

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MALACOSOMA NEUSTRIA (LEPIDOPTERA: LASIOCAMPIDAE)'DAN VİRUS
İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE MİKROBİYAL MÜCADELEDE
KULLANILMA POTANSİYELİ

139236

Mustafa YAMAN

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

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 27.12.2002

Tezin Savunma Tarihi : 24.02.2003

139236

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mahmut EROĞLU

Jüri Üyesi : Doç.Dr. Ali Osman BELDÜZ

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Sabire KARAÇALI

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Yusuf AYVAZ

Trabzon 2003

TE. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOĞUMANTASYON MERKEZİ

ÖNSÖZ

“Malacosoma neustria (Lepidoptera:Lasiocampidae)’dan Virus İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Mikrobiyal Mücadelede Kullanılma Potansiyeli” adlı bu tez, mikrobiyal mücadelede kullanılmak amacıyla ülkemizde yeni patojenik virusların araştırılması yönünde yapılan ilk çalışma olup, bu çalışmanın bu alanda çalışacak yeni bilim adamlarına bir temel teşkil edeceğini ümit ediyorum.

Tez süresince doktora tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi, gerekse çalışmaların yürütülmesi sırasında ilgisini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, tezin geliştirilmesinde yardımcı olan tez izleme jüri üyelerimden sayın Prof. Dr. Mahmut EROĞLU’na ve sayın Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e, bu tezin temel böcek patolojisi bölümü için Polonya’nın Poznan şehrindeki Bitki Koruma Enstitüsü, Biyolojik Mücadele ve Karantina Bölümünde laboratuvar imkanlarını sağlayan sayın Prof. Dr. Jerzy J. LIPA’ya, elektron mikroskobu çalışmaları için Almanya’nın Berlin şehrinde, Berlin Üniversitesi, Biyoloji Enstitüsünde laboratuvar ortamını sağlayan sayın Prof. Dr. Klaus HAUSMANN ve sayın Dr. Renate RADEK’e, tezdeki moleküler çalışmaların bir kısmı için Almanya’nın Neustadt şehrinde, Biyoteknolojik Bitki Koruma Bölümünde gerekli laboratuvar imkanlarını sağlayan Dr. Johannes JEHLE’ye, KTÜ Araştırma Fonuna (Proje no: 99.111.004.3), Devlet Planlama Teşkilatı’na (Proje no: 21.111.004.1) ve tez süresince her türlü fedakarlıkta bulunan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Mustafa YAMAN

Şubat 2003, TRABZON

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	VI
SUMMARY.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
SEMBOLLER DİZİNİ.....	X
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. <i>Malacosoma neustria</i> (Lepidoptera:Lasiocampidae).....	2
1.2.1. Tanımı ve Yaşayışı.....	2
1.2.2. Zarar Şekli, Ekonomik Önemi ve Yayılışı.....	5
1.2.3. Doğal Düşmanları ve Mevcut Mücadele Yöntemleri.....	5
1.3. Zararlı Böceklerle Mücadele Yöntemleri.....	5
1.3.1. Kimyasal Mücadele ve Yan Etkileri	6
1.3.1.1. İnsektisitlerin Böcekler Üzerine Etkileri.....	7
1.3.1.2. İnsektisitlerin İnsanlar Üzerine Etkileri.....	7
1.3.1.3. İnsektisitlerin Çevreye Olan Etkileri.....	8
1.3.2. Biyolojik Mücadele.....	9
1.3.2.1. Biyolojik Mücadelede Virusların Kullanımı.....	10
1.3.3. Baculovirusların Biyolojisi.....	16
1.3.4. Baculovirusların Biyoteknolojik Önemi.....	18
1.3.4.1. Baculovirusların Zirai Mücadelede Kullanımı.....	18
1.3.4.2. Baculovirusların Ekspresyon Vektörü Olarak Biyoteknolojide Kullanımı.....	19
1.4. Tezin Amacı.....	20
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	21
2.1. Böceklerin Toplanması.....	21
2.2. Makroskobik Olarak Virus İnfeksiyonunun Belirlenmesi.....	21

2.3. Mikroskopik Olarak Virus İnfeksiyonunun Belirlenmesi.....	24
2.3.1. Işık Mikroskobu ile Yapılan Çalışmalar.....	24
2.3.1.1. Pochil'in Metodu ile Polihedraların Boyanması.....	25
2.3.1.2. Shvetsova'nın Metodu ile Polihedraların Boyanması.....	25
2.3.1.3. Buffalo Black 12B ile Polihedraların Boyanması.....	25
2.3.1.4. Giemsa Boyası ile Polihedraların Boyanması.....	25
2.3.2. <i>Malacosoma neustria</i> nükleopolihedrovirus (ManeMNPV)'unun Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	26
2.3.3. Elektron Mikroskobu ile Yapılan Çalışmalar.....	26
2.3.3.1. <i>Malacosoma neustria</i> nükleopolihedrovirus'a ait PIB'lerin Taramalı Elektron Mikroskobu ile İncelenmesi.....	27
2.3.3.2. <i>Malacosoma neustria</i> nükleopolihedrovirus'e ait PIB'lerin Transmisyon Elektron Mikroskobu ile İncelenmesi.....	27
2.4. Moleküler Yöntemler ile ManeMNPV'nün Belirlenmesi.....	27
2.4.1. İnfekte Olmuş Böceklerden Polihedral İnküzyon Yapılarının (PIB) Saflaştırılması.....	28
2.4.2. Virionların Elde Edilmesi.....	28
2.4.3. Viral DNA'nın Elde Edilmesi.....	28
2.4.4. DNA-DNA Hibridizasyon ile NPV'lerin Belirlenmesi.....	29
2.4.4.1. Hibridizasyonda Kullanılacak Probların Elde Edilmesi.....	29
2.4.4.2. Probların İşaretlenmesi.....	29
2.4.4.3. Hibridizasyon Yöntemi.....	30
2.4.5. Viral DNA'ların Restriksiyon Endonükleaz Analizi.....	30
2.4.5.1. DNA Fragmentlerinin Agaroz Jel Elektroforezi.....	30
2.4.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile NPV'lerin Belirlenmesi.....	31
2.4.7. ManeMNPV Virusuna Ait Polihedrin Geninin Sekans Analizi.....	31
2.5. ManeMNPV'nin İnfeksiyon Özelliğinin Belirlenmesi.....	32
2.6. ManeMNPV'nin Histopatolojisinin İncelenmesi.....	32
2.7. ManeMNPV'nin Konak Hassasiyetinin Belirlenmesi.....	32
2.8. ManeMNPV'nin Optimum İnfeksiyon Sıcaklığının Belirlenmesi.....	33
2.9. ManeMNPV'nin Vertikal İnfeksiyonunun Belirlenmesi.....	33
2.10. ManeMNPV'nin Horizontal İnfeksiyonunun Belirlenmesi.....	34
3. BULGULAR.....	35

3.1. <i>Malacosoma neustria</i> 'da Viral İnfeksiyonun Belirlenmesi.....	35
3.1.1. Viral İnfeksiyonun Makroskopik Görünümü.....	35
3.1.2. Viral İnfeksiyonun Mikroskopik Olarak Belirlenmesi.....	36
3.1.2.1. Işık Mikroskobu ile Viral İnfeksiyonun Belirlenmesi.....	36
3.1.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile ManeMNPV'nin İncelenmesi.....	39
3.1.2.3. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile ManeMNPV'nin İncelenmesi.....	39
3.2. Moleküler Yöntemler ile ManeMNPV'nün Belirlenmesi.....	41
3.2.1. DNA-DNA Hibridizasyon ile NPV'lerin Belirlenmesi.....	41
3.2.2. Viral DNA'ların Restriksiyon Endonükleaz Analizi.....	42
3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile NPV'lerin Belirlenmesi.....	46
3.2.4. ManeMNPV Virüsüne Ait Polihedrin Geninin Sekansı.....	46
3.3. ManeMNPV'nün Morfolojik Özellikleri.....	47
3.4. ManeMNPV'nün Taşınımı.....	48
3.4.1. ManeMNPV'nin Vertikal İnfeksiyonu.....	48
3.4.2. <i>Malacosoma neustria</i> Populasyonda ManeMNPV'nin Horizontal İnfeksiyonu.....	49
3.5. ManeMNPV'nin İnfeksiyon Özelliği.....	51
3.6. ManeMNPV'nin Histopatolojisi.....	51
3.7. ManeMNPV'nin Konak Hassasiyeti.....	53
3.8. ManeMNPV'nin Optimum İnfeksiyon Sıcaklığı.....	54
4. İRDELEME.....	56
5. SONUÇLAR.....	64
6. ÖNERİLER.....	65
7. KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ.....	73

ÖZET

Malacosoma neustria (Lepidoptera; Lasiocampidae) önemli tarımsal zararlılardan biridir. Bu zararlı ile mücadelede kullanılan kimyasal insektisitlerin çevre üzerinde zararlı etkileri bulunmaktadır. Kimyasal ilaçların yan etkilerinin keşfedilmesi, bilim adamlarını daha etkili ve daha güvenli bir mücadele yöntemi geliştirmeye sevk etmiştir. Bu tezde, *Malacosoma neustria*'da patojenik olan bir virusun morfolojik, ultrastrüktürel, moleküler karakterizasyonu ve biyolojik mücadelede kullanılmak üzere konak hassasiyeti ve taşınımı çalışıldı.

Viral infeksiyon Gümüşhane-Köse yöresinden toplanan *M. neustria* larvalarında tespit edildi. Yapılan morfolojik, ultrastrüktürel, ve moleküler çalışmalar sonucunda tespit edilen virusun Baculoviridae familyasından bir nükleopolihedrovirus olduğu belirlendi. Virusa ait PIB yapılarının $1,64 \pm 0,52 \mu\text{m}$ çapında olduğu belirlendi. Polihedraların enine kesitinde her bir virionun 1 ile 18 adet arasında değişen sayılarda nükleokapsid içerdiği gözlemlendi. Bu nükleokapsidlerin $240 \times 35 \text{ nm}$ boyutlarında olduğu tespit edildi. Virus DNA'sının *EcoRI*, *BamHI* ve *HindIII* restriksiyon enzim analizleri, bu çalışmada tespit edilen virusun daha önce izole edilen ManeMNPV'lerden farklı bir restriksiyon enzim profiline sahip olduğunu ortaya çıkardı. Polihedrin geni sekans analizleri sonucunda diğer ManeMNPV orijinli polihedrin genleriyle önemli farklılıkların olduğu belirlendi. Virusun infeksiyon özelliğini belirlemek için yapılan çalışmalar birinci ve ikinci instar *M. neustria* larvaları üzerinde virusun oldukça etkili olduğunu gösterdi. Konak spektrumunu belirlemek için virus *Gypsonoma dealbana*, *Cydia pomonella* (Lep; Tortricidae), *Euproctis chrysorrhoea* (Lep; Lymantriidae), *Pieris brassicae* (Lep; Pieridae), *Yponomeuta malinellus* (Lep; Yponomeutidae) ve *Hyphantria cunea* (Lep; Arctiidae) larvalarına karşı test edildi. Elde edilen sonuçlar bu virusun konak spektrumunun çok dar olduğunu gösterdi. Horizontal infeksiyonun yüksek oranda gerçekleştiği tespit edildi. Yapılan çalışmalar bu izolatanın *M. neustria* ile biyolojik mücadelede etkili bir ajan olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Malacosoma neustria*, Nükleopolihedrovirus, Biyolojik Mücadele, Baculovirus

SUMMARY

Isolation and Characterization of Virus from *Malacosoma neustria* (Lepidoptera: Lasiocampidae) and Its Potential Use in Microbial Control

Malacosoma neustria (Lepidoptera; *Lasiocampidae*) is one of the important agricultural pests. Chemical pesticides utilized to control this pest have hazardous effect on the environment. Recent concern on the hazardous effect of chemical pesticides in the environment made scientists consider finding more effective and safer control agents. In this study, morphological, ultrastructural and molecular characterization, transmission and host spectrum of a viral pathogen of *M. neustria* were carried out for biological control.

