyhedrovirus	AgipNPV-Illinois	155.122	48.6	81	ABD	EU839994
Agrotis segetum nucleopolyhedrovirus	AgseNPV-A	147.544	45.7	72	Polonya	DQ123841
Adoxophyes honmai nucleopolyhedrovirus	AdhoNPV	113.220	35.6	76	Japonya	AP006270
Adoxophyes orana nucleopolyhedrovirus	AdorNPV	111.724	35	75	İngiltere	EU591746
Lymantria dispar multiple nucleopolyhedrovirus	LdMNPV-3041	162.658	57.3	79	Japonya	KT626571

Tablo 19'un devamı

Lymantria xyliina multiple nucleopolyhedrovirus	LyxyMNPV-5	156.344	53.5	79	Tayvan	GQ202541
Mamestra brassicae multiple nucleopolyhedrovirus	MbMNPV	154.451	40.1	69	Çin	JX138237
Mamestra configurata nucleopolyhedrovirus	MacoNPV-A	153.656	41.7	79	Kanada	AF539999
Malacosoma neustria multiple nucleopolyhedrovirus	ManeNPV-T2	130.202	38.2	71	Türkiye	KY968317
Pseudoplusia includens single nucleopolyhedrovirus	PsinSNPV-IE	139.132	39.3	78	Kanada	KJ631622
Spodoptera exigua nucleopolyhedrovirus	SeMNPV HT-SeSP2A	135.395	43.9	77	İspanya	HG425349
Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus	SfMNPV	134.239	40.3	92	Kolombiya	KF891883
Spodoptera littoralis nucleopolyhedrovirus	SpliNPV-AN1956	137.998	44.7	89	Mısır	JX454574
Spodoptera litura nucleopolyhedrovirus	SpltNPV-G2	139.342	42.8	89	Çin	AF325155
Trichoplusia ni single nucleopolyhedrovirus	TnSNPV	134.394	39	69	ABD	DQ017380

Tablo 19'un devamı

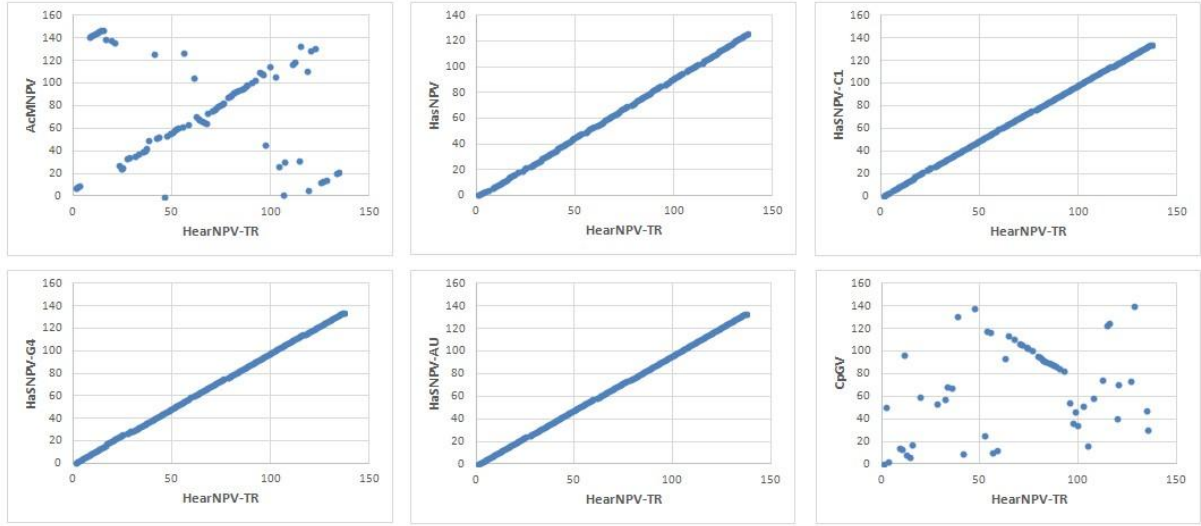
Helicoverpa armigera single nucleopolyhedrovirus	HaSNPV-AC53	130.442	39.1	99	Avustralya	KJ909666
	HaSNPV-AC53-C1	130.460	39.1	99	Avustralya	KU738896
	HaSNPV-AC53-C5	130.442	39.1	99	Avustralya	KU738898
	HaSNPV-AC53-C6	130.435	39.1	99	Avustralya	KU738899
	HaSNPV-AC53-T4.1	130.440	39.1	99	Avustralya	KU738902
	HaSNPV-AC53-T5	130.439	39.1	99	Avustralya	KU738904
	HaSNPV-AC53-C9	130.437	39.1	99	Avustralya	KU738900
	HaSNPV-AC53-T2	130.440	39.1	99	Avustralya	KU738901
	HaSNPV-AC53-T4.2	130.443	39.1	99	Avustralya	KU738903
	HaSNPV-AC53-C3	130.437	39.1	99	Avustralya	KU738897
	HaSNPV-H25EA1	130.436	39.1	99	Avustralya	KJ922128
	HaSNPV-AU	130.992	39	99	Avustralya	JN584482
	HaSNPV-LB1	131.966	39.2	99	İberya	KJ701029
	HaSNPV-SP1A	132.481	39.2	99	İberya	KJ701032

Tablo 19'un devamı

Helicoverpa armigera single nucleopolyhedrovirus	HaSNPV-SP1B	132.265	39.2	99	İberya	KJ701033
	HaSNPV-LB3	130.949	39.2	99	İberya	KJ701030
	HaSNPV-LB6	130.992	39.2	99	İberya	KJ701031
	HaSNPV-NNg1	132.425	39.2	99	Kenya	AP010907
	HaSNPV-C1	130.759	38.9	99	Çin	AF303045
	HaSNPV-G4	131.405	39	99	Çin	AF271059
	HaSNPV-L1	136.760	39.1	98	Hindistan	KT013224
	HzSNPV-HS18	130.890	39.1	99	Rusya	KJ004000
	HzSNPV-F16 (Elcar)	130.869	39.1	99	ABD	AF334030
	HzSNPV-Br/South	129.694	39.1	99	Brazilya	KM596835
	HasNPV-DJ0031	129.801	38.8	99	Çin	MG569706
	Betabakülovirüsler					
Helicoverpa armigera granulovirus	HearGV	169.794	40.8	75	ABD	EU255577
Cydia pomonella granulovirus	CpGV-M1	123.500	45.3	67	Meksika	U53466
Xestia c-nigrum granulovirus	XecnGV	178.733	40.7	69	ABD	AF162221

3.5.2.6. Gen Benzerlik Analizi

Gen benzerlik analizi, analiz edilen genom ile diğer genomlar arasındaki homolog ORF'leri belirler ve eş olan ORF'ler aynı düzlemde bulunur (Hu vd, 1998). Bu analizde, HearNPV-TR genomunda bulunan ORF'lerin homolojisi AcMNPV, HasNPV, HaSNPV-C1, HaSNPV-G4, HaSNPV-AU ve CpGV genomları ile kıyaslandı. HearNPV-TR'nin gen dizilimi tüm *Helicoverpa* NPV genomları (HasNPV, HaSNPV-C1, HaSNPV-G4, HaSNPV-AU) ile benzer homoloji gösterirken, AcMNPV ve özellikle Betabakülovirüs grubunda bulunan CpGV genomu ile büyük farklılık gösterdi (Şekil 29).

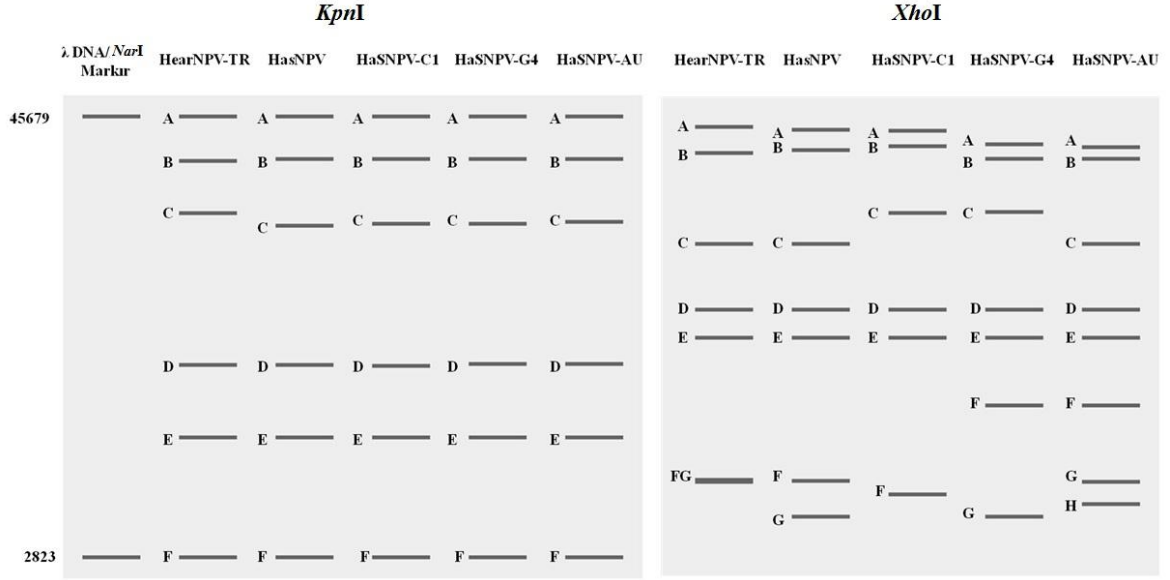


Şekil 29. HearNPV-TR'nin gen benzerlik analizi

3.5.2.7. Restriksiyon Endonükleaz Profili

HearNPV-TR genomunun restriksiyon endonükleaz profili, HasNPV, HaSNPV-C1, HaSNPV-G4 ve HaSNPV-AU genomları ile *in silico* olarak kıyaslandı. Tüm genomların *KpnI* ve *XhoI* enzimlerine göre profilleri Şekil 30'da belirtildi. HearNPV-TR genomunu *KpnI* ve *XhoI* enzimleri sırasıyla 6 ve 7 fragmente ayırdı. *KpnI* enzimi tüm genomlarda aynı sayıda fragment oluşturdu ancak HearNPV-TR'nin A, B ve C fragmentlerinin boyutu diğer genomlardan farklılık gösterdi. Ayrıca, *XhoI* enzimi HearNPV-TR, HasNPV ve HaSNPV-G4 genomlarında 7 fragment oluştururken, HaSNPV-C1 genomunda 6,

HaSNPV-AU genomunda ise 8 fragment oluşturdu. HearNPV-TR genomunun *XhoI* enzimine göre, A, B, C, D, F ve G fragmentlerinin diğer genomlardan farklı boyutlarda olduğu belirlendi (Tablo 21).



Şekil 30. HearNPV-TR genomu ile diğer *Helicoverpa/Heliothis* NPV genomlarının *in silico* restriksiyon endonükleaz profilleri

Tablo 21. HearNPV-TR genomu ile diğer Helicoverpa/Heliothis NPV genomlarının restriksiyon kesim noktaları

Fragment	<i>KpnI</i>					<i>XhoI</i>				
	HearNPV- TR	HasNPV	HaSNPV- C1	HaSNPV- G4	HaSNPV- AU	HearNPV- TR	HasNPV	HaSNPV- C1	HaSNPV- G4	HaSNPV- AU
A	54.8	55.5	56.3	56.8	56.0	41.8	41.2	40.8	37.5	36.7
B	34.5	34.9	34.9	34.9	34.9	35.6	36.2	37.0	34.2	34.3
C	24.8	22.8	23.1	23.1	23.4	19.9	20.0	24.4	24.5	20.0
D	9.5	9.5	9.4	9.5	9.5	13.1	13.2	13.2	13.2	13.2
E	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0
F	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	4.5	4.4	4.1	7.2	7.2
G						4.4	3.5	-	3.5	4.4
H										3.8
Toplam	130.5 kb	129.6 kb	130.6 kb	131.2 kb	130.7 kb	130.3 kb	129.5 kb	130.5 kb	131.1 kb	130.6 kb

* HearNPV-TR genomundaki farklı olan fragment boyutları koyu renk ile belirtildi.

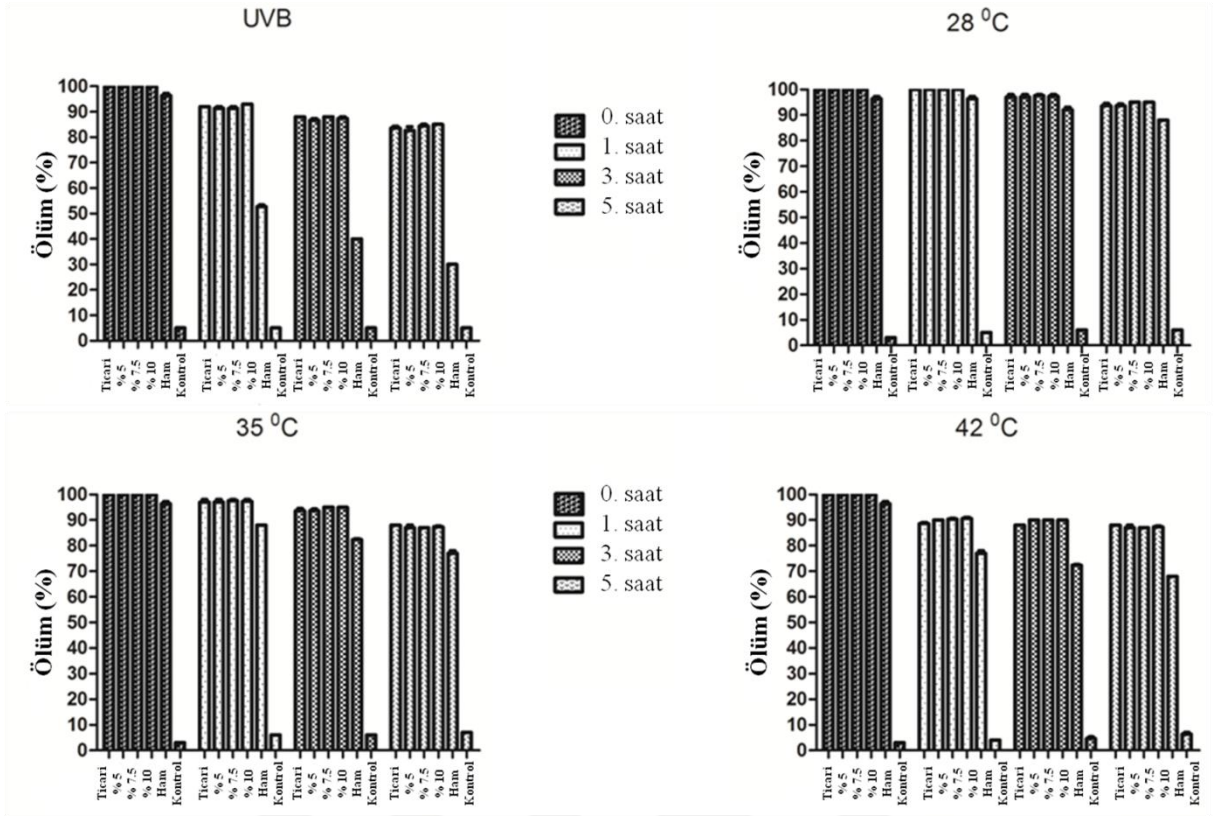
3.6. Virüs İzolatından Biyopreparat Hazırlanması

3.6.1. Ultraviyole-B ve Sıcaklığa Dirençli Formülasyon

UV-B deneylerinde, ham HearNPV-TR, %5, %7.5, %10 yağ içeren formülasyonlar ve ticari ürün 3. dönem *H. armigera* larvalarına verildi ve virülans oranları sırasıyla şu şekilde belirlendi: %98, %100, %100, %100, %100 (0. saatte), %52, %92, %90, %90, %93 (1. saatte), %39, %88, %87, %87, %89 (3. saatte) ve %31, %84, %83, %85, %85 (5. saatte) (Şekil 31). Beş saat sonunda ham HearNPV-TR'nin virülansı belirgin bir şekilde azalırken, yağ içeren formülasyonlar ile izolatın UV-B'ye dayanıklı hale geldiği belirlendi.

Sıcaklık deneylerinde 28 °C ve 35 °C için virülansda belirgin bir değişiklik gözlenmedi ancak 42 °C'de 5 saat sonunda izolatın ham halinde virülansın düştüğü, formülasyonlarda ise virülans etkisinin yüksek oranda korunduğu görüldü. Ham HearNPV-TR'nin, %5, %7.5, %10 yağ içeren formülasyonların ve ticari ürünün virülans oranları sırasıyla şu şekildedir: %97, %100, %100, %100, %100 (28 °C'de 0. saat), %97, %100, %100, %100, %100 (28 °C'de 1. saat), %92, %97, %97, %98, %98 (28 °C'de 3. saat), %89, %94, %94, %95, %95 (28 °C'de 5. saat); %97, %100, %100, %100, %100 (35 °C'de 0. saat), %89, %98, %98, %98, %98 (35 °C'de 1. saat), %82, %93, %93, %94, %94 (35 °C'de 3. saat), %73, %84, %84, %85, %85 (35 °C'de 5. saat), %97, %100, %100, %100, %100 (42 °C'de 0. saat), %73, %87, %88, %89, %85 (42 °C'de 1. saat), %70, %87, %87, %87, %85 (42 °C'de 3. saat) ve %68, %85, %84, %85, %85 (42 °C'de 5. saat) (Şekil 31).

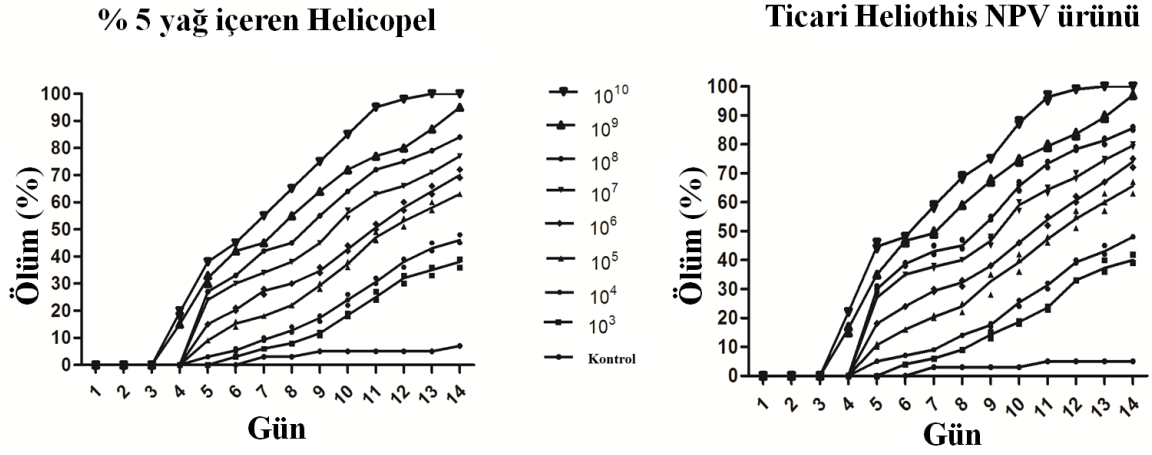
UV-B ve sıcaklık deneylerine göre ham virüsün çevre şartlarından (UV-B ve yüksek sıcaklığa karşı) korunması için, %5 yağ içeren formülasyonun yeterli olduğu belirlendi. Böylece, doz denemesi ve saksı deneyleri için bu formülasyon tercih edildi. HearNPV-TR'in aktif madde olduğu formülasyon, HelicoPel olarak adlandırıldı.



Şekil 31. Hazırlanan biyopreparatlarının ve ticari ürünün, UVB'ye dayanıklılığının karşılaştırılması

3.6.2. Hazırlanan Biyopreparatın *H. armigera* Larvaları Üzerinde Etkili Dozu

Hazırlanan preparatın %5 yağ formülasyonu ve ticari ürün, 3. dönem *H. armigera* larvaları üzerinde 14. gün sonunda en yüksek doz için (1×10^{10} PIB/mL) %100 ölüm gösterdi (Şekil 32). Yağ formülasyonu ve ticari ürünün, LC_{50} değerleri sırasıyla 1.9×10^4 ve 1.5×10^4 PIB/mL olarak ve LC_{95} değerleri de sırasıyla 1.6×10^8 ve 1.1×10^8 PIB/mL olarak belirlendi (Tablo 22).



Şekil 32. Hazırlanan Helicopel biyopreparatının ve ticari ürünün, larvalar üzerindeki doz denemeleri

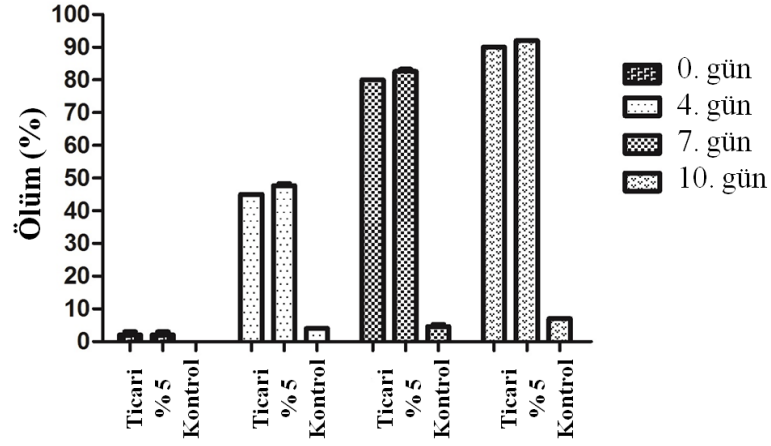
Tablo 22. Hazırlanan Helicopel biyopreparatının ve ticari ürünün, larvalar üzerindeki ölüm oranları

Ürün	Mortalite	LC ₅₀	LC ₉₅	χ^2	df
Ticari Heliiothis NPV ürünü	% 100	1.5×10^4	1.1×10^8	2.0	2
% 5 yağ içeren Helicopel	% 100	1.9×10^4	1.6×10^8	2.0	2

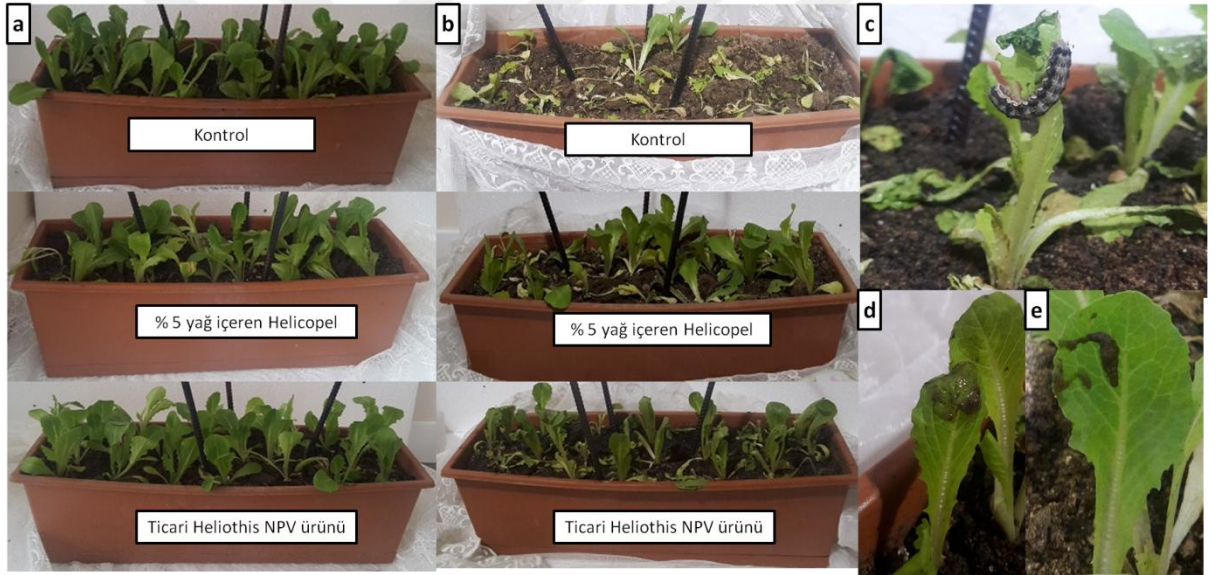
χ^2 : Ki-kare, df: Serbestlik derecesi

3.6.3. Biyopreparatın Saksı Ölçeğinde *H. armigera* Larvaları Üzerindeki Etkisi

Saksı denemelerinde, ürünlerin LC₉₅ değerini veren 1×10^8 PIBs/mL doz kullanıldı. Marul yapraklarına uygulanan %5 yağ formülasyonu ve ticari ürünlerin 3. dönem *H. armigera* larvaları üzerinde 10. gün sonundaki ölüm oranları sırasıyla %92 ve %90 olarak belirlendi (Şekil 33). Larvaların marul fideleri üzerinde verdiği zarar durumu Şekil 34'de gösterilmektedir.



Şekil 33. Hazırlanan Helicopel biyopreparatının ve ticari ürünün, saksı denemesi sonucunda larvalar üzerindeki ölüm oranları



Şekil 34. Hazırlanan Helicopel biyopreparatının ve ticari ürünün zararının karşılaştırılması. a. uygulama öncesi, b. uygulama sonrası, c. kontrol grubundaki larvaların zararı, d ve e. uygulama sonrası viral enfeksiyondan ölen *H. armigera* larvaları: (d) helicopel, (e) ticari ürün.

4. TARTIŞMA

Tarım, insanoğlunun en önemli geçim ve beslenme kaynağıdır. Bu nedenle tarım ürünlerine zarar veren ve ekonomik kayba neden olan böceklerin kontrol altına alınması gerekmektedir. Bu zamana kadar zararlı böceklerin kontrolü için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında aranan en temel özellik, sadece hedef organizmaya etki etmesi, diğer canlılara ve doğaya olumsuz bir etki oluşturmamasıdır. Biyolojik mücadele etmenleri arasında yer alan bakülovirüsler, hedef organizmanın türüne ya da cinsine özgü olması, virülansının yüksek olması ve hedef dışı canlılarda zarar oluşturmaması açısından öne çıkmaktadır. Böylece, zararlı böceklere karşı bakülovirüs kaynaklı etkili bir biyopestisit geliştirilmesi hem dünya hem de ülkemiz için önemli bir ihtiyaçtır.

Yeşilkurt (*Helicoverpa/Heliiothis*, Lepidoptera: Noctuidae) türleri ülkemiz de dahil bütün dünya ülkelerinde kozmopolit olarak bulunan polifag tarım zararlılarıdır. Ancak, şimdiye kadar ülkemizde bu zararlının viral patojenleri hakkında bir çalışma yapılmamıştır.

Bu tezde yapılan çalışmalar sonucunda, tarım zararlısı *Helicoverpa/Heliiothis* türlerinden 5 adet bakülovirüs izole edildi. İzolatların morfolojik ve moleküler tanımlanması yapıldı. Virülans testleri sonucunda ülkemizdeki tüm *Helicoverpa/Heliiothis* türleri üzerinde en etkili olan izolataın, genom analizi yapıldı. Ayrıca bu izolataın (HearNPV-TR) yağ formülasyonu hazırlanarak, insektisidal etkileri araştırıldı.

Doğal yaşam ortamlarında hem ölü olarak bulunan hem de sağlıklı olan *Helicoverpa/Heliiothis* larvaları, 2014-2017 yılları arasında yapılan arazi çalışmaları sonucunda toplanarak, uygun koşullarda laboratuvara getirildi. Doğada böcek popülasyonları üzerinde bakülovirüs enfeksiyonları sık sık gözlemlenmektedir (Adams ve McClintock, 1991; Cooper vd., 2003; Il'inykh vd., 2004). Bu enfeksiyonlar zararlı böcek popülasyonlarının ekonomik zarar eşiğinin altında tutulması açısından önemlidir (Fuxa, 1993; Cory ve Myers, 2003). Aynı zamanda laboratuvar ortamında sağlıklı gözükten larvaların strese girmesi, var olan gizli bir bakülovirüs enfeksiyonunu da ortaya çıkartarak larvaların hastalanmasını/ölmesini tetiklemektedir (Il'inykh ve Ul'yanova, 2005). Bu çalışmada sağlıklı olarak laboratuvara getirilen ve yetiştirilme aşamasında kendiliğinden ölen larvalar olduğu belirlendi. Doğada ölü olarak bulunan ve laboratuvarında kendiliğinden ölen larvalarda PCR yöntemiyle virüs taraması yapılarak, ölümlerin viral enfeksiyon

kaynaklı olduğu saptandı. PCR reaksiyonunda, bakülovirüslerin korunmuş kısmi gen bölgelerinden polihedrin (*polh*), geç ifade faktörü 8 (*lef8*) ve 9 (*lef9*) genleri çoğaltıldı ve 5 adet izolatta bant gözlemlendi. Elde edilen bantlar, dizi analizine gönderildi. Veri tabanında yapılan karşılaştırmalar sonucunda izolatlardan 2 tanesinin (HearNPV-TR ve S1) single nükleopolihedrovirüs, 3 tanesinin de (HearNPV-O1, O2 ve S2) multiple nükleopolihedrovirüs izolatları ile benzerlik gösterdiği görüldü.