Viral infection was only observed in the populations of *Malacosoma neustria* collected in Gümüşhane. Morphological, ultrastructural and molecular studies showed that the virus is a nucleopolyhedrovirus. The dimension of polyhedra was $1.64 \pm 0.52 \mu\text{m}$. In cross-section of polyhedrae it was visible that virions contain 1 to 18 nucleocapsids per virion. The average size of particles was $240 \times 35 \text{ nm}$. Restriction endonuclease analysis of the viral DNA by *EcoRI*, *BamHI* and *HindIII* enzymes and sequence analysis of polyhedrin gene showed that there is significant differences between this isolate and earlier isolates. The bioassays carried out to determine the infectivity of the virus showed that it is very effective on the first-second instar larvae of *M. neustria*. On the other hand, to detect host specificity, the isolated virus was tested against *Gypsonoma dealbana*, *Cydia pomonella* (Lep; Tortricidae), *Euproctis chrysorrhoea* (Lep; Lymantriidae), *Pieris brassicae* (Lep; Pieridae), *Yponomeuta malinellus* (Lep; Yponomeutidae) and *Hyphantria cunea* (Lep; Arctiidae). This result indicated the host spectrum of MnNPV is narrow. Horizontal transmission of ManeMNPV is very high. The result of our study show that Turkish isolate of *Malacosoma neustria* nucleopolyhedrovirus is very promissive for biological control of *M. neustria*.

Key Words: *Malacosoma neustria*, Nucleopolyhedrovirus, Biological Control, Baculovirus

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. <i>Malacosoma neustria</i> 'ya ait dişi (A) ve erkek (B) kelebekler.....	3
Şekil 2. <i>Malacosoma neustria</i> 'ya ait yumurtalar.....	3
Şekil 3. <i>Malacosoma neustria</i> 'ya ait genç (A) ve olgun (B) larvalar.....	4
Şekil 4. <i>Malacosoma neustria</i> 'ya ait pupa.....	4
Şekil 5. Baculoviridae familyasına ait alt gruplar ve yapıları.....	13
Şekil 6. Eksternal semptomlara bağlı olarak temel virus gruplarının tanımlanma şeması...	23
Şekil 7. Nukleopolihedrovirus ile infekte olmuş <i>Malacosoma neustria</i> larvası.....	36
Şekil 8. NPV ile infekte olmuş larval dokudan direkt olarak hazırlanmış preparatta PIB yapıları.....	37
Şekil 9. Farklı boyama metotlarıyla tespit edilmiş PIB yapıları.....	38
Şekil 10. ManeMNPV'ye ait PIB'lerin SEM Mikroskopunda görünümü.....	39
Şekil 11. ManeMNPV'ye ait PIB'lerin TEM mikroskopundaki enine kesiti	40
Şekil 12. ManeMNPV'ye ait bir virionun TEM Mikroskopundaki boyuna kesiti.....	40
Şekil 13. ManeMNPV'ye ait bir virionun TEM Mikroskopundaki enine kesiti.....	41
Şekil 14. ManeMNPV'nun DNA-DNA hibridizasyon yöntemi ile belirlenmesi.....	42
Şekil 15. <i>EcoRI</i> ile kesilmiş ManeMNPV DNA'sının agaroz jel elektroforezi.....	43
Şekil 16. <i>BamHI</i> ile kesilmiş ManeMNPV DNA'sının agaroz jel elektroforezi.....	44
Şekil 17. <i>HindIII</i> ile kesilmiş ManeMNPV DNA'sının agaroz jel elektroforezi.....	45
Şekil 18. PCR ile çoğaltılmış ManeMNPV'ye ait polihedrin geni.....	46
Şekil 19. ManeMNPV PIB yapılarının çaplarının dağılımı.....	48
Şekil 20. ManeMNPV'nün dişi bireyler tarafından yeni generasyona aktarımı.....	49
Şekil 21. ManeMNPV'nin horizontal dağılımı.....	50
Şekil 22. NPV ile infekte olmuş trake dokusu.....	52
Şekil 23. NPV ile infekte olmuş hemosit.....	52
Şekil 24. Sağlıklı ve düşük dozda infekte olmuş larvalara ait pupalar.....	53

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Böcek virusu familyaları ve kaydedildiği konakları.....	12
Tablo 2. Böcek viruslarının teşhisi için kontrol listesi.....	22
Tablo 3. ManeMNPV'nin infeksiyon özelliği.....	51
Tablo 4. ManeMNPV'nin konak hassasiyeti.....	54
Tablo 5. ManeMNPV'nin farklı sıcaklıklardaki infeksiyon oranı.....	55
Tablo 6. Bazı <i>Malacosoma</i> türlerinden izole edilen NPV PIB'lerinin çapları.....	57
Tablo 7. Bazı <i>Malacosoma</i> türlerinden izole edilen NPV nukleokapsidlerinin büyüklükleri.....	58
Tablo 8. ManeMNPV'ye ait polihedrin gen sekansının gen bankasındaki bazı diğer NPV'ler ile olan benzerliği.....	60

SEMBOLLER DİZİNİ

CPV	: Sitoplazmik Polihedrosis Virus
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNV	: Densonucleosis virus
ECV	: Ekstrasellular virus
GV	: Gronülozis virus
IB	: İnklüzyon yapısı
IV	: Iridescent virus
ManeMNPV	: <i>Malacosoma neustria</i> multinukleopolihedrovirus
NPV	: Nukleopolihedrovirus
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PIB	: Polihedral inklüzyon yapısı
RNA	: Ribonükleik asit
SEM	: Tarama Elektron Mikroskobu
TEM	: Transmision Elektron Mikroskobu

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Yüzük kelebeği (*Malacosoma neustria* Lep; Lasiocampidae) Lepidoptera takımına ait olup, ülkemizde önemli tarımsal zararlılardan biridir. Ülkemizin hemen her yerinde bulunan bu böcek bir çok meyve ve fındık bahçelerinde taze sürgün ve yaprak üzerinde çeşitli zararlar yaparak yıllık verimi önemli derecede azaltmaktadır (Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı 1992; Tuncer, Ecevit, 1997).

Ülkemizde bu zararlı ile mücadele tamamen kimyasal ilaçlar kullanılarak yapılmaktadır. Kimyasal ilaçlar kullanılırken, bunların bir çok yan etkileri ortaya çıkmaktadır. Bir çok yönden bazı canlı grupları ciddi zararlar görmektedirler (Peter, 1984). Zirai mücadele ilaçlarından bugün için vazgeçilememesinin nedeni, bu ilaçlara alternatif bir mücadele yönteminin tam anlamıyla geliştirilememesidir (Demirbağ, Beldüz, 1997). Kimyasal mücadelenin dışındaki mücadele metotlarının yeteri kadar geliştirilememesinden ve geliştirilen metotların zararlı, pahalı ve ilkel olmasından dolayı zirai mücadele ilaçları uygulanmasının daha uzun yıllar devam edeceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, tüm dünyada kimyasal ilaçların yerini gelecekte biyolojik kontrol olarak bilinen bir yöntemin alacağı kaçınılmaz olmuştur.

Biyolojik kontrol, zararlı böceklerin yapmış olduğu zararları en aza indirmek için bu böceklerin tabii düşmanlarını kullanma olarak tanımlanabilir. Tabii düşman terimi, parazitler ve predatörlerle birlikte hastalık oluşturan organizmaları da kapsar. Ancak, hastalık yapan organizmaların kullanımı, genellikle mikrobiyal kontrol olarak adlandırılır (Peter, 1984). Biyolojik kontrolün büyük bir avantajı kimyasal kontrol yöntemleriyle bağlantılı birçok problemi ortadan kaldırmasıdır. Bu nedenle biyolojik kontrol, kimyasal ilaçlarla karşılaştırıldığında ekolojik dengeyi bozmayan alternatif bir mücadele yöntemidir (Yaman, Demirbağ, 1998).

Biyolojik kontrolde kullanılacak ajanların bir çoğu doğadaki hastalıklı böceklerden izole edilir (Yaman, 1998). Doğada böceklerin hastalanmasına neden olan ve sonra onları öldüren, orijini bakteri, virus, protozoa, mantar ve nematod olan pek çok mikroorganizma mevcuttur (Lipa, 1975; Weiser, 1969; Deacon, 1983; Payne, 1988, Yaman vd., 1999,

Yaman vd., 2001, Yaman vd., 2002). Bunlardan viruslar zararlı üzerinde en etkili ve çevreye en duyarlı olmaları bakımından gelecek için büyük umutlar vaatmektedir. Çiğneyici ağız parçalarına sahip böcekler, özellikle yaprak yiyenler, virus infeksiyonlarına daha hassastır (Weiser, 1969). Bu hususta yaprak yiyen Lepidoptera tırtırlarıyla Hymenoptera'nın yalancı tırtırları çok zarar görürler. Böcek viruslarının büyük bir kısmı Lepidoptera (% 83) üyelerinde etkilidir. Bu viruslar genellikle 2-3 yılda bir meydana çıkan epidemilerde çoğalarak bir çok larvayı öldürür ve böylece böcek afetini ortadan kaldırır.

Böcek viruslarının Lepidoptera üyeleri üzerinde yüksek infeksiyon göstermesi ve çevreye karşı duyarlı olması bilim adamlarını virusların biyolojik mücadele ajanı olarak kullanımına yöneltmiş ve bu konuda bir çok ülkede oldukça başarılı çalışmalar yapılmıştır (Adams, 1991). Bu çalışmalar sonucunda çevreye duyarlı ve oldukça yüksek ölüm oranı sağlayan bir çok virus geliştirilerek ticari olarak satışa sunulmuştur (Cunningham, 1998; Yaman vd., 2001).