İzolatlar, ışık ve elektron mikroskoplarında incelendi. Işık mikroskopisi incelemeleri sonucunda, nükleopolihedrovirüslere ait inklüzyon cisimcikleri parlak bir şekilde tüm izolatlarda gözlemlendi. Taramalı elektron mikroskopisi çalışmalarında ise, inklüzyon cisimciklerinin (PIB) düzensiz morfolojide olduğu gözlemlendi ve büyüklükleri ölçüldü. En küçük PIB boyutu HearNPV-TR (0.73-1.66 μm)’da gözlenirken, en büyük PIB boyutu ise HearNPV-S2 (1.28-2.26 μm)’de görüldü. Literatürde, NPV’lere ait PIB yapılarının 0.4-5 μm boyut aralığında olduğu ve morfolojik yapılarının düzensiz olduğu belirtilmiştir (Federici, 1995; Harrison ve Hoover 2012). Bu çalışmada, incelenen tüm HearNPV izolatlarının tipik bir NPV karakteristik boyutuna, şekline ve morfolojine uygun olduğu belirlendi. Literatürdeki diğer *Heliiothis* NPV izolatlarının PIB büyüklükleri ile kıyaslandığında, Hindistan (1.6-2.4 μm) (Somasekar et al., 1993) ve Çin (2 μm) (Tang vd., 2012) izolatlarından küçük, Arjantin izolatlarından (0.6-1.2 μm) (Ferrelli vd., 2016) ise büyük olduğu görüldü. Aynı virüsün farklı coğrafik izolatları arasında PIB büyüklük farklılığının olmasında birçok faktör etkili olabilir. Bunlardan biri enfeksiyon sırasında konak hücrelerin çevresel ve fiziksel koşullarıyla ilgilidir (Kioukia vd., 1995).

Geçirimli elektron mikroskobisi incelemelerinde HearNPV-TR ve S1 izolatlarının tekli (SNPV), HearNPV-O1, O2 ve S2 izolatlarının ise çoklu (MNPV) nükleokapsit içerdiği belirlendi. Bakülovirüslerdeki nükleokapsitlerin tekli ve çoklu virion içermeleri durumunun taksonomik bir anlamı olmamakla birlikte bu fenotiplerin oluşumundan sorumlu olan bakülovirüs genleri ve mekanizmaları belirsizliğini korumaktadır (Rohrmann, 2013).

İzolatların nükleokapsitlerin uzunlukları (en-boy) ölçüldüğünde, en küçük nükleokapsite sahip izolatın HearNPV-S2 (146 \times 34 nm) ve en büyük nükleokapsiti olan izolatın HearNPV-O1 (279 \times 56 nm) olduğu belirlendi. Literatürde bakülovirüslerin nükleokapsit boyutlarının 250-300 nm uzunluğunda ve 30-60 nm çapında olduğu bildirilmiştir (Jehle vd., 2006). Bu çalışmada belirlenen ölçüler literatür ile uyumludur. Literatürdeki HearNPV çalışmalarında tespit edilen nükleokapsit boyutlarına bakıldığında,

Hindistan izolatının nükleokapsitinin (277×41 nm) HearNPV-O1 dışındaki tüm izolatlardan büyük olduğu (Sridhar vd., 2011), Çin izolatının nükleokapsitinin (230×50 nm) de (Tang vd., 2012) HearNPV-O1 ve O2 dışındaki üç izolattan büyük olduğu görüldü. Nükleokapsit sayısının çoklu ve büyük olduğu izolatların konakçı aralığının daha geniş olabileceği ve konak üzerindeki enfeksiyonun daha erken başlayabileceği gibi avantajları olabileceği bildirilmiştir (Volkman, 1997; Washburn vd., 1999; 2003). Tekli nükleokapsit içeren izolatların konak üzerinde enfeksiyonunun başlamasının çoklu nükleokapsit içeren izolatlara göre 8 saat daha uzun sürdüğü bulunmuştur (Washburn vd., 2003). Bu çalışmada çoklu nükleokapsit içerdiği ve nükleokapsit büyüklüğü en fazla olan izolat HearNPV-O1 olarak belirlendi.

Bakülovirüslerde korunmuş gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılarak, filogenetik analizlerinin yapılması tanımlama çalışmaları için sıklıkla tercih edilmektedir (Lange vd., 2004; Herniou vd., 2004; Jehle vd., 2006). Şimdiye kadar yapılan tüm genom analizi çalışmaları sonucunda bakülovirüslerde 38 tane korunmuş gen olduğu belirlenmiştir. Bu genler arasında *polh*, *lef8* ve *lef9* genleri tüm bakülovirüs genomlarında tanımlanmış olduğu için filogeni çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir (Herniou vd., 2001, 2004; Lange vd., 2004). Bu çalışmada HearNPV izolatlarının NCBI veritabanında bulunan diğer bakülovirüs izolatları ile filogenetik yakınlığının belirlenmesi için *polh*, *lef8* ve *lef9* genleri çoğaltılarak dizi analizleri yapıldı. İzolatların *polh*, *lef8* ve *lef9* kısmi gen bölgelerine göre çizilen filogenetik ağacında, tekli nükleokapsit içeren HearNPV-TR ve HearNPV-S1 örneklerinin *H. armigera* SNPV Çin izolatına (HQ246108), çoklu nükleokapsit içeren HearNPV-O1, HearNPV-O2 ve HearNPV-S2 örneklerinin ise, *H. armigera* MNPV Çin izolatına (HQ246044) yakın olduğu belirlendi. Tüm Türkiye izolatlarının Çin izolatlarına yakın kümelenmesinin sebebinin ülkelerin aynı coğrafik kıtada bulunmasından kaynaklandığı düşünüldü.

Bakülovirüslerde genotipik varyasyon oldukça yaygındır. Genom yapısında bulunan varyasyonlar, farklı lokalitelerde aynı konakçıdan elde edilen izolatlar arasında olabileceği gibi aynı yerden toplanan izolatlar arasında da görülebilmektedir. Böylece, bir bakülovirüs türüne ait gen içeriği farklı varyasyon gösteren izolatlar birbirlerinin varyantı olarak kabul edilir (Jehle vd., 2006; Wennmann vd., 2018). Örneğin, AcMNPV'ye ait 7 (Stiles ve Himmerich, 1998), *Spodoptera frugiperda* MNPV (SfMNPV)'ye ait 9 (Simon vd., 2004), tek bir *Panolis flammea* larvasında 24 farklı NPV genotipi olduğu bildirilmiştir (Cory vd., 2005). Şu ana kadar yapılan çalışmalarda farklı *Helicoverpa/Heliiothis* türlerinden elde

edilen NPV izolatlarının hepsinin *H. armigera* NPV varyantı olduğu bildirilmiştir (Jehle vd., 2006; Rowley vd., 2011; Wennmann vd., 2018). Bu çalışmada elde edilen 5 *Helicoverpa/Heliothis* NPV izolatının *polh*, *lef8* ve *lef9* genlerine ait nükleotit dizileri peşpeşe sıralandı. Gen bankasına kayıtlı diğer *Helicoverpa/Heliothis* NPV izolatları ile birlikte, Kimura-2 parametre analizi yapıldı. Bu analiz sonucunda, tüm örneklerin *H. armigera* NPV varyantı olduğu belirlendi. Bu genetik çeşitlilik, bakülovirüslerin doğal rekombinasyon oranının çok yüksek olmasından (Hajos vd., 2000) ve yatay gen transferine ve insersiyon/delesyon mutasyonlarına sebep olan transpozon benzeri elementlere sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Jehle vd., 1998). Genotipik varyantların hem konak spektrumu hem de virülans hızında farklılık gösterdiği bilinmektedir (Garcia-Maruniak vd., 1996; Munoz vd., 1999, Cory vd., 2005).

Restriksiyon endonükleaz (REN) analizleri, bakülovirüs varyantlarını belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Goto vd., 1992). REN profillerinde fragment boyutlarının büyük ölçüde doğru hesaplanmasına rağmen, çok küçük fragmentlerin gözden kaçması ve aynı hizada olan bantların yorumlanmasındaki zorluklar nedeniyle toplam genom boyutunun tahmininde hatalar ortaya çıkabilir. Bu çalışmada virüs DNA'ları *KpnI* enzimi ile kesilerek, hem yaklaşık genom büyüklükleri hem de restriksiyon profilleri arasındaki farklılıklar belirlendi. Kesim sonucuna göre tüm izolatların genom büyüklüklerinin 129.9 - 130.4 kb arasında olduğu hesaplandı. *KpnI* enziminin HearNPV-O1, O2 ve S2 izolatları için 9, TR ve S1 izolatları için ise 6 fragment oluşturduğu belirlendi. Ayrıca, SNPV (HearNPV-TR ve S1) ve MNPV (HearNPV-O1, O2 ve S2) izolatlarının kesim bölgelerinin birbirlerinden farklı olduğu görüldü. Literatürde, *KpnI* enzimi ile kesilen Çin izolatının ise genom büyüklüğünün (130.1 kb) Türkiye izolatlarının hepsi ile, fragment büyüklüklerinin de SNPV (HearNPV-TR ve S1) Türkiye izolatları ile aynı olduğu belirlendi (Chen vd., 2000). Filogenetik analiz kısmında da olduğu gibi restriksiyon profili bakımından da Türkiye izolatları ile Çin izolatının birbirlerine benzer olduğu saptandı.

Çalışmada elde edilen 5 adet HearNPV izolatının virülans etkilerinin tespit edilmesi amacıyla, 1×10^7 PIB/ml virüs dozları ülkemizdeki 2. dönem *Heliothis* larvaları üzerinde test edildi. Tarama testinde, HearNPV-TR izolatının virülansı en yüksek izolat olduğu belirlendi. Bu nedenle formülasyon çalışmalarında HearNPV-TR izolatı kullanıldı.

HearNPV-TR izolatı farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak, ülkemizdeki 2. dönem *Heliothis* larvalarında doz denemesi yapıldı. Denemeler sonucunda en yüksek virülans 1×10^8 PIB/ml dozunda sırasıyla %98 (*H. armigera*), %93 (*H. peltigera*), %88 (*H. nubigera*),

%87 (*H. viriplaca*) olarak belirlendi. LC₅₀ değerleri ise sırasıyla 1.5×10^3 (*H. armigera*), 4.1×10^3 (*H. peltigera*), 3.9×10^4 (*H. nubigera*) ve 5.2×10^4 (*H. viriplaca*) olarak hesaplandı. Literatürde, 2. dönem *H. armigera* larvalarına karşı test edilen HearNPV Hindistan izolatının LC₅₀ değerinin 2.3×10^4 olduğu belirtilmektedir (Kumar vd., 2011). Böylece, LC₅₀ değerlerine göre HearNPV-TR izolatının Hindistan izolatından daha yüksek bir virülansa sahip olduğu görüldü. Bu durum, virüslerin farklı coğrafyalardan izole edilmesi ve virülansı etkileyen genlerinin farklılığından kaynaklanmaktadır (Williams vd., 2011).

Dünyada *Helicoverpa/Heliothis* türlerinden şimdiye kadar pek çok bakülovirüs izole edilmiştir. Aynı konaktan elde edilen izolatların virülansı ve konak spektrumları farklılık göstermektedir. Böylece, HearNPV-TR izolatı ile daha önce izole edilen HearNPV izolatları arasındaki moleküler farklılığı ortaya koyabilmek, virülans farklılığının moleküler kaynağını aydınlatabilmek ve biyopestisit geliştirme veya başka biyoteknolojik düşüncelerle bu virüsü kullanabilmek amacıyla, HearNPV-TR'nin genom analizi yapıldı ve filogenetik analizde kendisine en yakın kümelenen 4 *Helicoverpa* SNPV (HasNPV, HaSNPV-C1, HaSNPV-G4 ve HaSNPV-AU) genomu ile detaylı olarak karşılaştırıldı. HearNPV-TR ile HasNPV, HaSNPV-C1, HaSNPV-G4 ve HaSNPV-AU'nin ortak ORF sayısı sırasıyla 126, 132, 134 ve 134 olarak belirlendi (Tablo 17). Ayrıca, HearNPV-TR'nin nükleotit dizleri bu genomlar ile sırasıyla %98, %98, %99 ve %99 oranında benzerlik gösterdi. Ancak, *bro-a* geni ve *hrs* bölgelerinde (*hr3* ve *hr5*) önemli farklılıklar olduğu görüldü. *Helicoverpa* NPV genomları arasındaki farklılıkların genellikle *bro* genleri ve *hrs* bölgelerinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Chen vd., 2002; Zhang vd., 2005; Ogembo vd., 2009; Arrizubieta vd., 2015; Noune ve Hauxwell, 2015, 2016; Raghavendra vd., 2017).

Hrs bölgeleri, bakülovirüslerde ilk kez hibridizasyon ile tanımlanan bölgelerdir. Genomda replikasyon orjini ve transkripsiyon arttırıcı olarak görev alırlar (Cochran vd., 1982; McClintock ve Dougherty, 1988; Hilton ve Winstanley, 2007). Aynı zamanda, virüs üretimini ve virülansı da etkiledikleri bilinmektedir (Sun, 2015). Bakülovirüslerde bulunan *hrs* bölgelerinin sayısı 2-17 arasında değişmektedir (Wang vd., 2016). *Hrs* bölgesi içermeyen bakülovirüs genomları da vardır. Bu genomlar şunlardır: *Chrysodeixis chalcites* NPV (ChchNPV), *Clanis bilineata* NPV (ClbiNPV), *Trichoplusia ni* NPV (TniSNPV), *Adoxophyes orana* GV (AdorGV), *Cydia pomonella* GV (CpGV) ve *Spodoptera litura* GV (SpltGV) (Luque vd., 2001; Wormleaton vd., 2003; Willis vd., 2005; Van Oers vd., 2005).

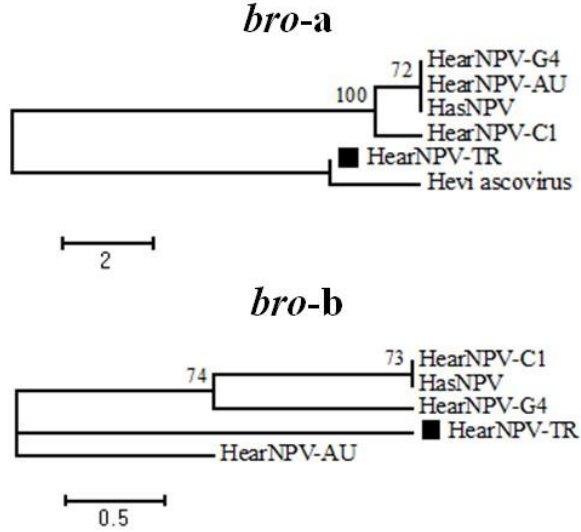
Bu virüslerde hrs bölgesi bulunmasa da genom dizileri incelendiğinde kusurlu palindromların olduğu görülebilir. Örneğin, CpGV genomunda, homolog tekrar bölgeleri yoktur. Ancak 75 bp kusurlu bir palindromun, genom üzerinde 13 farklı noktada bulunduğu görülmüştür (Luque vd., 2001). HearNPV-TR genomunda 5 adet hrs bölgesi bulunmaktadır. Hrs bölgeleri geç gen transkripsiyonu DNA replikasyonu için gereklidir. Bakülovirüslerde BV üretimi geç, gömülü yapı üretimi ise çok geç fazda meydana gelir (Thiem ve Miller, 1990). Bu nedenle HearNPV-TR genomunda 5 adet hrs bölgesinin bulunması bu izolat için bir avantajdır.

HearNPV-TR genomundaki tüm hrs bölgeleri nükleotit boyutu olarak, HasNPV, C1, G4 ve AU genomlarından oldukça farklı olduğu görüldü (Tablo 23). Hr3 ve hr5 bölgelerinin de, HasNPV, C1, G4 ve AU genomları ile %87-89 ve %77-89 oranında düşük benzerlik gösterdiği belirlendi. Genomda görülen bu durum, izolatlara karakteristik özellik sağlamak ve transkripsiyon artırma seviyelerinin, virüs üretiminin ve virülansın farklı olmasına sebep olmaktadır.

Bakülovirüslerde yaygın olarak bulunan *bro* genleri, konak DNA replikasyonu ve transkripsiyonu üzerinde etkili olan DNA bağlanma proteinlerini içermektedir (Zemskov vd., 2000). Alfabakülovirüs I grubundan CfMNPV, EppoNPV, MaviNPV, OpMNPV ve RoMNPV izolatlarının; Alfabakülovirüs II grubundan AdhoNPV ve SeMNPV şizolatlarının; Betabakülovirüs grubundan AdorGV, AgseGV, ChocGV, CrleGV ve PtxyGV izolatlarının ve Gamabakülovirüs grubundan NeabNPV, NeleNPV ve NeseNPV izolatlarının genomlarında *bro* genleri bulunmamaktadır (Ahrens vd., 1997; Ijkel vd., 1999; Hashimoto vd., 2000; Hyink vd., 2002; Harrison ve Bonning, 2003; Lange ve Jehle, 2003; Nakai vd., 2003; Wormleaton vd., 2003; Garcia-Maruniak vd., 2004; Lauzon vd., 2004; De Jong vd., 2005; Duffy vd., 2006; Escasa vd., 2006).

HearNPV-TR genomunda iki adet *bro* geni (*bro-a* ve *bro-b*) yer almaktadır. HasNPV, HaSNPV-C1, HaSNPV-G4 ve HaSNPV-AU genomlarındaki *bro* genleri ile aminoasit benzerlik homolojisinin %86 (*bro-a*) ve %99 (*bro-b*) olduğu belirlendi. HearNPV-TR genomundaki *bro-a* geni 142 aa uzunluğunda iken, diğer dört Helicoverpa SNPV genomundaki *bro-a* genleri 502 aa uzunluğundadır (Tablo 23). Benzerlik analizine göre HearNPV-TR genomunda bulunan *bro-a* geninin, *Heliothis virescens* askovirüs 3i (HvAV-3i; erişim numarası: AXN77341) genomunda bulunan *bro* 23 genine yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlendi. HearNPV-TR, HasNPV, HaSNPV-C1, HaSNPV-G4, HaSNPV-AU ve HvAV-3i genomlarındaki *bro-a* genlerinin filogenetik analizi ile bu

benzerlik teyit edildi (Şekil 35). Santos vd. (2018), *Urbanus proteus* nükleopolihedrovirüs (UrprNPV) genomunu analiz ederek, bu genomda bulunan *bro-a* geninin askovirüslerde bulunan *bro* geni ile benzerlik gösterdiğini belirlemiştir (Santos vd., 2018). Bu durum, bakülovirüsler ve askovirüsler arasında yatay gen transferinin olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 35. *Bro* genlerinin filogenetik analizi

Bununla birlikte, HearNPV-TR genomunda bulunan *bro-b* geni diğer HearNPV türleri ile % 99 benzerlik göstermektedir (Tablo 23).

Tablo 23. HearNPV-TR, HasNPV, C1,G4, AU genom özellikleri

Genom adı	bro genleri	aa boyutu	Benzerlik oranı	hrs bölgeleri	bp boyutu	Benzerlik oranı
HearNPV-TR	<i>bro-a</i> <i>bro-b</i>	142 502	- -	hr1	2264	-
				hr2	1149	-
				hr3	714	-
				hr4	3246	-
				hr5	2424	-
HasNPV	<i>bro-a</i> <i>bro-b</i>	358 502	86% 99%	hr1	1960	97%
				hr2	906	99%
				hr3	1187	87%
HaSNPV-C1	<i>*bro-a</i> <i>bro-a</i> <i>bro-b</i>	245 358 502	- 86% 99%	hr1	1969	97%
				hr2	907	99%
				hr3	297	89%
				hr4	2253	97%
				hr5	899	77%
HaSNPV-G4	<i>*bro-a</i> <i>bro-a</i> <i>bro-b</i>	245 528 502	- 86% 99%	hr1	2282	98%
				hr2	1150	98%
				hr3	759	89%
				hr4	2304	92%
				hr5	2806	89%
HaSNPV-AU	<i>bro-a</i> <i>bro-b</i>	550 502	86% 99%	hr1	2321	97%
				hr2	1150	98%
				hr3	755	89%
				hr4	2598	98%
				hr5	2806	89%

Gen benzerlik analizi, iki bakülovirüs arasında paylaşılan tüm ORF'leri bir düzlem üzerinde belirlemektedir (Hu vd., 1998). HearNPV-TR genomu ile AcMNPV, HasNPV, HaSNPV-C1, HaSNPV-G4, HaSNPV-AU ve CpGV genomları arasında ortak olan tüm ORF'ler Şekil 29'da ayrı ayrı gösterilmiştir. HearNPV-TR'nin ORF düzlemi, Helicoverpa SNPV genomları ile benzerlik gösterirken, AcMNPV ve CpGV genomlarında oldukça farklı bir ORF dağılımı göstermiştir. Bu durumun Alfabakülovirüs II sınıfından olan HearNPV-TR'nin aynı sınıfta bulunan Helicoverpa SNPV genomları ile çok sayıda geni paylaşmasından ancak farklı sınıflarda olan AcMNPV (Alfabakülovirüs I) ve CpGV (Betabakülovirüs) ile paylaştığı gen sayısının az olmasından kaynaklandığı görüldü.

Filogenetik analizde, HearNPV-TR ile genom dizisi bilinen 25 Helicoverpa SNPV genomuna ait 38 kor genin peş peşe sıralanan aminoasit dizileri kullanıldı. Analiz

sonucunda HearNPV-TR, Çin (H. assulta NPV, H. armigera NPV-C1 ve G4) ve Avustralya (H. armigera NPV-AU) izolatlarına yakın kümelenildiği görüldü.

Bakülovirüslerde bu zamana kadar elde edilen virüsler, kendi izole edildikleri konağa göre isimlendirilmiştir. Ancak sonraki çalışmalarda, Kimura-2 parametre analizi ile çoğu izolatin aslında aynı türün varyantı olduğu ileri sürülmüştür (Jehle vd., 2006; Rowley vd., 2011; Wennmann vd., 2018). Bu çalışmada, bakülovirüs genomlarında bulunan 38 kor genin nükleotit dizileri peş peşe eklenerek, Kimura-2 analizi yapıldı. Analiz sonucunda, HearNPV-TR ile *Helicoverpa* izolatları arasındaki nükleotit lokus uzaklıklarının 0.050'den küçük olduğu görüldüğü için *H. peltigera*'dan izole edilen virüsün *Helicoverpa* NPV varyantı olduğu belirlendi.

Tüm ORF'lerin ve homolog tekrar bölgelerinin kıyaslanması sonucunda, HearNPV-TR ve *Helicoverpa* NPV genomları arasında özellikle hr3, hr5 ve *bro-a* bölgeleri bakımından belirgin farklılıklar olduğu belirlendi. Buna göre, aynı bakülovirüs türlerinin farklı varyantları arasındaki genetik çeşitliliğin, genellikle hrs bölgeleri ve *bro* genlerindeki değişikliklerden kaynaklandığı ve bu durumun virülans farklılığına neden olduğu düşünülmektedir.

Elde edilen verilere göre HearNPV-TR izolatının ülkemizdeki *Helicoverpa/Heliothis* türlerine karşı önemli bir biyolojik mücadele etmeni olduğu belirlendi. Bu veriler ışığında, ham HearNPV-TR izolatının çevre şartlarına karşı dayanıklı hale getirilmesi ve virülasını kaybetmemesi için uygun bir formülasyon hazırlandı. Dünyada 1961 yılından beri, *H. armigera* ve *H. zea*'dan izole edilmiş bakülovirüs izolatlarından katı veya sıvı bazlı formülasyonlar üretilmiştir (Black vd., 1997; Cunningham 1998; Grzywacz vd., 2004; Reddy ve Sannaveerappanava 2011). Ancak, şimdiye kadar yapılan *Heliothis* NPV ürünlerinde yağ tabanlı bir formülasyon hazırlanmamıştır. Literatürde, bakülovirüslerden üretilen yağ tabanlı formülasyonların çevresel faktörlere (UV, ısı, rüzgar ve yağmur) karşı yüksek tolerans gösterdiği ve daha uzun raf ömrüne sahip olduğu bildirilmiştir (Batista vd., 2001; Shapiro vd., 2012).

Literatürdeki yağ tabanlı bakülovirüs formülasyonlarında pamuk tohumu yağı ve mısır yağı kullanılmıştır (Batista vd., 2001; Shapiro vd., 2012). Bu çalışmada ise maliyeti daha düşük olması sebebiyle ayçiçek yağı tercih edildi. Ayrıca, formülasyonun güçlendirilmesi için literatürdeki diğer bakülovirüs çalışmaları dikkate alınarak, yağ dışında bazı doğal katkı maddeleri de kullanıldı. Virüsün tadını güzelleştirerek, böcekler tarafından tüketimini kolaylaştırması için gliserol (Batista vd., 2001; Bhutia vd., 2012;

Narendrakumar vd., 2017), kıvam arttırıcı olarak ksantan zımkı (Jones ve Burges, 1997; Rios Velasco vd., 2012) ve yüzey gerilimini azaltmak için Silwet L-77 (Arthurs vd., 2006; Behle ve Popham 2012; Camacho vd., 2015) eklendi. Ayrıca, virüsün enfeksiyon hızını arttırmak için böceklerin peritrofik membranına zarar veren kalkoflor (Okuno vd., 2003; Martinez vd., 2003; Mukawa vd., 2003; Lasa vd., 2007; Ibargutxi vd., 2008) ve larvalarda fizyolojik stres kaynağı olarak kullanılan borik asit ilave edildi (Cisneros vd., 2002; Mulimani vd., 2004; Bhutia vd., 2012).

Ham virüsü UV'den ve sıcaklıktan korumak amacıyla başlangıçta üç farklı yağ oranı (%5, %7.5, %10) içeren formülasyon hazırlandı. Virüsün ham hali, hazırlanan üç farklı yağ formülasyonu ve ticari bir *Heliothis NPV* ürünü 0, 1, 3 ve 5 saat ayrı ayrı UV-B'ye ve 28 °C, 35 °C ve 42 °C'lerdeki sıcaklıklara maruz bırakıldıktan sonra 3. dönem *H. armigera* larvaları üzerinde test edildi. UV-B ve sıcaklık deneylerine göre ham virüsün özellikle UV-B ve 42 °C sıcaklıkta virülansının azaldığı görüldü. Ham virüsün çevre şartlarından korunması için ise formülasyonda %5 oranında yağ bulunmasının virülansı %84'ün üzerinde tuttuğu belirlendi. Bu nedenle, doz denemesi ve saksı deneyleri için %5 yağ içeren formülasyon kullanıldı.

Literatürde farklı NPV izolatlarından hazırlanan ürünlerin UV direncine bakıldığında, 1×10^9 PIB/mL dozundaki *Diaphania pulverulentalis NPV* nişasta, tinopal, tween 80 eklererek formülasyon haline getirilmiştir. Hazırlanan formülasyonun başlangıçta %98 ölüm oranına sahip olduğu ancak laboratuvar koşullarında 1 saat UV'ye maruz bırakıldığında virülansın %66'ya düştüğü bildirilmiştir (Prabhu ve Mahalingam, 2017). Batista vd. (2001), *Anticarsia gemmatalis NPV* izolatının yağ (EO) ve ıslanabilir toz (WP) olarak iki farklı formülasyonunu hazırladı. Ham virüs ve iki formülasyon 5 dakika boyunca UV'ye maruz bırakıldı. UV'ye maruz kalmayan ham virüs, WP, EO'nun ölüm oranları başlangıçta %92, %99 ve %98 iken, 5 dakika UV'ye maruz kaldıktan sonraki virülans oranları sırasıyla %19, %37 ve %37'ye düşmüştür.

Saksı denemelerinde, %5 yağ formülasyonu ve ticari ürün, marul fideleri üzerine 1×10^8 PIB/mL konsantrasyonda bulaştırıldı. Bulaştırma işlemini takip eden 10 günün sonunda 3. dönem *H. armigera* larvalarında sırasıyla %92 ve %90 ölüm görüldü. Buna göre, yağ içeren formülasyonun piyasada satılan bir NPV ürünü ile hemen hemen aynı virülansa sahip olduğu belirlendi. Elamathi vd. (2012), kadife çiçeği fidelerine farklı *H. armigera NPV* formülasyonlarını (10^9 PIB/mL) uygulamıştır. Çalışmada 4 gr. formülasyon için, *H. armigera* larvalarının 96 saat sonundaki ölüm oranını %86 olarak belirlemiştir.

Gupta vd. (2010) domates fideleri üzerinde tinopal (%0.1) ve jaggery (%1) içeren üç farklı *H. armigera* NPV Hindistan izolatını (Samba, Udheywalla, Chenani) (3×10^{12} PIB/mL) uygulamıştır. Uygulamayı takip eden 9 günün sonundaki *H. armigera* larvalarının ölüm oranları %98 (Samba), %86 (Udheywalla) ve %81 (Chenani) olarak belirlenmiştir. Saksı denemeleri sonucunda, hazırladığımız formülasyonun kullanılan doz ve deney süresi bakımından literatürdeki *H. armigera* NPV ürünlerinden daha etkili olduğu görüldü.

Sonuç olarak bu tez çalışması ile başta domates, pamuk, marul, mısır, biber, karpuz, ayçiçeği ve tütün gibi pek çok önemli tarım ürününde zarara sebep olan yeşilkurt türlerinden izole edilen ülkemize ait yerel izolatların morfolojik ve moleküler özellikleri detaylı bir şekilde aydınlatıldı. Virülansı en yüksek olan izolatın genom analizi yapıldı ve biyopreparatı hazırlandı. Böylece yeşilkurtların biyolojik mücadelesinde kullanılacak, hem çevre dostu hem de kimyasal ürünlerden daha düşük maliyetli yerel bir mikrobiyal ajan geliştirilmesi için temel oluşturuldu.