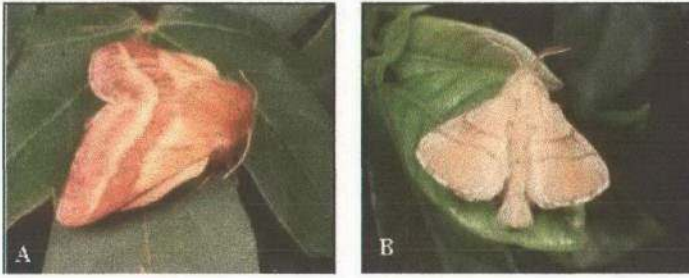
Tüm dünyada böcek viruslarının tabiattan izole edilmesine ve etkili bir biyolojik kontrol ajanı olarak kullanımına yönelik çalışmalar hızla ilerlerken, ülkemizde bu konu üzerindeki çalışmalar yok denecek kadar azdır. Ayrıca böcek viruslarına karşı çok hassas olan ve bir çok virusu popülasyonlarında doğal olarak bulunduran Lepidoptera takımına ait böcekler ülkemizde çeşitli tarım ürünleri üzerinde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu zararlılar üzerinde patojen virusların araştırılmasına ve etkili bir biyolojik mücadele ajanı olarak kullanımına yönelik çalışmalar kaçınılmaz olmuştur.

Bu nedenlerden dolayı bu doktora tezinde Lepidoptera grubuna ait olan ve önemli bir tarımsal zararlı olarak kabul edilen yüzük kelebeği (*Malacosoma neustria* Lep; Lasiocampidae) ile mücadelede kimyasalların kullanımını azaltacak, ekonomik, çevreye daha duyarlı ve daha etkili viral kontrol ajanlarının araştırılması, doğadan izolasyonu ve geliştirilmesi amaçlanmıştır.

1.2. *Malacosoma neustria* (Lepidoptera:Lasiocampidae)

1.2.1. Tanımı ve Yaşayışı

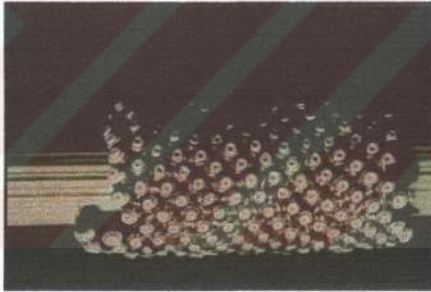
Ortalama 35-40 mm açıklığında olan dişi kelebeklerin üst kanatları üçgen şeklinde ve sütlü kahverenginde olup ortasında hafif meyilli kırmızı kahverenginde bir şerit vardır (Şekil 1, A).



Şekil 1. *Malacosoma neustria*'ya ait dişi (A) ve erkek (B) kelebekler

Erkek kelebekler 28-30 mm kanat açıklığında deve tüyü rengine olup, ön kanatları iki kırmızı kahverengi çizgi enine kat eder (Şekil 1, B).

Yumurtalar kirli beyaz renkli tek köklü diş biçiminde olup, ince dallara ve birbirine siyah renkli bir madde ile yüzük biçiminde yapıştırılır (Şekil 2).



Şekil 2. *Malacosoma neustria*'ya ait yumurtalar

Kış yumurta halinde geçirir. Nisan ayı ortalarına doğru tırtıl çıkışları başlar. Tırtıllar çıkışlarından itibaren ağ örerler ve bu ağlarını geceleri ve kötü havalarda barınak olarak kullanırlar (Şekil 3, A). İlk dönemlerinde topluca bulunan tırtıllar üçüncü dönemlerinden itibaren dağılırlar ve bundan sonraki dönemlerde yaprakları oburca yiyerek beslenirler. Olgun tırtıllar 55-60 mm boyunda, baş mavi, vücudu sırtta beyaz, yanlara doğru kiremit rengi, siyah, sarımsı ve mavi olmak üzere yol yol renkli ve seyrek kılıdır (Şekil 3, B).



Şekil 3. *Malacosoma neustria*'ya ait genç (A) ve olgun (B) larvalar

Beş gömlek değiştirdikten sonra olgunluğa erişen tırtıllar mayısın ikinci veya üçüncü haftasından itibaren ağaçların dal ve yapraklarında ördükleri gevşek kozalaklar içersinde pupa olurlar. Pupalar, 18-23 mm boyunda ve beyaz ipek gibi ipliklerden örülmüş mekik şeklindeki kozalar içindedir (Şekil 4).



Şekil 4. *Malacosoma neustria*'ya ait pupa

Pupalardan 2-3 hafta sonra genellikle Haziranın üçüncü ve dördüncü haftasından itibaren ergin çıkışı başlar. Dişi kelekler çiftleşmelerini takiben, yumurtalarını ağaçların genellikle bir yıllık ince dallarına yüzük biçiminde dizerler ve bunları, kuruyunca sertleşen bir madde ile birbirlerine ve dala yapıştırırlar. Bir dişi 200- 300 yumurta bırakır. Yılda bir döler.

1.2.2. Zarar Şekli, Ekonomik Önemi ve Yayılışı

Yüzük keleşleri tırtılları ağaçların önce tomurcuklarını, daha sonra da yapraklarını yiyerek zararlı olurlar. Salgın yıllarında ağacı tamamen yapraksız bırakırlar. Ülkemizin hemen her yerinde bulunurlar.

1.2.3. Doğal Düşmanları ve Mevcut Mücadele Yöntemleri

Ülkemizde *M. neustria* ile mücadele zarar yaptığı dönemlerde çoğunlukla kimyasal ilaçlar kullanılarak yapılmaktadır. Carbaryl, Malathion, Phosalone, Fenthion, Trichlorphon gibi kimyasal ilaçlar yaygın olarak kullanılan ilaçlardır.

Bununla birlikte bu zararlının bir çok doğal düşmanı vardır. Bu nedenle biyolojik mücadelesi mümkündür (Jankevica vd., 1997). Doğal düşmanları arasında en baskın grubu parazitoidler oluşturmaktadır. Bu böceğin 20'den fazla yumurta, larva ve pupa parazitoidi bulunmaktadır. Ülkemizde yumurta parazitoidlerin bu zararlı üzerinde yaygın ve etkili oldukları ve % 55'in üzerinde parazitlenmeye neden oldukları tespit edilmiştir (Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, 1995).

Ülkemizde bu zararlının mikrobiyal patojenlerine yönelik bir çalışma Yaman vd. (2002) tarafından yapıldı. Bu çalışmada bu zararlıdan 5 farklı bakteri izole edildi ve bu bakteriler morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas* sp., *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus* sp. ve *Pseudomonas chlororaphis* olarak tanımlandı. İzole edilen bu bakteriler içinde *B. thuringiensis*, *P. mirabilis* and *P. chlororaphis*'in bu zararlı üzerinde kaydedeğer bir infeksiyon gösterdiği tespit edildi.

1.3. Zararlı Böceklerle Mücadele Yöntemleri

Zararlıların bitkilerde yaptıkları çeşitli zararların, gerek doğal kuvvetler (doğal mücadele) gerekse insan yardımıyla (uygulamalı mücadele) önlenmesine veya hiç olmazsa azaltılmasına yönelik yöntem ve harcanan çabalara zararlılarla mücadele denir. Yapılan mücadele yöntemlerini çeşitli gruplara ayırmak mümkündür (Çanakçıoğlu, 1983).

Doğal mücadele: Doğal kuvvetlerin böceklerle olan etkilerinden yararlanılarak zararlının öldürülmesi.

Yasal mücadele: Yasal yollardan yararlanılarak zararlıların yayılmasını önleme. Örneğin, karantina, ambargo, muayene vb.

Mekanik mücadele: Zararlı böcekleri toplama, tuzakla yakalama, böcekli materyalleri yok etmek.

Fiziksel mücadele: Yakmak ve sıcaktan, radyoaktiviteden ve elektrikten faydalanmak.

Kültürel mücadele: Bu zararlının zarar yaptığı ağaçların karışıklığını ve kapalılığını düzenlemek, meşcere kurmak ve yetiştirme ile kesim tekniğine uymak, toprak bakımı, dayanıklı türler yetiştirmek, gıda kaynaklarını değiştirmek.

Biyolojik mücadele: Zararlı böceği yok etmek için çeşitli etken gruplarından (mikroorganizma, böcek yiyen vertebrata, predatör Arthropoda, parazit böcekler) ve genetik yöntemlerden yararlanmak.

Kimyasal mücadele: Tozlaşma, püskürtme, sisleme, fumigasyon, sterilizasyon, zehirli yemler kullanmak vb.

Entegre mücadele: Çevre ve orman sahibi için uzun vadede en az masrafla en iyi faydaları sağlayabilecek olan ve populasyon dinamiğine dayanan yöntemlere önem verilerek, mücadele yöntemlerinin kombine edilmesi sonucu yarar elde etmektir.

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

1.3.1. Kimyasal Mücadele ve Yan Etkileri

Zararlı ile mücadelede yaygın olarak kullanılan insektisidler bitkilerde ve çevrede bulunan canlılar üzerinde bir çok zararlı etkiler meydana getirmektedirler. İnsektisidlerin zararlarını böcekler, insanlar ve çevre üzerine olan etkileri olarak başlıca üç başlık altında toplayabiliriz.

1.3.1.1. İnsektisitlerin Böcekler Üzerine Etkileri

İnsektisidlerin böcekler üzerine etkileri böceklerin uygulanan kimyasala karşı mukavemet kazanması ve faydalı böceklere zarar vermesi şeklinde olur.

İnsektisitler her ne kadar zararlı böcekleri yok etmek için kullanılırsalar da, her zaman zararlı böceklere karşı tam bir etki sağlayamazlar. Çünkü zamanla insektisitlerin ilk tatbik edildikleri zamanki etkili dozlarından daha az etkilenebilen ırklar ortaya çıkmaktadır. Bu olaya böceklerin mukavemeti adı verilmektedir. Böcekler belli başlı insektisid sınıflarının hepsine direnç geliştirmişlerdir. Ekolojik ve evrimsel açıdan bakıldığında bu şaşırtıcı değildir. Böceklerdeki direnç mekanizmaları, (1) genetik faktörler, (2) fizyolojik haller, (3) biyokimyasal mekanizmalar, (4) direnç mekanizmalarının kombinasyonu ve (5) davranışla ilgili mekanizmalar olmak üzere 5 grupta toplanmaktadır. İlaç baskısı altında yetişen generasyonlarda tabii seçim hassas olan fertlerin ortadan kalkmasına ve devamlı mukavim fertlerin ortaya çıkmasına sebep olur. Dolayısıyla bu yeni fertlere karşı kullanılan insektisidler daha çok çevredeki yararlı canlıları ve insanları etkilemektedir (Ecevit, 1988).