5. SONUÇLAR

1. Ülkemizdeki yeşilkurt türlerinin viral patojenlerinin belirlenmesi ve tanımlanması amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda;
 - a) Doğal ortamlarından 1347 *Helicoverpa/Heliothis* larvası toplandı. Bu larvaların 15 tanesi doğada ölü olarak bulunurken, 129 tanesi ise laboratuvara getirildikten sonra öldü. Ölen larvalardan 5 adet nükleopolihedrovirüs izole edildi. Böylece, doğada bakülovirüs enfeksiyonu sonucunda kendiliğinden ölen *Helicoverpa/Heliothis* sayısının az olduğu görüldü. Bu durumun *Helicoverpa/Heliothis* türlerinin doğada tek tek yaşamasından kaynaklandığı ve enfeksiyonun yayılmasını zorlaştırdığı düşünüldü.
 - b) İzolatların morfolojik tanımlamaları sonucunda en küçük PIB boyutunun HearNPV-TR (0.73-1.66 µm) izolatında, en büyük PIB boyutunun ise HearNPV-S2 (1.28-2.26 µm) izolatında olduğu görüldü. Aynı izolatın farklı varyantları arasındaki büyüklük farkının enfeksiyon sırasında konak hücrelerin çevresel ve fiziksel koşullarından kaynaklanabileceği düşünüldü.
 - c) Geçirimli elektron mikroskopisi incelemelerinde HearNPV-TR ve S1 izolatlarının tekli, HearNPV-O1, O2 ve S2 izolatlarının ise çoklu nükleokapsit içerdiği belirlendi. Nükleokapsit sayısı çoklu olan izolatların konakçı aralığının daha geniş olabileceği düşünüldü.
 - d) Filogenetik analizde, tüm izolatların HearNPV Çin izolatı ile yakın kümelandığı belirlendi.
 - e) *H. peltigera* ve *H. virescens* larvalarından izole edilen virüslerin de *H. armigera* NPV varyantı olduğu belirlendi. Böylece, doğada farklı konakların aynı virüs izolatı ile enfekte olduğu saptandı.
 - f) Restriksiyon analizi sonucunda, SNPV (HearNPV-TR ve S1) ve MNPV (HearNPV-O1, O2 ve S2) izolatlarının kesim bölgelerinin birbirlerinden farklı olduğu görüldü. Böylece, tekli ve çoklu nükleokapsit içeren izolatların genom düzeyinde birbirlerinden farklı olduğu düşünüldü.
 - g) Adana ilinden elde edilen HearNPV-TR izolatının, Osmaniye ve Şanlıurfa illerinden elde edilen izolatlardan daha yüksek virülansa sahip olduğu

belirlendi. Bu durumun, izolatların farklı yerlerden elde edilmesi ve enfeksiyon sırasında konağın çevresel ve fiziksel koşullarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünüldü.

2. HearNPV-TR izolatının komple genom analizinde;

- a) HearNPV-TR genomundaki hr3 ve hr5 bölgelerinin literatürdeki diğer *Heliothis* NPV genomlarından farklı olduğu görüldü. Bu farklılığın, hrs bölgelerinin izolatlara özgü karakteristik özellikte olmasından ve farklı palindromik diziler oluşturmasından kaynaklandığı düşünüldü.
- b) HearNPV-TR genomunda bulunan *bro-a* geninin, diğer bakülovirüsler ile benzerlik göstermediği ve *Heliothis virescens* askovirüs 3i genomunda bulunan *bro* 23 genine yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlendi. Bu durum, bakülovirüsler ve askovirüsler arasında yatay gen transferinin olduğunu düşündürdü.

3. HearNPV-TR izolatının formülasyon çalışmalarında;

- a) HearNPV-TR izolatının ham hali, UV-B ve yüksek sıcaklık karşısında aktivitesini kaybetti ve %5 yağ içeren formülasyon, virülansın korunmasını sağladı. Çevresel faktörler ham virüsün virülansını kısa sürede kaybetmesine neden olurken, formül haline getirilen biyopreparat ile bakülovirüslerin bu olumsuz özelliğinin aşıldığı ve doğada daha dayanıklı hale getirildiği görüldü. Ayrıca, hazırladığımız yağ temelli formülasyonun, literatürdeki diğer formülasyonlardan daha başarılı sonuçlar verdiği belirlendi.
- b) Saksı denemeleri sonucunda, hazırladığımız formülasyonun kullanılan doz ve deney süresi bakımından literatürdeki *H. armigera* NPV ürünlerinden daha etkili olduğu görüldü. Böylece, ülkemizde yerel ve etkili bir biyopreparat üretilerek bu konudaki dışa bağımlılığın azaltılmasına temel hazırlandı.

6. ÖNERİLER

Bu çalışmada, ülkemizdeki yeşilkurt türlerinin viral patojenleri araştırıldı ve virülansı en yüksek olan izolatanın (HearNPV-TR) genom dizisi aydınlatılarak biyoinformatik analizleri tamamlandı. Ayrıca yerel, çevre dostu ve güvenilir bir formülasyon hazırlanmış oldu. Elde edilen sonuçlara göre, çalışmanın daha sonraki aşamaları için aşağıdaki öneriler belirlenmiştir.

1. HearNPV-TR genomundaki görevi bilinmeyen varsayılan genler çalışılabilir,
2. Hazırlanan formülasyonun alan denemeleri yapılabilir,
3. Formülasyon memeliler üzerinde denenerek, toksisite etkisi saptanabilir,
4. Formülasyonun hem yeşilkurt türlerinin doğal düşmanları hem de yeşilkurtlar ile aynı ortamı paylaşan diğer zararlılar üzerindeki etkilerine bakılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Abbott, W. S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide, Journal of Economic Entomology, 18, 265–267.
- Ackermann, H. W. ve Smirnoff, W. A., 1983. A morphological investigation of 23 baculoviruses, Journal of Invertebrate Pathology, 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.
- Ahrens, C. H., Russell, R. L. Q., Funk, C. J., Evans, J. T., Harwood, S. H. ve Rohrmann, G. F., 1997. The sequence of the *Orgyia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome, Virology, 229, 381–399.
- Allison, J. D. ve Hare J. D. 2009. Learned and naive natural enemy responses and the interpretation of volatile organic compounds as cues or signals, The New Phytologist, 184, 768–782.
- Anonim, 2010. Ruhsatlı Tarım İlaçları, Hasad Yayınları, İstanbul.
- Ardisson-Araujo, D. M., Sosa-Gomez, D. R., Melo, F. L., Bao, S. N. ve Ribeiro, B. M., 2015. Characterization of *Helicoverpa zea* single nucleopolyhedrovirus isolated in Brazil during the first old world bollworm (Noctuidae: *Helicoverpa armigera*) nationwide outbreak, Virus Reviews Research, 20, 4.
- Arrizubieta, M., Simon, O., Williams, T. ve Caballero, P., 2015. Genomic sequences of five *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus genotypes from Spain that differ in their insecticidal properties, Genome Announcements, 3, e00548–15.
- Arthurs, S. P., Lacey, L. A. ve Bechle, R. W., 2006. Evaluation of spray-dried lignin formulations and adjuvant as solar protectant for granulovirus ofcolding moths *Cydic pomonella*, Journal of Invertebrate Pathology, 93, 88–95.
- Ayres, M. D., Howard, S. C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M. ve Possee, R. D., 1994. The Complete DNA Sequence of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus, Virology, 202, 586–605.
- Batista, A., Alves, S., Augusto, N. ve Pereira, R., 2001. Stability and persistence of two formulations containing *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrovirus (AgMNPV), Neotropical Entomology, 30, 411–416.
- Beas Catena, A., Sanchez Miron, A., Garcia Camacho, F., Contreras Gomez, A. ve Molina Grima, E., 2014. Baculovirus bio-pesticides: An overview, The Journal of Animal and Plant Sciences, 24, 362–373.

- Becnel, J. J., White, S. E., Moser, B. A., Fukuda, T., Rotstein, M. J., Undeen, A. H. ve Cockburn, A., 2001. Epizootiology and transmission of a newly discovered baculovirus from the mosquitoes *Culex nigripalpus* and *C. quinquefasciatus*, Journal of General Virology, 82, 275–282.
- Behle, R. W. ve Popham, H. J., 2012. Laboratory and field evaluations of the efficacy of a fast-killing baculovirus isolate from *Spodoptera frugiperda*, Journal of Invertebrate Pathology, 109, 194–200.
- Behle, R. W., Tamez-Guerra, P. ve Mcguire, M. R., 2003. Field activity and storage stability of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus (AfMNPV) in spray-dried lignin-based formulations, Journal of Economical Entomology, 96, 1066–1075.
- Bhutia, K. C., Chakravarthy, A. K., Doddabasappa, B., Narabanchi, G. B. ve Lingaraj, V. K., 2012. Evaluation and production of improved formulation of nucleopolyhedrosis virus of *Spodoptera litura*, Bulletin of insectology, 65, 247–256.
- Bilimoria, S. L., 1991. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. Editör: Kurstak, E., *Viruses of Invertebrates*, Marcel Dekker Inc., New York.
- Black, B. C., Brennan, L. A., Dierks, L. A. ve Gard, I. E., 1997. Commercialization of baculoviral insecticides, Editör: Miller, L. K., *The Baculoviruses*, Plenum Press, New York.
- Blissard, G. W. ve Rohrmann, G. F., 1989. Location, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus, Virology, 170, 537–555.
- Bonning, B. C., 2005. *Baculoviruses: Biology, biochemistry, and molecular biology*, Editörler: Kostas, I., Lawrence, G. ve Sarjeet, G., *Comprehensive Molecular Insect Science*, Elsevier Pergamon, Oxford, UK.
- Brooke, E. ve Hines, E., 1999. Viral biopesticides for Heliothine control fact or fiction?, Today's Life Science, 11, 38–45.
- Brown, S. E., Maruniak, J. E. ve Knudson, D. L., 1985. Baculovirus (MNPV) genomic variants. Characterization of MNPV DNAs and comparison with other *Autographa californica* MNPV DNAs, Journal of General Virology, 66, 2431–2441.
- Bulach, D. M., Kumar, C. A., Zaia, A., Liang, B., ve Tribe, D. E., 1999. Group II nucleopolyhedrovirus subgroups revealed by phylogenetic analysis of polyhedrin and DNA polymerase gene sequences, Journal of Invertebrate Pathology, 73, 59–73.
- Burden, J. P., Griffiths, C. M., Cory, J. S., Smith, P. ve Sait, S. M., 2002. Vertical transmission of sublethal granulovirus infection in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*, Molecular Ecology, 11, 547–555.

- Burges, H. D. ve Jones, K. A., 1998. Formulation of bacteria, viruses and protozoa to control insects in Formulation of microbial pesticides, Editör: Burges, H. D., Dordrecht, Kluwer Academic.
- Caballero, P., Vargas-Osuna, E. ve Santiago-Alvarez, C., 1991. Efficacy of a Spanish strain of *Agrotis segetum* granulosis virus (Baculoviridae) against *Agrotis segetum* Schiff. (Lep., noctuidae) on corn, Journal of Applied Entomology, 112, 59–64.
- Cabodevilla, O., Ibanez, I., Simon, O., Murillo, R., Caballero, P. ve Williams, T., 2011. Occlusion body pathogenicity, virulence and productivity traits vary with transmission strategy in a nucleopolyhedrovirus, Biological Control, 56, 184–192.
- Camacho, J. E., Behle, R. W., Villamizar, L. F. ve Gomez, M. I., 2015. Effect of spray dryer processing parameters on the insecticidal activity of two encapsulated formulations of baculovirus, Biocontrol science and technology, 8, 911–927.
- Chen, X., Li, M., Sun, X., Arif, M. B., Hu, Z. ve Vlak, J. M., 2000. Genomic organization of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus, Archives of Virology, 145: 2539–2555.
- Chen, X., Zhang, W. J., Wong, G., Chun, A., Lu, B. F., McCutchen, J. K., Presnail, R., Herrmann, M., Dolan, S., Tingey, S., Hu, Z. H. ve Vlak J. M., 2002. Comparative analysis of the complete genome sequence of *Helicoverpa zea* and *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedroviruses, Journal of General Virology, 83, 673–684.
- Cherry, A., Cock, M. J. W., Van den Berg, H. ve Kfir, R., 2003. Biological control of *Helicoverpa armigera* in Africa, Editör: Neuenschwander, P., Borgemeister, C. ve Langewald, J., United Kingdom, Wallingford.
- Cisneros, J., Perez J. A., Penagos, D. I., Ruiz, J., Goulson, D., Caballero, P., Cave, R. D. ve Williams, T., 2002. Formulation of a nucleopolyhedrovirus with boric acid for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize, Biological Control, 23, 87–95.
- Cochran, M. A., Carstens, E. B., Eaton, B. T. ve Faulkner, P., 1982. Molecular cloning and physical mapping of restriction endonuclease fragments of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus DNA, Journal of Virology, 41, 940–946.
- 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, Ecological Entomology, 28, 41–50.
- Cory, J. S. ve Myers, J. H., 2003. The Ecology and Evolution of Insect Baculoviruses, Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 34, 239–272.
- Cunningham, J. C., 1998. Insect Viruses and Pest Management, Editörler: Hunter-Fujita, F. R., Entwistle, P. F., Evans, H. F. ve Crook, N. E., John Wiley & Sons, Inc., New York.

- De Jong, J. G., Lauzon, H. A. M., Dominy, C., Poloumienko, A., Carstens, E. B., Arif, B. M. ve Krell, P. J., 2005. Analysis of the *Choristoneura fumiferana* nucleopolyhedrovirus genome, Journal of General Virology, 86, 929–943.
- Demir, İ., Nalçacıoğlu, R. ve Demirbağ, Z., 2008. The Significance of Insect Viruses in Biotechnology, Journal of Agricultural Science, 14, 193–201.
- Demir, I., 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, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 38, 462–470.
- Demirbağ, Z. ve Beldüz, A.O., 1997. Baculovirus'un Biyolojik Mücadeledeki Önemi, Kükem Dergisi, 20, 37–46.
- Dickler, E., 1991. Tortricid pests of pome and stone fruits, Eurasian species, Editörler: van der Geest, L. P. S. ve Evenhuis, H. H., Tortricid Pests: Their biology, natural enemies and control, Elsevier Science Publishers, New York.
- Duffy, S. P., Young, A. M., Morin, B., Lucarotti, C. J., Koop, B. F. ve Levin, D. B., 2006. Sequence analysis and organization of the Neodiprion abietis nucleopolyhedrovirus genome, Journal of Virology, 80, 6952–6963.
- Elamathi, E., Cholan, J. R., Vijayakumar, N. ve Ramamourti, A., 2012. Formulation and optimisation of various nuclear polyhedrosis virus isolates and assessment of their insecticidal activity against *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae, Archives of Phytopathology and Plant Protection, 45, 750–765.
- Engelhard, E. K., Kam-Morgan, L. N., Washburn, J. O. ve Volkman, L. E., 1994. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus, Proceedings of the National Academy of Sciences, 91, 3224–3227.
- Entwistle, P.F., 1983. Viruses for insect pest control, Span, 26, 59–62.
- Eroglu, G. B., Inan, C., Nalcacioglu, R. ve Demirbag, Z., 2020. Genome sequence analysis of a *Helicoverpa armigera* single nucleopolyhedrovirus (HearNPV-TR) isolated from *Heliothis peltigera* in Turkey, PLOS One, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194158>.
- Eroglu, G. B., Nalcacioglu, R. ve Demirbag, Z., 2019. A new *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus isolate from *Heliothis peltigera* (Denis & Schiffermuller) (Lepidoptera: Noctuidae) in Turkey, Turkish Journal of Biology, 43, 340–348.
- Eroglu, G. B., Demir, I. ve Demirbag, Z., 2018. A novel alphabaculovirus isolated from the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae): Characterization and pathogenicity, Biologia, 73, 545–551.