İnsektisitlerin etki tarzı bakımından zararlı ve faydalı böcekler arasında bir farklılığı yoktur. Fakat etkileri bakımından farklılıklar vardır. Faydalı böcekler olarak kabul edilen predatör ve parazitler insektisitlerden daha fazla etkilenebilmektedirler (Ecevit, 1988). Ne yazık ki parazit ve predatörlerdeki mukavemetin oluşumu, zararlı böceklerdeki kadar çabuk olmamaktadır. Bunun sonucu olarak, zararlı popülasyonları üzerinde dengeleyici olan parazit ve predatörler ortadan kalkmakta ve zararlılar daha çabuk yayılmaktadır.

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

1.3.1.2. İnsektisitlerin İnsanlar Üzerine Etkileri

İnsektisitler doğrudan doğruya ve dolaylı olarak insan sağlığını etkilemektedirler (Ecevit, 1988). Bu etki akut ve kronik toksisite olarak iki grup altında toplanabilir.

Akut toksisite veya akut zehirlenmeler, ilaçlardan olan ani zehirlenmeleri ortaya çıkarmaktadır. Bu ise şu yollarla ortaya çıkmaktadır. İlacın imali esnasında çalışanlar ilaçlardan zehirlenebilirler. Ayrıca, ilaçların taşınması, kullanılması esnasında ihmalkarlık gösterilmesiyle zehirlenmeler ortaya çıkabilir (Ecevit, 1988).

Her ne kadar ilaçların prospektüslerinde hasattan ne kadar önce kullanılması gerektiği yazılı ise de, bu süre beklenilse bile bir miktar ilaç ve ayrışma ürünleri geride kalmaktadır. Buna ilacın kalıntısı denilmektedir. İlaç kalıntıları dolaylı veya direkt olarak meydana gelebilirler. Bu kalıntıları içeren bitkilerle beslenen insanlar ilaçları vücutlarında depolarlar. ABD'de 216 değişik gıda maddesi örneği incelenmiş ve DDT ve ayrışma ürünlerinin örneklerde % olarak bulunuşunun fazla olduğu tespit edildiği gibi, bunların kalıntı miktarlarının da fazla olduğu tespit edilmiştir (Ecevit, 1988).

Akut toksisite, zirai mücadele ilaçlarının fazla miktarda alınmasıyla olan zehirlenme olarak ortaya çıkmaktadır. Fakat, kronik toksisite olarak adlandırılan öldürücü dozların çok altındaki dozların kalıntılarından bütün insanlar nasibini almakta ve yavaş yavaş zehirlenmektedir. Bu düşük dozların gelecek kuşaklarda neler meydana getireceğini de şimdiden tahmin etmek zordur. Ayrıca bu ilaçların insanların sinir sistemindeki enzimler üzerinde etkili oluşu önemlerini daha da arttırmaktadır. Bugün özellikle fazla miktarlarda kullanılan klorlandırılmış hidrokarbonların insan ve hayvanların beyin, karaciğer, böbrek ve yağ dokularında toplanarak toksik etkide bulunduğu bilinmektedir (Ecevit, 1988).

1.3.1.3. İnsektisitlerin Çevreye Olan Etkileri

İnsektisitler kullanıldıkları çevrede bulunan bir çok yabani hayvanı değişik oranlarda etkilemektedir. Ağaçlardaki bazı zararlıların mücadelesinde kullanılan DDT'nin toprakta birikme yaptığı ve bunun sığırcık ve böceklerle beslenen kuşların popülasyonunu azalttığı tespit edilmiştir (Ecevit, 1988).

İnsektisidlerin çeşitli hayvanlar ve bu meyan da kuşlar ve balıklar üzerine olan etkileri çoğunlukla ilaç atıldıktan sonra olur. Zehirli sahalarda hayvanların otlatılmasıyla otlarla birlikte zehir hayvanlara geçmektedir. Arazide tatbik edilen ilaçlar yağmurlarla yıkanarak derelere, oradan da deniz ve göllere taşınır. Bu yolla da balıklar etkilenir. Bu balıkları, ilaçlanmış meyve ve sebzeleri yiyen insanlar dolaylı olarak insektisidleri vücuduna almış olurlar.

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

İnsektisidler kullanıldıkları alandaki bitkilerin çimlenmesi, vejetasyonu ve üremesi üzerinde de olumsuz etkiler yaparlar. Bazen bitkilerin belirli doku kısımlarında, özellikle yaprak ve sürgünlerinde yanma denilen bir takım lekeler ile renk değişmelerinin meydana gelmesine sebep olurlar. Hatta bazen tüm bitkilerin öldüğü görülür. İnsektisidlerin yan etkilerinden dolayı, kimyasal mücadelenin günümüzde mümkün olduğunca kısıtlanması ve bunun yerini biyolojik mücadelenin alması gerekmektedir.

1.3.2. Biyolojik Mücadele

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

Son yıllarda yeniden güncellik kazanan biyolojik mücadelenin bazı parlak başarıları rağmen henüz yeterince yaygınlaşmadığını, bazı başarılarının ise pek duyulmadığını açıklamak yerinde olur.

İnsanoğlunun doğuşundan çok önce, böcekler diğer canlı organizmalar ile etkileşim içerisinde idi, ve dolayısıyla Entomofag'lığın ilk böceklerin ortaya çıkışı ile doğduğu söylenebilir.

Biyolojik mücadele ile ilgili yazılı belgelere bir göz atarsak Aristo ve Pliny'nin eserlerinde ilk böcek patolojisi kavramlarına rastlamaktayız. Aristo, "Historia Animalium" adlı eserinde, *Galleria mellonella*'nın peteklerdeki zararını açıklamış ve kovanlarda hastalık meydana getirdiğini ifade etmiş keza, balarılarında görülen diğer bir hastalığın belirtilerini de tanımlamıştır.

Canlıların mücadele amacıyla kullanılmasına ait ilk bilgimiz, M.S. 900 yılında yayınlanan bir Çin kitabında açıklandığına göre Çinli turunçgil yetiştiricilerinin bahçelerinde avcı karıncaları kullandıkları ve bunların pazarlarda satıldığınıdır.

Uzun yıllar sonra, Avrupa'da böcekler ile ilgili değerli gözlemler görülmeye başlanmıştır. Bu çalışmalar günümüze kadar büyük bir gelişme göstererek ilerlemiştir. Çalışmalar ağırlıklı olarak böceklerde hastalık yapan mikroorganizmaların izolasyonu ve biyolojik mücadelede kullanımına yönelmiştir.

Ancak, hastalık yapan mikroorganizmaların kullanımı, genellikle mikrobiyal kontrol olarak adlandırılmaktadır. Virüsler, bakteriler, protozoalar, mantarlar ve nematodlar

mikrobiyal kontrol içindeki temel mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar içinde viruslar en etkili ve güvenli mikrobiyal ajanlardan biridir.

1.3.2.1. Biyolojik Mücadelede Virusların Kullanımı

Virus hastalıkları hakkındaki ilk bilgiler 1889 yılında Avrupa'da *Lymantria monacha* (L) (Lepidoptera, Lymantriidae) Wipfel hastalığının bulunması üzerine yapılan çalışmalarla başlamıştır. Daha sonra 1907'de, aynı tip bir hastalık Amerika Birleşik Devletleri'nin New England eyaletinde *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera, Lymantriidae) popülasyonu üzerinde müşahade edilmiştir. Ölen larvaların solgun bir görünümde olması nedeniyle buna "solgun hastalığı" adı verilmiştir.

Solgun hastalığı, alınan gıda ile böcek vücuduna ulaşır. Virus vücuda yerleşince genellikle kan hücrelerini ve bazı dokuları öldürür. Hasta larva önce uyuşuk bir durum alır ve sonra yemesine son verir. Ölmeden önce, ağacın tepesine tırmanır ve arka bacaklarına asılı olarak ölür. Dokuları koyulaşır, ayrışır ve vücutları sıvı haline geçer. Nihayet, küçük parçalara ayrılır ve ağaçta kurur.

Virusların zararlı böceklerle mücadelede kullanılması, Amerika Birleşik Devletleri'nde 1976 yılına kadar denemeler şeklinde olmuştur. Sonra Çevre Koruma Dairesi *Orgyia pseudotsugata* (McDunn) (Lepidoptera, Lymantriidae) larvalarına karşı Baculovirus cinsinin bir nukleopolihedrovirus (NPV)'unu kullanma iznini aldı. Böylece bu virus hakkındaki uygulama yöntemleri, çevre ve insan sağlığının korunması, kalıntı miktarı gibi hususlar üzerinde yoğun çalışmalar başlamış bulunmaktadır. NPV ile *Lymantria dispar*'a karşı mücadele etmek için 1978'de izin alınmıştır.

Böcek viruslarının etkinliği, hasta tırtılların ezilmesi ile hazırlanan süspansiyonun zararlıya püskürtülmesi ile yapılan laboratuvar çalışmaları ya da saha denemeleri şeklindedir. Örneğin; Amerika Birleşik Devletleri'nde yoncalarda zararlı olan *Colias sp* (Lep) adlı tırtıllara karşı, polihedrovirus hastalığı etkisiyle ölmüş tırtılları ezerek hazırlanan süspansiyon püskürtülerek biyolojik mücadele yürütülmektedir. Ancak bu süspansiyonlarda polihedrovirusların bazıları ticari bir preparat olarak bazı ülkelerde kullanım halindedir (Cunningham, 1998; Lipa, 1998). Mesela; Amerika Birleşik Devletleri'nde "Polyvirocide" adı ile virus preparatları satışa sunulmuştur. Fakat çoğunun konukçuya özelleşme gösterdiği bu entomopatojen virusların çevredeki durumu ve meydana getirebileceği yan etkileri henüz tam olarak belirlenmemiş olması nedeniyle,

daha fazla çalışmalara gerek duyulmaktadır. Viruslar, genellikle mekanik olarak bir konukçudan diğerine yumurta koymak suretiyle nakledilirler. Çiğneyici ağız parçalarına sahip böcekler özellikle yaprak yiyenler, virus infeksiyonlarına daha hassastırlar. Bu hususta yaprak yiyen Lepidoptera tırtıllarıyla Hymenoptera'nın yalancı tırtılları fazla zarar görürler. Bu viruslar genellikle 2-3 yılda bir meydana çıkan epidemilerde çoğalarak bir çok larvayı öldürür ve böylece böcek afetini ortadan kaldırırlar. Bir çok virusun böceklerin hastalanmasına neden olarak böcek afetlerini kontrol ettikleri bilinmektedir (Steinhaus, 1956). Günümüzde yaklaşık 500 arthropod türünden 450'den fazla virus tanımlanarak sınıflandırılmıştır. Viruslar birçok böcek takımlarıyla bağlantılıdır. Bununla birlikte büyük bir kısmı Lepidoptera (% 83), Hymenoptera (% 10) ve Diptera (% 4) takımlarında bulunmaktadır.