- Erlandson, M. E., 2008. Insect pest control by viruses, Editörler: Mahy, B. W. J. ve Van Regenmortel, M. H. V., *Encyclopedia of virology*, Elsevier, Oxford.
- Erlandson, M. A. ve Theilmann, D. A., 2009. Molecular Approaches to Virus Characterization and Detection, Editör: Stock, S. P., *Insect Pathogens*.
- Escasa, S. R., Lauzon, H. A. M., Mathur, A. C., Krell, P. J. ve Arif, B. M., 2006. Sequence analysis of the *Choristoneura occidentalis* granulovirus genome, *Journal of General Virology*, 87, 1917–1933.
- Escribano, A., Williams, T., Goulson, D., Cave, R. D., Chapman J. W. ve Caballero, P., 1999. Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas, *Journal of Economic Entomology*, 92, 1079–1085.
- Evans, H. ve Shapiro, M., 1997. *Manual of Techniques in Insect Pathology*, Editör: Lacey, L. A., San Diego.
- Fang, M., Nie, Y., Harris, S., Erlandson, M. A. ve Theilmann, D. A., 2009. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus core gene *ac96* encodes a *per os* infectivity factor (PIF-4), *Journal of Virology*, 83, 12569–12578.
- 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, *Journal of General Virology*, 78, 3091–3100.
- Fauquet, C. M. ve Fargette, D., 2005. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species, *Virology Journal*, 2, 64.
- Federici, B., 1995. *Baculovirus pathogenesis*, Editör: Miller, L. K. *The Baculoviruses*. Plenum Press.
- Ferrelli, M. L., Berretta, M. F., Belaich, M. N., Ghiringhelli, P. D., Sciocco-Cap, A. ve Romanowski, V., 2012. The baculoviral genome, Editör: Garcia, M. L. ve Romanowsky, V., Croatia, Yugoslavia.
- Ferrelli, M. L., Taibo, C., Fichetti, P., Sciocco Cap, A. ve Arneodo, J. D., 2016. Characterization of a new *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus variant causing epizootic on a previously unreported host, *Helicoverpa gelotopoeon* (Lepidoptera: Noctuidae), *Journal of Invertebrate Pathology*, 138: 89–93.
- Figueiredo, E., Munoz, D., Murillo, R., Mexia, A. ve Caballero, P., 2009. Diversity of Iberian nucleopolyhedrovirus wild-type isolates infecting *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), *Biological Control*, 50: 43–49.
- Finney, D. J., 1971. *Probit Analysis*, Third Edit, Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, London.

- Fitt, G. P., 1989. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems, Annual Review of Entomology, 34, 17–52.
- Fitt, G. P., 1994. Cotton Pest Management: Part 3. An Australian Perspective, Annual Review of Entomology, 39, 532–562.
- Friesen, P. D., 1997. Regulation of baculovirus early gene expression, Editör: Miller, L. K., *The Baculoviruses*, Plenum Press, New York and London.
- Fuxa, J. R., Richter, A. R., Ameen, A. O. ve Hammock, B. D., 2002. Vertical transmission of TnSNPV, TnCPV, AcMNPV, and possibly recombinant NPV in *Trichoplusia ni*, Journal of Invertebrate Pathology, 79, 44–50.
- Fuxa, J.R., Richter, A.R. ve Srother, M.S., 1993. Detection of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus in predatory arthropods and parasitoids after viral release in Louisiana soybeen, Journal of Entomological Science, 28, 51–60.
- Garavaglia, M. J., Miele, S. A. B., Iserte, J. A., Belaich, M. N. ve Ghiringhelli, P. D., 2012. The ac53, ac78, ac101 and ac103 are newly discovered core genes in the family Baculoviridae, Journal of Virology, 86, 12069–12079.
- Garcia-Maruniak, A., Pavan, O. H. ve Maruniak, J. E., 1996. A variable region of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus contains tandemly repeated DNA sequences, Virus Research, 41, 123–132.
- Garcia-Maruniak, A., Maruniak, J. E., Zannotto, P. M. A., Doumbouya, A. E., Liu, J. C., Merritt, T. M. ve Lanoie, J. S., 2004. Sequence analysis of the genome of the *Neodiprion sertifer* nucleopolyhedrovirus, Journal of Virology, 78, 7036–7051.
- Gencer, D., Bayramoglu, Z., Nalcacioglu, R., Kleespies, R. G., Demirbag, Z., ve Demir, I., 2018. Characterization of three alphabaculovirus isolates from the gypsy moth, *Lymantria dispar dispar* (Lepidoptera: Erebidae), in Turkey, Biocontrol Science and Technology, <https://doi.org/10.1080/09583157.2017.1420752>.
- Gencer, D., Bayramoglu, Z., Nalcacioglu, R., Demirbag, Z. ve Demir, I., 2020. Genome sequence analysis and organization of the *Hyphantria cunea* granulovirus (HycuGV-Hc1) from Turkey, Genomics, 112, 459–466.
- Gencer, D., Nalcacioglu, R., Demirbag, Z. ve Demir, I., 2018. Complete genome sequence analysis of the *Malacosoma neustria* nucleopolyhedrovirus from Turkey, Virus Genes, 54, 706-718.
- Georgheiou, G. P., 1986. The magnitude of the resistance problem, *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*, DC: Natl. Acad. Sci., Washington.
- Gettig, R. R. ve McCarthy, W. J., 1982. Genotypic variation among wild isolates of *Heliothis* spp. nuclear polyhedrosisviruses from different geographical regions, Virology, 117: 242–245.

- 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, Molecular Therapy, 6, 5–11.
- Gomez, M. R. ve Arroyo, M., 1981. Catalogo sistematico de los lepidopteros ibericos, Collection Monografias I.N.LA., 30, Cordoba, Spain.
- Gonnet, P. ve Devauchelle, G., 1987. Obtention par recombinaison dans le gene du polypeptide p10 d'un baculovirus experimentant le gene de resistance à la neomycine dans le celleles d' insecte, C.R. Acad. Sci., Paris.
- 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, Journal of General Virology, 73, 1491–1497.
- Gregory, B. G., Ignoffo, C. M. ve Shapiro, M., 1969. Nucleopolyhedrosis of *Heliothis*: Morphological descriptions of inclusion bodies and virions, Journal of Invertebrate Pathology, 14, 186–193.
- Grzywacz, D., Rabindra, R. J., Brown, M., Jones, K. A. J. ve Parnell, M., 2004. *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus Production Manual, Natural Resources Institute, 107.
- Gueli Alletti, G., 2018. Use of Next Generation Sequencing to Improve Identification and Quantification of Baculovirus Diversity, Doktora tezi, Darmstadt Teknik Üniversitesi, Darmstadt, Almanya.
- 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, Journal of Virology, 78, 6786–6791.
- Haase, S., Sciocco-Cap, A. ve Romanowski, V., 2015. Baculovirus insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives, Viruses, 7, 2230–67.
- Hajos, J. P., Pijnenburg, J., Usmany, M., Zuidema, D., Zavodszky, P. ve Vlak, J. M., 2000. High frequency recombination between homologous baculoviruses in cell culture, Archives of Virology, 145, 159–164.
- 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.
- Harrison, R. L. ve Bonning, B. C., 2003. Comparative analysis of the genomes of *Rachiplusia ou* and *Autographa californica* multiple nucleopolyhedroviruses, Journal of General Virology, 84, 1827–1842.

- Harrison R, ve Hoover K., 2012. Baculoviruses and other occluded insect viruses, Editörler: Vega, F. E., Kaya, H. K. Insect Pathology, Academic Press.
- 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.
- Haq, S. K., Atif, S. M. ve Khan, R. H., 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection, Archives of Biochemistry and Biophysics, 431, 145–159.
- 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.
- Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C. ve Toprak, U., 2009. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function, Annual Review of Entomology, 54, 285–302.
- Hekimoğlu, B. ve Altindeğer, M., 2006. Organik Tarım ve Bitki Koruma Açısından Organik Tarımda Kullanılacak Yöntemler, Tarım İl Müdürlüğü, Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şube Müdürlüğü, Samsun.
- 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, Journal of Virology, 75, 8117–8126.
- Herniou, E.A., Olszewski, J.A., Cory, J.S. ve O'Reilly, D.R., 2003. The genome sequence and evolution of baculoviruses, Annual Review of Entomology, 48, 211–234.
- Herniou, E.A., Olszewski, J.A., O'Reilly, D.R. ve Cory, J.S., 2004. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts, Journal of Virology, 78, 3244–3251.
- Herniou, E. A. ve Jehle, J. A., 2007. Baculovirus phylogeny and evolution, Current Drug Targets, 8, 1043–1050.
- Herniou, E. A., Arif, B. M., Becnel, J. J., Blissard, G. W., Bonning, B., Harrison, R., Jehle, J. A., Theilmann, D. ve Vlak, J. M., 2011, Baculoviridae, Editör: King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E. J. Virus Taxonomy, Elsevier, Oxford.
- Hilton, S. ve Winstanley, D., 2007. Identification and functional analysis of the origins of DNA replication in the *Cydia pomonella* granulovirus genome, Journal of General Virology, 88, 496–1504.
- Hofmann, C., Sandig, V., Jennings, G., Rudolph, M., Schlag, P. ve Strauss, M., 1995. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors, Proceedings of the National Academy of Sciences, 92, 10099–10103.

- Hu, Z. H., Arif, B. M. ve Jin, F., 1998. Distinct gene arrangement in the *Buzura suppressaria* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome, Journal of General Virology, 79, 2841–2851.
- Hu, Y.C., 2006. Baculovirus vectors for gene therapy, Advances in Virus Research, 68, 287–320.
- Hughes, P. R., Gettig, R. R. ve McCarthy, W. J., 1983. Comparison of the time mortality response of *Heliothis zea* to fourteen isolates of *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus, Journal of Invertebrate Pathology, 41, 256–261.
- Hughes, P. R., Van Beek, N. A. M., Wood, H. A., 1986. A modified droplet feeding method for rapid assay of *Bacillus thuringiensis* and baculoviruses in noctuid larvae, Journal of Invertebrate Pathology, 83, 187–192.
- Hunter Fujita, F. R., Entwistle, P. F., Evans H. F. ve Crook, N. E., 1998. Insect Viruses and Pest Management, Wiley Sons Chichester, İngiltere.
- Hyink, O., Dellow, R. A., Olsen, M. J., Caradoc-Davies, K. M. B., Drake, K., Herniou, E. A., Cory, J. S., O'Reilly, D. R. ve Ward, V. K., 2002. Whole genome analysis of the *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus, Journal of General Virology, 83, 957–971.
- Ibaraa, J. ve Castero, N., 2008. Insect viruses diversity, biology and user as bioinsecticides, Tropical biology and conservation management, 5, 1–10.
- Ibargutxi, M. A., Munoz, D., Bernal, A., Ruiz de Escudero, I. ve Caballero, P., 2008. Effects of stilbene optical brighteners on the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* and a single nucleopolyhedrovirus on *Helicoverpa armigera*, Biological Control, 47, 322–327.
- Ijkel, W. F. J., Van Strien, E. A., Heldens, J. G. M. Broer, R., Zuidema, D., Goldbach, R. W. ve Vlak, J. M., 1999. Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome, Journal of General Virology, 80, 3289–3304.
- 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. ve Hammock, B. D., 2006. Genetically Modified Baculoviruses: A Historical Overview and Future Outlook, Advances in Virus Research, 68, 323–360.
- Jackson, D. M., Lynn, D. E., Fuxa, J. R., Shepard, B. M. ve Shapiro, M., 2008. Efficacy of

entomopathogenic viruses on pickleworm larvae and cell lines, Journal of Agricultural and Urban Entomology, 25, 81–97.

- Jakubowska, A., Nalçacıoğlu, R., Millan-Leiva, A., Sanz-Carbonell, A., Muratoğlu, H., Herrero, S. ve Demirbağ, Z. 2015. In Search of Pathogens: Transcriptome-Based Identification of Viral Sequences from the Pine Processionary Moth (*Thaumetopoea pityocampa*), Viruses, 7, 456–479.
- Javed, M. A., Biswas, S., Willis, L. G., Harris, S., Pritchard, C., van Oers, M. M., Donly, B. C., Erlandson, M. A., Hegedus, D. D. ve Theilmann, D. A., 2017. Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus ac83 is a per os infectivity factor (PIF) protein required for occlusion-derived virus (ODV) and budded virus nucleocapsid assembly as well as assembly of the PIF complex in ODV envelopes, Journal of Virology, 91, e02115–02116.
- Jehle, J. A., Nickel, A., Vlak, J. M. ve Backhaus, H., 1998. Horizontal escape of the novel Tc1-like Lepidopteran transposon TCp3.2 into *Cydia pomonella* granulovirus, Journal of Molecular Evolution, 46, 215–224.
- Jehle, J. A., Lange, M., Wang, H., Hu, Z. ve Wang Hauschild, R., 2006. Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera, Virology, 346, 180–193.
- Jones, K. ve Burges, H., 1997. Product Stability: From experimental preparation to commercial reality, BCPC Symposium Proceedings, 68, 163–171.
- Joussen, N. ve Heckel, D. G., 2016. Resistance mechanisms of *Helicoverpa armigera*, Editörler, Horowitz, A. R. ve Ishaaya I., *Advances in insect control and in resistance management*, Springer.
- Kamiya, K., Zhu, J., Murata, M., Lavina-Caoili, B. A., Ikeda, M., Kobayashi, M. ve Kawamura, S., 2004. Cloning and comparative characterization of three distinct nucleopolyhedroviruses isolated from the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) in Japan, Biological Control, 31, 38–48.
- Kaya, M. ve Kovancı, B., 2000. Bursa İlinde Yeşilkurt, *Helicoverpa armigera* (Hüb.) (Lepidoptera: Noctuidae)'nın Biyolojisi Üzerinde Araştırmalar, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi, 10, 37–43.
- Kayci, L., 2009. Van gölü havzası bazı *Quadrişinae* grubu *Noctuidae* türlerinin fauna ve ekolojisi üzerine araştırmalar (Noctuidae, Lepidoptera), Doktora tezi, Yüzüncüyıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Khetan, S. K., 2001. Natural and recombinant viral insecticides, *Microbial Pest Control*, Marcel Dekker, New York.
- Khurad, A. M., Mahulikar, A., Rathod, M. K., Rai, M. M., Kanginakudru, S. ve Nagaraju, J., 2004. Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in the silkworm, *Bombyx mori* L., Journal of Invertebrate Pathology, 87, 8–15.

- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences, Journal of Molecular Evolution, 16, 111–120.
- 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, Journal of Biotechnology, 38, 243–251.
- Kitching, I. J. ve Rawlins, J. E., 1998. The Noctuoidea, Editör: Kristensen, N. P., Handbook of Zoology, Lepidoptera, Moths and Butterflies, W. de Gruyter, Berlin.
- Koçlu, T. ve Karsavuran, Y., 2000. Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)'nın Manisa ilinde biyolojisi ve popülasyon düzeyi, Türkiye Entomoloji Dergisi, 24, 179–194.
- Konuş, M., Karaağaç, S. ve İşcan, M., 2014. Real-time PCR analysis of pyrethroid resistance in Helicoverpa armigera from Turkey, Turkish Journal of Biochemistry, 39, 176–180.
- Krattiger, A. F., 1996. Insect resistance in crops: A case study of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) and its transfer to developing countries, The International Agricultural Service for the Acquisition of Agribiotech Applications (ISAAA).
- Krieg, A., Franz, J.M., Groner, A., Huber, J. ve Miltenburger, H.G., 1980. Safety of entomopathogenic viruses for control of insect pests, Environment Conservation, 7, 158–160.
- Krinski, D., ve Godoy, A.F., 2015. First record of Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) feeding on Plectranthus neochilus (Lamiales: Lamiaceae) in Brazil, Florida Entomologist, 98, 1238–40.
- Kukan, B., 1999. Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in insects, Journal of Invertebrate Pathology, 74, 103–111.
- Kumar, C. S., Ranga Rao, G. V., Sireesha, K. ve Kumar, P. L., 2011. Isolation and characterization of baculoviruses from three major lepidopteran pests in the semi-arid tropics of India, Indian Journal of Virology, 22, 29–36.
- Lagnaoui, A., Ben Salah, H. ve El-Bedewy, R., 1997. Integrated management to control potato tuber moth in North Africa and the Middle East, Circulation, 22, 10–15.
- Lange, M. ve Jehle, J.A., 2003. The genome of the Cryptophlebia leucotreta granulovirus, Virology, 317, 220–236.
- 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.

- Lasa, R., Ruiz-Portero, C., Alcazar, M. D., Belda, J. E., Caballero, P. ve Williams, T., 2007. Efficacy of optical brightener formulations of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) as a biological insecticide in greenhouses in southern Spain, Biological Control, 40, 89–96.
- Lasa, R., Williams, T., Caballero, P., 2008. Insecticidal properties and microbial contaminants in a *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (Baculoviridae) formulation stored at different temperatures, Journal of Economic Entomology, 101, 42–49.
- Lauzon, H. A. M., Lucarotti, C. J., Krell, P. J., Feng, Q., Retnakaran, A. ve Arif, B. M., 2004. Sequence and organization of the *Neodiprion lecontei* nucleopolyhedrovirus genome. Society, Journal of Virology, 78, 7023–7035.
- Lepore, L. S., Roelvink, P. R. ve Granados, R. R., 1996. Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease, Journal of Invertebrate Pathology, 68, 131–140.
- Liu, Z., Li, D., Gong, P. Y. ve Wu, K. J., 2004. Life table studies of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera, Noctuidae), on different host plants, Environmental Entomology, 33, 1570–1576.
- Luttrell, R. G. ve Jackson, R. E., 2012. *Helicoverpa zea* and Bt cotton in the United States, GM Crops, 3, 213–227.
- Luque, T., Finch, R., Crook, N., O'Reilly, D. R. ve Winstanley, D., 2001. The complete sequence of the *Cydia pomonella* granulovirus genome, Journal of General Virology, 82, 2531–2547.
- Mally, F. W. 1891. The bollworm in cotton, USDA. Bur. Entomol. Bull., 24, 48–50.
- 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. Applied Environmental Microbiology, 56, 2764–2770.
- Martinez, A. M., Simon, O., Williams, T. ve Caballero, P., 2003. Effect of optical brighteners on the insecticidal activity of a nucleopolyhedrovirus in three instars of *Spodoptera frugiperda*, Entomologia Experimentalis et Applicata, 109, 139–146.
- McClintock, J. T. ve Dougherty, E. M., 1988. Restriction mapping of *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus DNA: localization of the polyhedrin gene and identification of four homologous regions, Journal of General Virology, 69, 2303–2312.
- McIntosh, A. H. ve Ignoffo, C. M., 1983. Restriction endonuclease analysis patterns of three baculoviruses isolated from species of *Heliothis*, Journal of Invertebrate Pathology, 41, 27–32.

- McIntosh, A. H. ve Ignoffo, C. M., 1986. Restriction endonuclease cleavage patterns of commercial and serially passaged isolates of *Heliothis* baculovirus, Intervirology, 41, 27–32.
- McWilliam, A., 2007. Environmental Impact of Baculoviruses, FAO, Available online: http://www.fao.org/docs/eims/upload/agrotech/2003/R7299_FTR_anx3.pdf (erişim tarihi, 15 Kasım 2018).
- Meierrose, C., Araujo, J., Perkins, D., Mercadier, G., Poitout, S., Bues, R., Vargas Piqueras, P. ve Cabella, T., 1989. Distribution and Economic Importance of *Heliothis* spp. (Lep.: Noctuidae) and Their Natural Enemies and Host Plants in Western Europe, Editörler, King, E. G. ve Jackson R. D. Proceedings of the Workshop on Biological Control of *Heliothis*: Increasing the Effectiveness of Natural Enemies.
- Miele, S. A. B., Garavaglia, M. J., Belaich, M. N. ve Ghiringhelli, P. D., 2011. Baculovirus: Molecular insights on their diversity and conservation, International Journal of Evolutionary Biology, 1–15.
- Milks, L. C., 1997. Comparative biology and susceptibility of cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae) lines to a nuclear polyhedrosis virus, Environmental Entomology, 26, 839–848.
- Miller, L. K., 1996. Insect viruses, Editör: Fields, B. N., Knipe, D. M., ve Howley P. M., Field virology, Third edition, Raven Publisher, Philadelphia.
- Miller, L. K., Kaiser, W. J. ve Seshagiri, S., 1998. Baculovirus regulation of apoptosis, Seminars in Virology, 8, 445–452.
- Miller, L. K. ve Dawes, K. P., 1978a. Restriction endonuclease analysis for identification of baculovirus pesticides, Applied Environmental Microbiology, 35, 411–421.
- Miller, L. K. ve Dawes, K. P., 1978b. Restriction endonuclease analysis of two closely related nuclear polyhedrosis viruses: *Autographa californica* MNPV and *Trichoplusia ni* MNPV, Applied Environmental Entomology, 35, 1206–1210.
- Mironidis, G. K., Stamopoulos, D. C. ve Savopoulou-Soultani, M., 2010. Overwintering survival and spring emergence of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Northern Greece, Environmental Entomology, 39, 1068–1084.
- Mol, T., 1976. Marmara ve Ege Bölgesi'nde Tespit edilen bazı Noctuidae (Lepidoptera) Türleri, İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 26, 156–175.
- Monteiro, T., 1959. *Heliothis nubigera*. Broteria, 18, 113.
- Monroe, J. E. ve McCarthy, W. J., 1984. Polypeptide analysis of genotypic variants of occluded *Heliothis* spp. baculoviruses, Journal of Invertebrate Pathology, 43, 32–40.

- Moore, S. D., 2015. The future of microbial pesticides: fantasy or reality?, Proceedings of the Joint 19th ESSA and 37th ZSSA Congress, Grahamstown, South Africa.
- Moscardi, F., 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera, Annual Review of Entomology, 44, 257–289.
- 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.
- Moser, B., Becnel, J., White, S., Afonso, C., Kutish, G., Shanker, S., ve Almira, E., 2001. Morphological and molecular evidence that *Culex nigripalpus* baculovirus is an unusual member of the family Baculoviridae, Journal of General Virology, 82, 283–297.
- Mukawa, S., Nakai, M., Okuno, S., Takatsuka, J. ve Kunimi, Y., 2003. Nucleopolyhedrovirus enhancement by a fluorescent brightener in *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae), Applied Entomology and Zoology, 38, 87–96.
- Mulimani, V., Kulkarni, K. A. ve Basavangoud, K., 2004. Evaluation of Certain Adjuvants as UV-Protectants of Granulosis Virus of *Achaea janata* Linn. Karnataka, Journal of Agricultural Science, 17, 479–481.
- Munoz, D., Murillo, R., Krell, P. J., Vlak, J. M. ve Caballero, P., 1999. Four genotypic variants of a *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (Se-SP2) are distinguishable by a hypervariable genomic region, Virus Research, 59, 61–74.
- Nakai, M. ve Kunimi, Y., 1997. Granulosis virus infection of the smaller tea tortrix (Lepidoptera: Tortricidae): Effect on the development of the endoparasitoid, *Ascogaster reticulatus* (Hymenoptera: Braconidae), Biological Control, 8, 74–80.
- Nakai, M., Goto, C., Kang, W., Shikata, M., Luque, T. ve Kunimi, Y., 2003. Genome sequence and organization of a nucleopolyhedrovirus isolated from the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai*, Virology, 316, 171–183.
- Narendrakumar, G., Dey, R., Godavarthi, S. S. ve Preethi, T. V., 2017. Effect of Baculovirus with adjuvants against *Helicoverpa armigera* (HBN) on Cotton and evaluation of its effect in Different Instar, Research Journal of Pharmacy and Technology, 10, 1–3.
- Nguyen, Q., Qi, Y.M., Wu, Y., Chan, L.C.L., Nielsen, L.K. ve Reid, S., 2011. In vitro production of *Helicoverpa* baculovirus biopesticides - Automated selection of insect cell clones for manufacturing and systems biology studies, Journal of Virological Methods, 175, 197–205.
- Nie, Y., Fang, M., Erlandson, M. A. ve Theilmann, D. A., 2012. Analysis of the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus overlapping gene pair *lef3* and *ac68* reveals that AC68 is a *per os* infectivity factor and that LEF3 is critical, but not essential, for virus replication, Journal of Virology, 86, 3985–3994.

- Noune, C. ve Hauxwell, C., 2015. Complete genome sequences of *Helicoverpa armigera* single nucleopolyhedrovirus strains AC53 and H25EA1 from Australia, Genome Announcements, 3, e01083–15.
- Noune, C. ve Hauxwell, C., 2016. Comparative analysis of HaSNPV-AC53 and derived strains, Viruses, 8, 280–297.
- Oerke, E. C., 2006. Crop losses to pests, Journal of Agricultural Science, 144, 31–43.
- Ogembo, J. G., Caoili, B. L., Shikata, M., Chaeychomsri, S., Kobayashi, M. ve Ikeda, M., 2009. Comparative genomic sequence analysis of novel *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (NPV) isolated from Kenya and three other previously sequenced *Helicoverpa* spp. NPVs, Virus Genes, 39, 261–272.
- Okuno S, Takatsuka J, Nakai M, Ototake S, Masui A and Kunimi Y 2003 Viral enhancing activity of various stilbene-derived brighteners for a *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus, Biological Control, 26, 146–152.
- O'Reilly, D. R., Miller, L. K. ve Luckow, V.A., 1992. Baculovirus Expression Vectors, Laboratory Manual, Oxford University Press, New York.
- Öngören, K., Kaya, N. ve Türkmen, Ş., 1977. Ege bölgesinde domateslerde zarar yapan Yeşilkurt (*Heliothis armigera* Hüb.)'un morfolojisi, biyoekolojisi ve mücadelesi üzerinde araştırmalar, Bitki Koruma Bülteni, 17, 3.
- Parsons, F. S., 1936. Progress report of experimental stations, Empire Cotton Growing Corp. Rep. Barberton, Güney Afrika, 2, 24–31.
- Pearson, M. N. ve Rohrmann, G. F., 1995. *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus homologous regions: Characterization of their ability to function as replication origins, Journal of Virology, 69, 213–221.
- Possee, R. D., 1997. Baculoviruses as expression vectors, Current Opinion in Biotechnology, 8, 569–572.
- Prabhu, S. ve Mahalingam, C. A., 2017 Effect of Sunlight and UV Light against DpNPV (Nuclear Polyhedrosis Virus) Formulation on Larval Mortality of Mulberry Leaf Webber, *Diaphania pulverulentalis* Hampson, International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6, 1897–1905.
- Raghavendra, A. T., Jalali, S. K., Ojha, R., Shivalingaswamy, T. M. ve Bhatnagar, R., 2017. Whole genome sequence and comparative genomic sequence analysis of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (HearNPV-L1) isolated from India, Virus Disease, 28, 61–68.
- Raty, J. K., Lesch, H. P., Wirth, T., Yla-Herttuala, S., 2008. Improving safety of gene therapy, Current Drug Safety, 3, 46–53.

- Reddy, T. ve Sannaveerappanava, V., 2011. Bio-efficiency of commercial neem products and HaNPV against bollworms of cotton, International Journal of Farm Sciences, 1, 105–110.
- Rios-Velasco, C., Gallegos-Morales, G., Berlanga-Reyes, D., Cambero-Campos, J. ve Romo-Chacon, A., 2012. Mortality and Production of Occlusion Bodies in *Spodoptera frugiperda* Larvae (Lepidoptera: Noctuidae) Treated with Nucleopolyhedrovirus, Florida Entomologist, 95, 752–757.
- Rohrmann, G.F., 2011. Baculovirus Molecular Biology, 2nd edition, National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda, MD, USA.
- Rohrmann, G. F., 2013. Baculovirus Molecular Biology: Third Edition (Internet). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114593/> (erişim tarihi 15 Kasım 2018).
- Rowley, D. L., Popham, H. J. ve Harrison, R. L., 2011. Genetic variation and virulence of nucleopolyhedroviruses isolated worldwide from the heliothine pests *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, and *Heliothis virescens*, Journal of Invertebrate Pathology, 107, 112–126.
- Santos, E. R., Oliveira, L. B., Peterson, L., Sosa-Gómez, D. R., Ribeiro, B. M., Ardisson-Araújo, D. M. P., 2018. The complete genome sequence of the first hesperiid-infecting alphabaculovirus isolated from the leguminous pest *Urbanus proteus* (Lepidoptera: HesperIIDae), Virus Research, 249, 76–84.
- Seaman, D., 1990. Trends in the formulation of pesticides- an overview, Pesticide Science, 29, 437–449.
- Shapiro, M., El Salamouny, S. A., Jackson, D. M. ve Shepard, B. M., 2012. Field evaluation of a kudzu/cottonseed oil formulation on the persistence of the beet armyworm nucleopolyhedrovirus, Journal of Entomological Science, 47, 197–207.
- Simon, O., Williams, T., Lopez-Ferber, M. ve Caballero, P., 2004. Genetic structure of a *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus population: High prevalence of deletion genotypes, Applied Environmental Microbiology, 70, 5579–5588.
- Sireesha, K., Kumar, C. S., Ranga-Rao, G. V., Arjona Rao, P. ve Kumar, P. L., 2010. Effect of different storage conditions on the virulence of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (HaNPV), Journal of the Entomological Research Society, 34, 65–69.
- Sivakumar, S., Rajagopal, R., Venkatesh, G. R., Srivastava, A. ve Bhatnagar, R. K., 2007. Knockdown of aminopeptidase-N from *Helicoverpa armigera* larvae and in transfected Sf21 cells by RNA interference reveals its functional interaction with *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein Cry1Ac, The Journal of Biological Chemistry, 282, 7312–7319.