Tüm böcek virusu familyaları ve kaydedildiği konaklar Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. Böcek virusu familyaları ve kaydedildiği konakları

Virus familyası	Kaydedildiği konak takımları	Genel konak safhası
Baculoviridae: NPV ve GV	Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Neuroptera, Siphonaptera, Thysanura, Trichoptera	Larva, bazen pupa veya ergin
Reoviridae: CPV	Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera	Larva, pupa ve ergin
Entomopoxviridae: EPV	Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Orthoptera	Larva, pupa ve ergin
Iridoviridae: IV	Hemen hemen tüm böcekler ve diğer omurgasız familyaları	Larva
Ascoviridae	Lepidoptera (sadece Noctuidae familyası)	Larva
Birnaviridae	Diptera (Sadece <i>Drosophila</i> cinsinde kaydedilmiş)	Ergin
Caliciviridae	Lepidoptera (sadece Noctuidae familyası)	Larva
Nodaviridae	Diptera, Coleoptera, Lepidoptera	Larva ve ergin
Parvoviridae: DNV	Diptera, Blattellidae, Lepidoptera, Odonata, Orthoptera	Larva, pupa ve ergin
Picornaviridae	Diptera, Lepidoptera, Orthoptera ve geniş böcek familyaları	Larva ergin
Polydnaviridae	Parazitik Hymenoptera	Ergin
Rhabdoviridae	Diptera	Ergin
Tetraviridae	Lepidoptera	Larva
<i>Oryctes</i> virus	Coleoptera	Larva ve ergin

Böcek virusları viral replikasyon alanları, nükleik asitlerinin ağırlığı, şekil, simetri, hastalık semptomları, kimyasallara duyarlılık ve seroloji gibi birçok kriterler göz önüne alınarak altı grupta toplanmıştır. Bunlar nukleopolihedrozis, granülozis, sitoplazmik polihedrozis, entomopox, iridescent ve densonukleozis viruslarıdır. *Drosophila* CO₂ virusu de bunlara dahil edilmiştir. Sınıflandırılan virusların büyük bir kısmı *Baculoviridae*, *Reoviridae*, *Poxviridae*, *Picornaviridae*, *Densoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae* ve *Iridoviridae* familyalarına aittir.

Bunlardan *Baculoviridae* familyası üyeleri sadece artropodlarda infeksiyon oluşturmalarından dolayı, diğer viruslara oranla daha avantajlıdır (Huber, 1986; Gröner, 1986; Demirbağ vd., 1998). Bu nedenle bu tez süresinde bu familya temel olarak alınmıştır.

Baculoviridae: Baculoviruslar çubuk şekilli, çift zincir DNA içeren zarflı viruslardır. Virionları Polihedra olarak adlandırılan bir protein matriks içinde gömülüdürler.

Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Neuroptera, Siphonaptera, Thysanura ve Trichoptera üyelerinin çoğunlukla larva, bazen pupa veya ergin safhalarından kaydedilmiştir.

Baculoviridae familyası A, B ve C olmak üzere üç altgruptan oluşur (Bilimoria, 1991; Adams, McClintock, 1991; Couch, 1991; Tanada, Hess, 1991; Huger, Krieg, 1991). A alt grubunda single (tek) nukleokapsidli NPV (SNPV) ve multi (çok) nukleokapsidli (MNPV) olmak üzere iki tip virus vardır (Şekil 5).

SNPV viruslarına örnek olarak *Bombyx mori* nuklear polihedrozis virusu (BmSNPV) verilebilir. Bu tip viruslar her bir zarflı virion içinde tek bir nukleokapsid içerirler.

MNPV viruslarına *Autographa californica* nukleopolihedrovirusu (AcMNPV) örnek verilebilir. Bu tip viruslar her bir zarflı virion içinde birden çok değişik sayıda nukleokapsidleri içerirler.

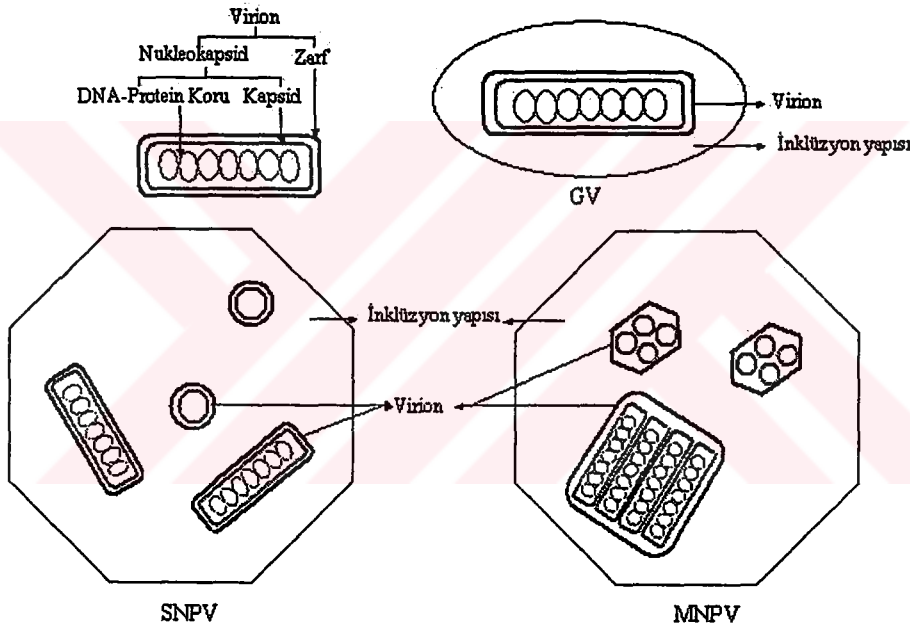
Nukleopolihedroviruslar (NPV) en iyi bilinen viruslar olup tanımlanmış artropod viruslarının % 41'ini teşkil etmektedirler. Zararlı böceklerin kontrolünde pratik kullanım açısından büyük öneme sahip olan bu viruslar konak hücre çekirdeğinde gelişirler. İnfekte edilmiş çekirdekler önemli bir şekilde genişler (Lipa, 1975). 230-420 nm uzunluğunda olan virionlar 0.2-15 µm çapındaki polihedral inklüzyon yapıları içinde gruplar halinde ya da tek olarak bulunurlar (Cunningham, 1988; Demirbağ, Beldüz, 1997).

NPV orjinine bakmaksızın bütün böcek hücrelerini infekte eder ve ölüme neden olur (Coppel, Mertins, 1977). Hastalanan larva önce uyuşuk bir hal alır ve sonra yemesine son

verir. Ölmeye önce ağacın tepesine tırmanır ve arka bacaklarına asılı olarak ölür. Dokuları koyulaşır, ayrışır ve vücutları sıvı haline geçer (Coppel, Mertins, 1977).

B alt grubuna ait olan Granülozis Viruslar (GV) de zararlı böceklerin kontrolünde büyük bir öneme sahiptir. Konak böceğin yağ dokusu, trakeal veya epidermal hücrelerinin sitoplazmasında ya da çekirdeğinde gelişen bu virusların virionları kapsül olarak tanımlanan küçük inklüzyon yapıları içinde tek olarak (nadiren çift) bulunurlar (Şekil 5). DNA içeren çubuk şekilli virionlar NPV virionlarına benzer. Çoğunlukla oval şekilli inklüzyon yapıları 200x400 nm boyutlarındadır.

C alt grubu baculovirusların zarf içermeyen grubudur.



Şekil 5. Baculoviridae familyasına ait alt gruplar ve yapıları

Reoviridae: Biyolojik mücadelede pratik kullanım açısından önemli olan diğer bir grup olarak kabul edilen sitoplazmik polihedrozis virusları (CPV) konak böcekte sadece ortabağırsak epitel hücrelerinin sitoplazmasında gelişirler (Burges, Hussey, 1971). Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera üyelerinin larva, pupa ve ergin safhalarından kaydedilmiştir.

Çift zincir RNA içeren 60 nm çapındaki küresel virionlar 0.5-15 µm çapındaki polihedral inklüzyon yapıları içinde tek olarak bulunurlar (Cunningham, 1988). CPV ile gerçekleşmiş bir enfeksiyon her zaman ölümle sonuçlanmaz. Ancak, böyle durumlarda larval büyüme yavaşlar, ergin ömrü azalır.

Entomopoxvirinae: Poxviridae familyasının bir alt familyası olan Entomopoxvirinae'ye ait olan Entomopoxviruslar böceklerle sınırlı bir poxvirus alt grubundan oluşur (Matthews, 1982). Bu alt familya güncel olarak 3 genus ile ifade edilmektedir. Bunlar, temel olarak Coleoptera'yı infekte eden Genus A (*Melolontha melolontha* tip türü); Lepidoptere ve Orthoptera'yı infekte eden Genus B (*Amsacta moorei* tip türü) ve Diptera'yı infekte eden Genus C (*Chironomus luridus* tip türü)'dir (Goodwin vd., 1991). Son zamanlarda keşfedilmiş olan entomopox viruslar (EPV) konak böceğin yağ dokusu hücrelerinin sitoplazmasında, bazen de hemositlerde çoğalırlar. Yağ dokusundaki hücre bölünmesi artar (Lipa, 1975). Çift zincir DNA içeren virionlar ovalımsı küp şeklinde olup 250x300x200 nm boyutlarındadır. 2-8 µm uzunluğunda düzensiz şekilli ve daha küçük mil şeklinde olmak üzere iki farklı inklüzyon yapıları oluştururlar (Coppel, Mertins, 1977).

Iridoviridae: Zarfsız iridescent viruslar (IV)'in ilk çoğalma alanları konak böceğin yağ dokusu hücrelerinin sitoplazmasıdır. Infekte ettikleri konak böceğin kuru ağırlığının % 25'ni teşkil edecek kadar çok miktarda çoğalabilirler. Canlı böcek içinde kendiliğinden kristalleşen viruslar karakteristik bir parlaklık oluştururlar. Ölü böcek iridescent (mavi-yeşil) renkte görünür. Bununla birlikte *Aedes taeniorhynchus* sivrisinek iridescent virusu turuncu ile kahverengi iridescent renklerini oluşturur. En az 32 tip IV hacim ve serolojik ilişkilerine dayanarak tanımlanmıştır. Hemen hemen tüm böcekler ve diğer omurgasız familyalarında infeksiyon oluştururlar.

Ascoviridae: Zarfsız çift zincir DNA viruslarının alışılmamış bir grubu olan bu grup infekte edilmiş hücre çekirdeği bozulduğunda oluşturulan virion ile dolu vesiküllere dayanılarak isimlendirilmektedir. Virionlar kompleks bir yapı ile geniş bir hacime sahiptir (130x 400 nm). Bunlar sadece Lepidoptera'nın Noctuidae familyasından izole edilmiş olup bu familyaya ait türlerin larvalarında kronik hastalık oluştururlar (Matthews, 1982). Hastalığın gelişimi boyunca çok sayıda virion içeren vesiküller ($>10^8$ /ml) hemolenfte birikir. Zarflı ve kompleks simetrik olan bu viruslar yaklaşık 170 kb ağırlığında linear, çift zincir DNA'ya sahiptir. (Federici vd., 1991). Patolojisi geniş olarak araştırılmamıştır.