- Slack, J. ve Arif, B. M., 2006. The Baculoviruses Occlusion-Derived Virus: Virion Structure and Function, Advances in Virus Research, 99–165.
- Smith, D. B. ve Summers, M. D., 1978. Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases, Virology, 89, 517–527.
- Smith, K. M. ve Rivers, C. F., 1956. Some viruses affecting insects of economic importance, Parasitology, 46, 235–242.
- Smith, G.E., Vlak, J.M. ve Summers, M.D., 1983a. Physical analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus transcripts for polyhedrin and 10.000-molecular-weight protein, Journal of Virology, 45, 215–225.
- Smith, G.E., Summers, M.D. ve Fraser, M.J., 1983b. Production of human β -interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector, Molecular and Cellular Biology, 3, 2156–2165.
- Sparks, W. O., Harrison, R. L. ve Bonning, B. C., 2011. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ODV-E56 is a *per os* infectivity factor, but is not essential for binding and fusion of occlusion-derived virus to the host midgut, Virology, 409, 69–76.
- Stahler, N. 1939. A disease of the corn earworm, *Heliothis obsoleta* (F.), Journal of Economic Entomology, 41, 107–160.
- Steinhaus, E. A., 1960. Notes on the polyhedrosis of *Peridroma*, *Prodenia*, *Co lias*, *Heliothis* and other Lepidoptera, Journal of Insect Pathology, 2, 327–329.
- Steinke, W. E. ve Giles, D. K., 1995. Delivery systems for biorational agents, *Biorational Pest Control Agents: Formulation and Delivery*, Editörler: Hall, F.R., Barry, J.W., American Chemical Society Symposium Series 595, American Chemical Society: Washington, DC, USA.
- Stiles, S. ve Himmerich, B., 1998. *Autographa californica* NPV isolates: restriction endonuclease analysis and comparative biological activity, Journal of Invertebrate Pathology, 72, 174–177.
- Summers, M.D., 2006. Milestones leading to the genetic engineering of baculoviruses as expression vector system and viral pesticides, Advances in Virus Research, 68, 3–73.
- Sun, X., 2015. History and current status of development and use of viral insecticides in China, Viruses, 7, 306–19.
- Sweetman, H. L., 1936. *The Biological Control of Insects*, Comstock Pub. Co., Ithaca, New York.

- Szewczyk, B., de Souza, M. L., de Castro, M. E. B., Moscardi, M. L. ve Moscardi, F., 2011. Baculovirus biopesticides, Editör: Stoytcheva, M. InTech Publishing, Rijeka, Croatia.
- Tamez-Guerra, P., McGuire, M. R., Behla, R.W., Shasha, B. S. ve Galan-Wong, L. J. 2000b. Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*, Journal of Economic Entomology, 93, 219–225.
- Tamez-Guerra, P., McGuire, M. R., Behle, R. W., Shasha, B. S., Pingel, R. L., 2002. Storage stability of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus in spray-dried formulations, Journal of Invertebrate Pathology, 79, 7–16.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, N. ve Kumar, S., 2007. MEGA4: Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) Software Version 4.0., Molecular Biology and Evolution, 24, 1596–1599.
- Tanada, Y., 1959. Synergism between two viruses of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera: Noctuidae), Journal of Invertebrate Pathology, 1, 215–231.
- Tang, P., Zhang, H., Li, Y. N., Han, B., Wang, G. Z., Qin, Q. L. ve Zhang, Z. F., 2012. Genomic sequencing and analyses of HearMNPV-a new multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus isolated from *Helicoverpa armigera*, Virology Journal, 9, 168.
- Taraş, G., 2012. Edirne Noctuidae (Lepidoptera) Faunasının Aylık ve Mevsimsel Değişimi, Yüksek lisans tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Tatchell, G. M., 1997. Microbial insecticides and IPM: Current and future opportunities for the use of biopesticides, Editör: Evans, H.F., *Microbial Insecticides: Novelty or Necessity?*, British Crop Protection Council, Farnham.
- Tezcan, F., Sever, Y., Aycan, T., Tuzcu, B., Tezcan, S. ve Okyar, Z., 2010. Denizli'deki Kültür Kekliği (*Origanum* spp.) (Lamiaceae) Üretim Alanlarında Çukur Tuzaklarla Yakalanan Lepidoptera Türleri, Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi, 3, 39–41.
- Thakore, Y., 2006. The biopesticide market for global agricultural use, Industrial Biotechnology, 2, 194–208.
- Theilmann, D. A. ve Stewart, S. 1992. Analysis of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus trans-activators IE-1 and IE-2 using monoclonal antibodies, Journal of General Virology, 74, 1819–18126.
- Theze, J., Bezier, A., Periquet, G., Drezen, J.-M. ve Herniou, E.A., 2011. Paleozoic origin of insect large dsDNA viruses, Proceedings of the National Academy of Sciences, 108, 15931–15935.
- Thiem, S.M. ve Miller, L.K., 1990. Differential gene expression mediated by late, very late and hybrid baculovirus promoters, Gene, 91, 87-94.

- Tiftikçi, P. ve Kornoşor, S., 2015. Çanakkale’de Mısırdaki Zararlı Lepidoptera Türleri, Dağılımları ve Yayılışları Üzerinde Araştırmalar, COMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 3, 107– 118.
- Toprak, U., Bayram, S. ve Gurkan, O. M., 2006. Comparative biological activities of a plaque-purified variant and a Turkish native isolate of SpliNPV-B against *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae), Pest Management Science, 62, 57– 63.
- Tramper, J., deGooijer, C. D. ve Vlak, J. M., 1993. Scale-up considerations and bioreactor development for animal cell cultivation., Editörler: Goossen, M. F. A., Daugulis, A. J. ve Faulkner, P., Insect cell culture engineering, Marcel Dekker, New York.
- Tunç, İ., 1988. Bahçe Bitkileri Zararlıları, Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Ders Notları, Antalya.
- Uygun, N., Ulusoy, M. R. ve Başpınar, H., 1998. Sebze Zararlıları, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Adana.
- Uygun, N., Ulusoy, M.R. ve Satar, S., 2010. Biyolojik mücadele, Türkiye Biyolojik Mücadele dergisi, 1, 1–14.
- Ünlü, L., 1996. Şanlıurfa ilinin Noctuidae (Lepidoptera) türlerinin saptanması ve sistematik özelliklerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Van Beek, N. ve Davis, D., 2016. Baculovirus insecticide production in insect larvae, Methods in Molecular Biology, 1350, 393–405.
- Van Oers, M. M., Abma-Henkens, M. H. C., Herniou, E. A., de Groot, J. C. W., Peters, S. ve Vlak, J. M., 2005. Genome sequence of Chrysochloris chalcites nucleopolyhedrovirus, a baculovirus with two DNA photolyase genes, Journal of General Virology, 86, 2069–2080.
- Vargas, P. ve Cabello, T., 1985. A new species of Trichogramma (*T. cordubensis*, n. sp.) [Hym. Trichogrammatidae] parasitoid of Heliothis eggs in cotton crop in the South West of Spain, Entomophaga, 30, 225–230.
- Vincent, C., Andermatt, M. ve Valero, 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, CAB International, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Vlak, J.M. ve Smith, G.E., 1982. Orientation of the genome of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: a proposal, Journal of Virology, 41, 1118–1121.
- Volkman, L. E., Blissard, G. W., Friesen, P. D., Keddie, B. A., Possee, R. D. ve Theilmann, D. A., 1995, Family Baculoviridae, Editörler: Murphy, F. A., Fauquet,

- C. M., Bishop, A., Ghabrial, A. W., Jarvis, G. P., Martelli, M. A., Mayo, M. A., Summers, M. D., Virus taxonomy: Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Springer, Vienna.
- Volkman, L. E., 1997. Nucleopolyhedrovirus interactions with their insect hosts, Advances in Virus Research, 48, 313–348.
- Wang, M., Wang, J., Yin, F., Tan, Y., Deng, F., Chen, X., Jehle, J. A., Vlak, J. M., Hu, Z. ve Wang, H., 2014. Unraveling the Entry Mechanism of Baculoviruses and Its Evolutionary Implications, Journal of Virology, 88, 2301–2311.
- Wang, Y., Bininda-Emonds, O. R. P., Oers, M. M., Vlak, J. M. ve Jehle, J. A., 2011. The genome of *Oryctes rhinoceros* nudivirus provides novel insight into the evolution of nuclear arthropod-specific large circular double-stranded DNA viruses, Virus Genes, 42, 444–456.
- Wang, Y. ve Jehle, J. A., 2009. Nudiviruses and other large, double-stranded circular DNA viruses of invertebrates: New insights on an old topic, Journal of Invertebrate Pathology, 101, 187–193.
- Wang, Q., Bosch, B. J., Vlak, J. M., van Oers, M. M., Rottier, P. J. ve van Lent, J. W. M., 2016. Budded baculovirus particle structure revisited, Journal of Invertebrate Pathology, 134, 15–22.
- 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*, Journal of Virology, 77, 280–290.
- Washburn, J. O., Lyons, E. H., Haas-Stapleton, E. J. ve Volkman, L. E., 1999. Multiple nucleocapsid packaging of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus accelerates the onset of systemic infection in *Trichoplusia ni*, Journal of Virology, 73, 411–416.
- Wennmann, J. T., 2014. Diversity of Baculovirus Isolated from Cutworms (*Agrotis* spp.). Fachbereich Biologie Vol. Doctor rerum naturalium, Johannes Gutenberg-University, Mainz.
- Wennmann, J. T., Keilwagen, J. ve Jehle J. A., 2018. Baculovirus Kimura two-parameter species demarcation criterion is confirmed by the distances of 38 core gene nucleotide sequences, Journal of General Virology, 99, 1307–1320.
- Williams, C. F. ve Payne, C. C., 1984. The susceptibility of *Heliothis armigera* larvae to three nuclear polyhedrosis viruses, Annals of Applied Biology, 104, 405–412.
- Williams, H. L., Monge-Monge, K. S., Otvos, I. S., Reardon, R. ve Ragenovich, I., 2011. Genotypic variation among Douglas-fir tussock moth nucleopolyhedrovirus (OpNPV) isolates in the western United States, Journal of Invertebrate Pathology, 108, 13–21.

- Willis, L. G., Seipp, R., Stewart, T. M., Erlandson, M. A. ve Theilmann, D. A., 2005. Sequence analysis of the complete genome of *Trichoplusia ni* single nucleopolyhedrovirus and the identification of a baculoviral photolyase gene, *Virology*, 338, 209–226.
- Wolfenbarger, D. A., Bodegas, P. R. ve Flores, R., 1981. Development of resistance in *Heliothis* spp. in the Americas, Australia, Africa, and Asia, *Bulletin of the Entomological Society of America*, 27, 181–185.
- Woo, S., Choi, J. Y., Je, Y. H. ve Jin, B. R., 2006. Characterization of the *Helicoverpa assulta* nucleopolyhedrovirus genome and sequence analysis of the polyhedrin gene region, *Journal of Bioscience*, 31, 329–338.
- Wormleaton, S., Kuzio, J. ve Winstanley, D., 2003. The complete sequence of the *Adoxophyes orana* granulovirus genome, *Virology*, 311, 350–365.
- Yabaş, M. N., 1979. Çukurova Bölgesinde *Helicoverpa* cinsine giren *armigera* ve *zea* gruplarının biyoekojileri, Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Yang, M. M., Li, M. L., Zhang, Y. A., Whang, Y. Z., Qu, L. J., Wang, Q. H. ve Ding, J. Y., 2012. Baculoviruses and insect pests control in China, *African Journal of Microbiology Research*, 6, 214–218.
- Yang, Y., Li, Y., Wu, Y., 2013. Current status of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* after 15 Years of *Bt* cotton planting in China, *Journal of Economic Entomology*, 106, 375–381.
- Yassin Ali, M. M., 2013. Yumurta-larva parazitoiti *Chelonus oculator* Panzer (Hymenoptera: Braconidae) ile *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) arasında bazı biyolojik ilişkiler üzerinde çalışmalar, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Yaşarakıncı, N. ve Kornoşor, S., 1990. Güneydoğu Anadolu Bölgesinde Nohut ve Mercimekte Zarar Yapan *Heliothis virescens* (Huff.) (Lep.: Noctuidae)'nın Doğal Düşmanları ve Parazitoitlerinin Etkinlikleri Üzerinde Araştırmalar, Türkiye II. Biyolojik Mücadele Kongresi, Ankara.
- Zanotto, P. M., Kessing, B. D., ve Maruniak, J. E., 1993. Phylogenetic Interrelationships among Baculoviruses: Evolutionary Rates and Host Associations, *Journal of Invertebrate Pathology*, 62, 147–164.
- Zemskov, E. A., Kang, W. ve Maeda, S., 2000. Evidence for Nucleic Acid Binding Ability and Nucleosome Association of *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus BRO Proteins, *Journal of Virology*, 74, 6784–6789.
- Zhang, C. X., Ma, X. C., Guo, Z. J., 2005. Comparison of the Complete Genome Sequence between C1 and G4 Isolates of the *Helicoverpa armigera* Single Nucleocapsid Nucleopolyhedrovirus, *Virology*, 333, 190–199.

Zhang, H., Yang, Q., Qin, Q. L., Zhu, W., Zhang, Z. F., Li, Y. N., Zhang, N. ve Zhang, J. H., 2014. Genomic sequence analysis of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus isolated from Australia, Archives of Virology, 159, 595–601.

Zhu, S., Wang, W., Wang, Y., Yuan, M. ve Yang, K., 2013. The baculovirus core gene ac83 is required for nucleocapsid assembly and per os infectivity of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus, Journal of Virology, 87, 10573–10586.

URL 1, <http://www.agroziraat.com>. 05.01.2020.



ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Mersin’de doğdu. İlköğrenimini Devlet Su İşleri İlköğretim Okulu ve Gazi İlköğretim Okulunda, liseyi Şehit Temel Cingöz Lisesinde tamamlamıştır. 2006 yılında Niğde Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başlamış ve bu öğrenimini 2010 yılının Haziran ayında bitirmiştir. Aynı yılın Eylül ayında başladığı Niğde Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalındaki yüksek lisans eğitimini, 2012 yılında tamamlamıştır. 2014 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak başladığı Doktora eğitimine halen devam etmektedir. Mikrobiyoloji alanında moleküler viroloji çalışmalarını sürdürmektedir. Yabancı dili İngilizce’dir.

Yayınları,

- Eroglu, G.B.**, Inan, C., Nalcacioglu, R. ve Demirbag, Z. 2020. Genome sequence analysis of a *Helicoverpa armigera* single nucleopolyhedrovirus (HearNPV-TR) isolated from *Heliothis peltigera* in Turkey. *PLOS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194158>.
- Eroglu, G.B.**, Nalcacioglu, R., Nakai, M. ve Demirbag, Z. 2019. A New Single Nucleopolyhedrovirus Isolate from Cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae): Detection, Characterization and Virulence, *Acta Virologica*, (baskıda).
- Eroglu, G.B.**, Nalcacioglu, R. ve Demirbag, Z. 2019. A new *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus isolate from *Heliothis peltigera* (Denis & Schiffermuller) (Lepidoptera: Noctuidae) in Turkey, *Turkish Journal of Biology*, 43, 340–348.
- Eroglu, G.B.**, Demir, I. ve Demirbag, Z. 2018. A novel alphabaculovirus isolated from the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae): Characterization and pathogenicity, *Biologia*, 73, 545–551.
- Elcin, G.B.** ve Bagriacik, N. 2015. A study on Turkish Scoliidae (Hymenoptera), *Entomofauna*, 36, 49–52.
- Elcin, G.B.**, Bagriacik, N. ve Bartalucci, M.B. 2013. New Myzinin wasps from Turkey (Hymenoptera Tiphidae), *Linzer biologische Beiträge*, 45, 2155–2163.