Birnaviridae: Birnaviridae Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi (ICTV) tarafından son zamanlarda kurulmuş olan yeni bir familyadır. Bu familya Diptera'da *Culicoides* sp.'den izole edilmiş olan *Drosophila X* virusu ile simgelenir (Bonami, Adams, 1991). Virionlar 7 nm x 62 nm ebatlarında olup ikosaedral şekillidir. Çift zincir RNA'ya sahip zarfsız viruslardır.

Caliciviridae: İlk olarak portakal kurdu *Amyelois transitella*'dan izole edilmiştir. Tek zincir RNA içerirler. Virionlar calici virusların tipik özelliği olan karakteristik kübe benzer morfolojiye sahiptir. Partiküller 28 nm çapındadır. Biyolojisi hakkında çok az şey bilinmektedir.

Nodaviridae: Nodaviruslar yaklaşık 29 nm çapındaki virionlar ile tek zincir RNA içerirler. İki RNA segmentine sahiptirler. Bunlar hakkında daha ayrıntılı bilgi Japonya'da sivrisineklerden izole edilen *Nodamura* virustan elde edilmiştir. Nodaviruslar morfolojik olarak Picorna virusları andırırlar. Bu yüzden elektron mikroskobu ile ayrılmaları zordur.

Parvoviridae: Bu familya 19-24 nm oranlarındaki virionlar içine paketlenmiş tek zincir DNA viruslarından oluşur. Tipik cinsi *Densovirus* olup *Densonucleosis virus* (DNV)'e genel ismini verir. Virion morfolojisine ve infeksiyon semptomlarına dayanılarak bu familya Tip 1 (Şiddetli infeksiyon, bağırsak dışındaki tüm dokuların infeksiyonu ile hızlı ölüm) ve Tip 2 (Kronik infeksiyon ve sadece bağırsağın infeksiyonu ile nispeten yavaş ölüm) olmak üzere ikiye ayrılır.

Picornaviridae: Tek zincir RNA viruslarından olan bu grup 22-30 nm çapında küresel virus partiküllerine sahiptir. Bu familyanın en iyi tanımlanmış üç üyesi circır böceği virusu, *Drosophila C* ve *Gonometa* virusudur. Yeterli elektron mikroskobu çalışmaları yoktur. En temel ayırt edici özelliği asite karşı dayanıklılığı ile bütünleştirilmiş üç büyük ve iki küçük polipeptidlerin varlığıdır.

Polidnaviridae: Polidnaviridae, parazitik Hymenoptera'nın bazı türlerinin ovaryumlarında replike olan belirli virusları içeren bir familyadır (Brown, 1986). Bu familyanın temel özelliği isminde yansıdığı gibi, süper helikal çift zincir DNA varlığıdır. Oval virus partiküller 150x 350 nm büyüklüğündedir.

Rhabdoviridae: Tek zincir RNA virusu olan bu familyanın en iyi çalışılmış üyesi *Drosophila Sigma* virusudur. Bu virus çubuk şekilli 75 x 200 nm ebatlarında virus partiküllerine sahiptir.

Tetraviridae: Tetraviridae 35-38 nm çaplarında ikosahedral virionlara sahip tek zincir RNA içeren familyadır. En iyi tanımlanmış olanı *Nudaurelia* β virusudur. Bu virus *Nudaurelia cytherea capensis* (Lepidoptera, Saturniidae)'den izole edilmiştir.

Diğer zarfsız viruslar: Diğer tek zincir familyaları Togaviridae (60-65 nm çapında virionlara sahip), Flaviviridae (35-45 nm çapında) ve Bunyaviridae (90-100 nm çapında)'dir.

Çiğneyici ağız parçalarına sahip böcekler, özellikle yaprak yiyenler, virus infeksiyonlarına daha hassastırlar (Weiser, 1969). Bu hususta yaprak yiyen Lepidoptera

tırtıllarıyla Hymenoptera'nın yalancı tırtılları çok zarar görürler. Bu viruslar genellikle 2-3 yılda bir meydana çıkan epidemilerde çoğalarak bir çok larvayı öldürür ve böylece böcek afetini ortadan kaldırırlar. Viruslarla biyolojik mücadele yapmak için genellikle hastalığın etkisiyle ölmüş tırtıllar kullanılır. Bu tırtılların ezilmesiyle hazırlanan süspansiyon epidemi alanına püskürtülür. Virus ile infekte olmuş böcekte bozulma ve hücre dağılması özellikle hipodermiste kolaylıkla görülebilir (Lipa, 1975).

1.3.3. Baculovirusların Biyolojisi

Baculoviruslar, 25 x 250 nm büyüklükte olup 90-200 kilo baz çifti (kbp), yuvarlak-kapalı, çift zincir, süpersarmal DNA ihtiva ederler. Virus DNA'sı hücre zarı benzeri ve karmaşık bir yapıya sahip olan bir zarf tarafından çevrili *nukleokapsid* içerisine paketlenmiştir.

İntrasellular viruslar, *polihedra* veya *granula* olarak isimlendirilen proteinsi inklüzyon yapılar içerisine gömülürler. Baculovirus familyası, inklüzyon yapıların şekillerine göre *Nukleopolihedrovirus* ve *Granulosis virus* olmak üzere iki alt cinse ayrılır. Bu gruplandırma morfolojik, serolojik ve genetik bilgilere dayanarak yapılmaktadır.

Autographa californica nukleopolihedrovirusu (AcNPV), yonca tırtılı böceğinden ilk olarak izole edilmiş, nükleer polihedrozis cinsine ait olan ve en çok çalışılan örnek bir baculovirus tipidir. Bu yüzden baculovirus biyolojisi hakkındaki genel bilgiler, AcNPV ile sınırlandırılmıştır. Nukleopolihedrovirusları (NPV) en iyi bilinen viruslar olup tanımlanmış arthropod viruslarının %41'ini teşkil etmektedir. Nükleopolihedrovirus, 1-18 nukleokapsidin bir zarf içerisine gömülmesiyle oluşur. Daha sonra bu zarfa sahip viruslar (virionlar), polihedrin (28 kDa) olarak adlandırılan tek bir proteinden oluşmuş *polihedral inklüzyon* yapı (PIB) adındaki kristal benzeri cisimler içerisine gömülürler.

AcNPV'nun replikasyonu infekte edilen hücrelerin çekirdeklerinde olur. Bu işlem iki safhada cereyan eder. Birinci safhada, çekirdek içerisinde nukleokapsidler oluşur. Silindir şeklindeki nukleokapsitler, kapsit denilen tüp benzeri yapı içerisinde DNA'yı içerir ve tüplerin iki ucunda *taban* ve *kapak* denilen yapılar bulunur. Oluşan nukleokapsitler daha sonra nükleus kanallarından geçerek sitoplazmaya ulaşır ve sonra tomurcuklanma yöntemiyle hücre zarından zarf kazanarak hücreden ayrılırlar. Bu zarflı viruslar (ekstracellular viruslar, BV) hücre kültüründe, hücreler arasında *in vitro* olarak infeksiyon yapma özelliğine sahip, çomak şeklinde virus formlarıdır.

İkinci safhada ise, nükleus içerisinde üretilen nukleokapsidlerin bir kısmı *de novo* yöntemiyle zarf kazandıktan sonra, küp şeklindeki protein yapılar içerisine gömülerek PIB'leri oluştururlar. AcNPV'ye ait PIB'lerin büyüklükleri 0,5-1,5 µm arasındadır. Genel parçalarını protein matriks ve zarfın oluşturduğu PIB'ler, tabiatta virus enfeksiyonunun larvadan larvaya taşınmasında rol oynayan virus parçacıklarıdır. Bunlar *in vitro* enfeksiyon için gerekli değildir. NPV orjinine bakmaksızın bütün böcek hücrelerini infekte eder ve ölüme neden olur.

AcNPV'nun yapısal özellikleri ayrıntılı olarak incelenmiştir. DNA'sının moleküler ağırlığı tespit edilmiş ve fiziki haritası çıkartılmıştır. Ayrıca, toplam genomuna ait nükleik asit sırası tayin edilmiş, birçok gene tekabül eden DNA zincirleri belirlenerek pek çok genin fonksiyonu aydınlatılmıştır.

Tabiatta, inklüzyon yapılar besinle birlikte larva tarafından alınır. Orta bağırsakta inklüzyon yapılar çözülür ve bu yapılar içerisinde bulunan virus parçacıkları orta bağırsak lümenine salınır. Virus parçacıkları daha sonra özel bir reseptör tarafından tanınma neticesinde membran füzyonu yöntemiyle orta bağırsağın tek tabakalı silindirik hücrelerine geçer. Sitoplazmaya geçen nukleokapsidler, sitoplazmada bulunan F-aktin fiberleri vasıtasıyla sitoplazmadan replikasyon bölgesi olan nükleusa geçerler. Nükleusta virus DNA'sı kapsid örtüden ayrılır. Bu işlem büyük ihtimalle DNA moleküllerine tutulu olan arginin bakımından zengin bir protein olan bazik proteininin fosforilasyonu neticesinde gerçekleşir. Nükleusta, viral DNA replikasyonu ve transkripsiyon işlemleri gerçekleşir.

Replikasyonun başlamasından sonra (enfeksiyondan 8 saat sonra) nukleokapsid inşası oluşur. Bu işlem, yavru virusların, infekte olmuş orta bağırsak hücrelerinin bazal kısmından hemolenf içerisine salınmasıyla sonuçlanır. Bu ekstrasellular virus parçacıkları, daha sonra reseptör bağımlı endositozis yoluyla, hemositler, bağ dokusu hücreleri, yağ dokusu, trakeal elementler, kas hücreleri ve Malpighi tüpleri gibi hemolenfe dönük olan hücreleri infekte ederler. Yeni infekte olan hücrelerde, virus parçacıkları endozomlar içerisine geçerler. Endozom içindeki düşük pH, ECV zarfında mevcut olan glikoprotein gp64'ü harekete geçirir. Bu glikoprotein membran füzyonunu katalizleyerek nukleokapsitlerin sitoplazmaya geçişini sağlar. Bundan sonra salınan nukleokapsitler, yeni bir replikasyon işlemini başlatırlar.

Replikasyon işleminin ikinci basamağında (enfeksiyonları 12 saat sonra) virus parçacıkları artık hemolenf içerisine salınmaz, bunun yerine pirimer ve sekonder olarak infekte olmuş hücrelerin nükleuslarında yeni yapılan polihedra içerisine gömülürler. Sonuç olarak, larva polihedra ile dolar, virus tarafından sentezlenen kitinaz ve katepsinaz

etkilerine yenik düşen larva ölür, böylece çok sayıda polihedra (10^8 - 10^9 / larva) çevreye salınmış olur.

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

1.3.4. Baculovirusların Biyoteknolojik Önemi

1.3.4.1. Baculovirusların Zirai Mücadelede Kullanımı

Kimyasal pestisidlerin olumsuz etkileri, predatör, parazitler ve patojenler gibi biyolojik olarak güvenilir alternatiflerin araştırılmasına sebep olmuştur. Bu gruplar içerisinde bulunan organizma veya biyolojik mücadele ajanları, zararlı böceklerin çoğalmalarını engelleyebildiklerinden zirai mücadelede bunlardan istifade edilmektedir. Bunlar arasından Baculoviruslar etkili, güvenli ve seçici bir biyolojik kontrol ajanıdır (Cunningham, 1995; Miller, 1997; Moscardi, 1999). Kimyasal insektisidlerin aksine faydalı organizmalara ve çevreye zarar vermezler.

Parazit ve predatörler virusları farklı bölgelere taşıyarak infeksiyonun farklı popülasyonlara ulaşmasını sağlarlar. Farklı bölgelerdeki böcek larvaları viruslara karşı aynı hassasiyete sahiptir. Düşük dozla infekte olmuş ergin dişi böcekler virusları yumurtalar vasıtasıyla gelecek generasyona taşır. Genel olarak viruslar bağırsakta çoğaldığı için viral infeksiyon, toplu haldeki larval popülasyon içinde hızlıca yayılabilir. Ayrıca ağaçların üst dallarında infekte olmuş larva kadavralarının parçalanmasıyla dağılan viruslar alt dallardaki diğer kolonileri kolaylıkla infekte edebilmektedir (Yaman vd., 2001).

Zararlı böcekler ile mücadelede yaygın olarak kullanılan kimyasal insektisidlerin çevreye yapmış oldukları yan etkilerden kurtulmak ve geleceğimizi güvence altına almak için biyolojik mücadele yönteminin geliştirilmesi kaçınılmaz olmuştur. Biyolojik mücadelede kullanılan ajanlardan viruslar zararlıların doğal düşmanları olup çoğunlukla sadece o zararlı üzerinde etkiye sahiptir. Böcek viruslarının izole edilip geliştirilerek zararlı böcekler ile mücadelede kullanılması gelecek nesilleri tehdit eden kimyasalların kullanımını azaltacaktır.

Baculovirüsler, çok spesifik olmalarından ve bitki ile omurgalıları infekte etmediklerinden dolayı son zamanlarda zararlı böceklerin kontrolü için virüsler arasında en çok tercih edilenidir. Şimdiye kadar, baculovirüslere karşı herhangi bir dirençliliğe rastlanılmamıştır ve moleküler genetiği detaylı bir şekilde çalışılmıştır. Ayrıca, bu çalışmalar baculovirüslerin genomlarının değiştirilmesine imkan vermiş, yabancı gen ekspresyonu için kullanılmasına ve insektisidal özelliklerin geliştirilmesine yol açmıştır.

Tabiatıta baculovirüsler, duyarlı böcek popülasyonlarının azalmasına sebep olur. Bu ilk olarak 1911'de Reiff tarafından ağaç güvesi hastalığının (bir baculovirüs enfeksiyonu), bir kontrol mekanizması olarak kullanılabileceğini tavsiye etmesiyle başlamıştır. Bu özellik geliştirilerek, baculovirüsler tabii zararlı böcek kontrol ajanı olarak kabul edildiler ve günümüzde bunlar zararlı böceklere karşı kullanılmaktadırlar. Bu amaçla üretilmiş ve ticari olarak satışa sunulmuş bir çok baculovirüs orjinli ürün mevcuttur.

1.3.4.2. Baculovirüslerin Ekspresyon Vektörü Olarak Biyoteknolojide Kullanımı

Tıbbi, endüstriyel ve zirai açıdan önemli olan çeşitli viral, bakteriyel, bitkisel ve hayvansal proteinlerin, değişik özelliklerdeki ekspresyon vektörleri aracılığı ile sentezlenmeleri biyoteknolojide büyük öneme sahiptir.

Baculovirüsler, moleküler biyoloji çalışmalarında iyi bir model olmaları, zirai mücadelede zararlı böceklere karşı kullanılmaları ve son zamanlarda DNA'larından önemli proteinlerin üretilmesinde ekspresyon vektörü olarak yararlanılmalarından dolayı biyoteknolojide yeni bir dönem başlatmıştır (Demirbağ vd., 1998). İlaç, toksin ve besin maddesi gibi çeşitli ürünleri kodlayan ilgili yabancı genler, özellikle hücre kültüründe baculovirüslerin replikasyonu için zorunlu olmayan viral genler yerine klonlanarak, oldukça fazla miktarda üretilmektedirler.

Diğer vektörlere göre baculovirüs ekspresyon vektör sisteminin sahip olduğu üstünlükler ve avantajlar, bunları biyoteknolojinin önemli bir çalışma sahası haline getirmiştir. Pek çok bilim adamı tarafından halen devam ettirilmekte olan, baculovirüslerin daha etkili bir ekspresyon vektörü haline getirilme ve virüs replikasyonunun moleküler mekanizmalarının anlaşılması çalışmaları, bunların gelecekte biyoteknolojinin daha önemli bir materyali olmalarına yardımcı olacaktır.

1.5. Tezin Amacı

Bu doktora tezinde Lepidoptera grubuna ait olan ve önemli bir tarımsal zararlı olarak kabul edilen yüzük kelebeği (*Malacosoma neustria* Lep; Lasiocampidae) ile mücadelede kimyasalların kullanımını azaltacak, ekonomik, çevreye daha duyarlı ve daha etkili viral kontrol ajanlarını geliştirmek amacıyla bu zararlıda doğal olarak hastalık oluşturan virusların tespiti, doğadan izolasyonu, farklı mikroskobik metotlar ve moleküler teknikler ile tanımlanması ve tanımlanan viral patojenlerin biyolojik mücadele ajanı olarak geliştirilmesi amaçlanmıştır.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

Tez süresince çalışılacak en önemli materyallerden biri viral infeksiyonların araştırılacağı *M. neustria* larvalarıdır. Bu nedenle bu böceğin salgın yaptığı dönemlerde toplanmasına büyük özen gösterilmiştir. Toplanan larvalar üzerinde, tez çalışmasında ihtiyaç duyulan virusun bulunması, izole edilmesi, morfolojik ve moleküler özelliklerinin belirlenmesi ve belirlenen virusun biyolojik özelliklerinin aydınlatılması amacıyla çeşitli deneyler yapılmıştır.

2.1. Böceklerin Toplanması

Doktora tezinin çalışılması boyunca ihtiyaç duyulan *M. neustria* larvaları, Samsun, Ordu, Trabzon ve Gümüşhane illerinde bulunan fındık ve meyve bahçelerinde 1999-2002 yılları Nisan-Haziran ayları arasında toplandı. Larvaların toplanması süresince aşağıdaki yöntemler izlendi.

Böceklerin toplandığı konak bitkiler ve bölge tanımlandı. Arazi çalışmaları sırasında bulunan infekte olduğu tahmin edilen larvalar tek tek steril pensler ile Ependof tüplerine aktarıldı. Tespit edilen infekte olmuş larvalar steril su ve pipet yardımıyla bulunduğu yüzeyden alınarak steril tüplere konuldu. İnfekte olmuş larva, larval kalıntı ya da süspansiyonun direkt güneş ışığına maruz kalmamasına dikkat edildi. İstenmeyen kontaminasyonu önlemek amacıyla, her yeni bölge ya da numune için bir çift steril pens kullanıldı. Larvaların toplanması süresince konak, toplanan bölge, tarih ve toplama esnasında dikkat çeken diğer bulgu ve özelliklerin o esnada düzenli olarak yazılmasına özen gösterildi. Toplama işlemi bittiğinde numuneler vakit kaybedilmeden laboratuara getirildi.

2.2. Makroskopik Olarak Virus İnfeksiyonunun Belirlenmesi

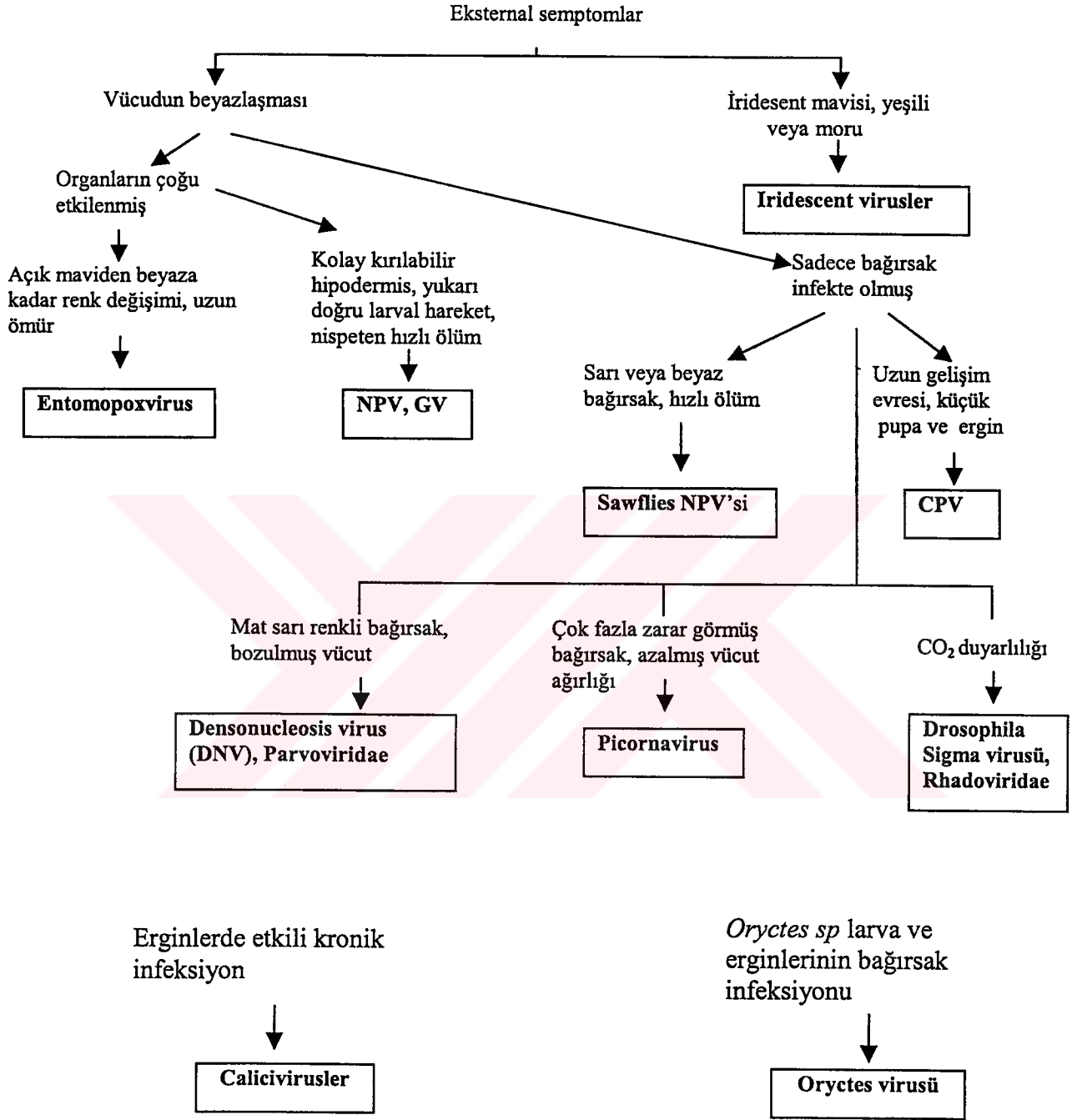
Sağlıklı böceklerin sahip olduğu hayat evresi, hayat evresinin süresi, vücut hacmi, davranış, görünüm gibi kriterler makroskopik incelemede hastalık tipinin belirlenmesinde büyük kolaylıklar sağlamaktadır.

Tablo 2. Böcek viruslarının teşhisi için kontrol listesi

Kriter	Kayıt	Dikkat edilecek temel nokta
Numunenin hayat evresi	Larvalar için instar ideal hayat evresidir	Bir çok infeksiyon larval safhada gerçekleşmeye eğilimlidir. Fakat pupa, ergin ve nadir olarak yumurta safhasıda dikkate alınmalıdır.
Hacim	Vücut uzunluğu, ağırlığı, baş kapsül genişliği	Bu, eşit ölçülere sahip sağlıklı bireye oranla anormallikleri belirler.
Hayat evrelerinin süresi	Normal gelişimine oranla bilinen her hayat safhasındaki zamana dikkat edilir.	Bazı virus grupları, özellikle CPV'ler ve EPV'ler uzun gelişim süresine sahip hayat evrelerini azaltırlar.
Davranış	Genel hareket, beslenme aktivitesi	Normal sağlıklı bireyin davranışı hakkında iyi bir bilgi varsa, geçerli bir özellik olabilir. Artmış aktivite veya aşırı bozulma bu özelliğin derecesini belirler.
Görünüm	Vücut rengine veya herhangi bir görünen organına özellikle bağırsak, yağ dokusu kas ve hipodermise dikkat edilir.	Konak canlılardaki virusların kütle halindeki gelişimi, deri rengini değiştirmeden önce iç organlarda genel renklerin değişimine neden olur. Bazı durumlarda bağırsak rengini değiştirir.

Bu nedenle Tablo 2'de özetlenen kriterler sağlıklı ve hastalıklı böceklerde karşılaştırılarak temelde hangi tip hastalık olduğu tanımlanmaya çalışıldı.

Belirlenen hastalıklardan viral hastalık tipleri çoğu zaman dış semptomlar ile kolayca teşhis edilebilir. Bu nedenle infekte olmuş böceğin sahip olduğu semptomlar temelde hangi tip viral infeksiyon olduğunu belirlememizde büyük kolaylık sağladığından oldukça önemlidir. Bu amaçla Şekil 6'de şematize edilen dış semptomlar kullanılarak şüphe duyulan viral infeksiyonlar teşhis edildi.



Şekil 6. Eksternal semptomlara bağlı olarak temel virus gruplarının tanımlanma şeması

Makroskopik incelemeler sonucunda herhangi bir viral hastalık semptomu gösteren larvalar sıvı azot içine ya da kuru buz karışımına daldırılarak dondurma yöntemiyle öldürüldü. Viral infeksiyon semptomları göstermeyen sağlıklı görünen larvalar, laboratuarda düzenli bir şekilde taze besinler ile pupa oluncaya kadar beslenerek, laboratuvar şartlarında da doğal infeksiyonun gerçekleşmesi sağlandı. İnfekte olmuş bütün numuneler mümkün olduğunca zaman kaybetmeden +4 ya da -20°C’de muhafaza edildi.

Yukarıda verilen Tablo 2 ve Şekil 6’deki bilgiler kullanılarak bu tez süresince toplanan *M. neustria* larvalarında viral bir infeksiyon tespit edildi. Bu nedenle bundan sonraki metotlar bu infeksiyonun tanımlanmasına yönelik olarak uygulandı.

2.3. Mikroskopik Olarak Virus İnfeksiyonunun Belirlenmesi

Tespit edilen viral infeksiyonun histopatolojisini, morfolojik ve anatomik özelliklerini belirlemek için bir seri ışık mikroskobu ve elektron mikroskobu (SEM ve TEM) çalışmaları yapıldı.

2.3.1. Işık Mikroskobu ile Yapılan Çalışmalar

İnfekte olmuş larvalardan direkt hazırlanan doku preparatları 400x ve 1000x büyütmelede ışık mikroskobu (Olympus BH-2) ile incelenerek infeksiyonun hangi dokularda gerçekleştiği belirlendi.

Çeşitli hastalık tipleri, farklı inklüzyon yapılarının varlığı ile karakterize edilir (Burges, Hussey, 1971). Özellikle malpigi tüpleri gibi böcek dokularında organik olmayan kristallerin var olduğu unutulmamalıdır. Organik olmayan bu kristaller çoğu zaman virus inklüzyonlarının şekil ve hacimlerine benzerler. Bu tez süresince virus inklüzyon yapılarını inorganik kristallerden ayırmak için, değişik boyama metodları kullanıldı. Bu metotlar ile ManeMNPV’nun oluşturmuş olduğu PIB’ler belirlendi ve morfolojik özellikleri çalışıldı. Aşağıda kullanılan bu metodlar sırasıyla açıklanmaktadır.

2.3.1.1. Pochil'in Metodu ile Polihedraların Boyanması

Bu boyama için viral infeksiyon varlığı tespit edilen böcek dokularından hazırlanan yayma preperat alev üzerinde 10-12 sn % 1'lik Brillant yeşili veya malaşit yeşili solusyonu dökülerek boyandı. Suyu çalkalandıktan sonra ısıtılarak 3 dakika % 1'lik pikrik asit solusyonuyla boyandı (Lipa, 1975). Işık mikroskobunda 1000x büyütmede yeşilimsi-sarı renkli polihedralar gözlemlendi.

2.3.1.2. Shvetsova'nın Metodu ile Polihedraların Boyanması

Bu yöntemde açık havada kurutulmuş yayma preperat % 70'lik etilalkol ve % 40'lık formaldehit (9 ml alkol + 1 ml formaldehit) karışımı ile 10 dakika fikse edildi. Kurutma kağıdıyla kurutulduktan sonra %1'lik NaOH solüsyonu ile 1 dakika ıslatıldı. Suyu çalkalandıktan sonra % 5'lik eozin solüsyonu ya da % 0.2 alkol solüsyonu ile 3 dakika boyandı. Işık mikroskobunda polihedralar koyu diğer hücre kısımları açık renkli görüldü (Burges, Hussey, 1971).

2.3.1.3. Buffalo Black 12B ile Polihedraların Boyanması

Buffalo Black 12B Naftalin Black 12B, Amido Schwartz veya Acid Black 1 olarakta bilinir. Bu boya şu şekilde uygulandı. Boyanacak preperat açık havada kurutuldu. Buffalo Black solüsyonu 40-45 °C'ye kadar bir ısıtıcı üzerinde boya kabında ısıtıldı. Preperat Buffalo Black solüsyonu içine daldırarak 5 dk. bekletildikten sonra 10 sn musluk suyu altında tutuldu. Preperat kurutulduktan sonra inklüzyon yapılarını belirlemek için immersiye yağ altında incelendi (Hunter-Fujita vd., 1998).

2.3.1.4. Giemsa Boyası ile Polihedraların Boyanması

Giemsa boyası nüklear ve sitoplazmik hücresel ayrıntıları net olarak ayırabilen farklı bir boyadır. Bu yüzden değişik virus gruplarının replikasyon alanlarının teşhisinde yardımcıdır. Bu boya şu şekilde uygulandı. Açık havada kurutulmuş preperat Giemsa fiksatiyi içine daldırarak 2 dk bekletildi. Acan musluk suyunda 10 sn çalkalandı. 6.9 pH'ta 0.02 M fosfat tampon içindeki %10'luk Giemsa boyasında 45 dk boyandı. 10 sn musluk

suyunda çalkalandı. Preperatın çok kırmızı görüldüğü durumlarda 0.02 M tampon içine daldırarak kırmızı renk kayboluncaya kadar bekletildi. Daha sonra tekrar musluk suyunda çalkalandıktan sonra preperat açık havada kurutuldu ve immersiyon yağı kullanarak incelendi (Hunter-Fujita vd., 1998).

Işık mikroskobu için mevcut bir çok boya içinde başlıca iki metot virus teşhisinde özellikle inklüzyon yapıları (IB) oluşturan virusların teşhisine yardımcı olmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Buffalo Black 12 B ve Giemsa boyası Kompleks fiksasyon ve yöntemlerin kullanılmasına gerek kalmadan hızlı teşhiste ve kullanımda basitçe uygulanır.

Buffalo Black 12 B proteini koyu mavi bir renge boyar. Bu yüzden proteinlerin farklı zeminlerden ayrılmasını sağlayan önemli pozitif bir boyadır. Çok sayıdaki zarflı viruslar için olan Giemsa boyası zemini mavi yada kırmızı ile boyarken IB'leri boyamayan negatif bir boyadır.

2.3.2. *Malacosoma neustria* nükleopolihedrovirus (ManeMNPV)'un Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Temel böcek viruslarının morfolojik özelliklerinin çalışılmasında ilk basamak inklüzyon yapıları oluşturup oluşturmadıkları ve oluşturulan inklüzyon yapılarının boyutlarının ölçülmesini içermektedir.

Bu amaçla ilk olarak ManeMNPV virusunun oluşturduğu ve PIB olarak adlandırılan inklüzyon yapıları ölçüldü. Bunun için ışık mikroskobu altında farklı dokularda tesadüfi olarak seçilen 50 PIB'nin çapı mikrometre takımı kullanılarak ölçüldü. Bu ölçümlerin ortalaması hesaplanarak çoğunluğun hangi aralıklar arasında toplandığı belirlendi.

2.3.3. Elektron Mikroskobu ile Yapılan Çalışmalar

Elektron mikroskobu çalışmaları virusların gerek dış yüzeyinin, gerekse iç yapılarının incelenmesinde büyük önem arzetmekte olup, virusların aydınlatılmasında çok değerli veriler sağlamaktadır. Bu nedenle bu tez içinde, izole edilen ManeMNPV'nun taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak ayrıntılı yapısı çalışılmıştır.

2.3.3.1. ManeMNPV'ye Ait PIB'lerin Taramalı Elektron Mikroskobu ile İncelenmesi

ManeMNPV virusuna ait Polihedral İnklüzyon Yapıları (PIB'ler) izole edildikten sonra üç farklı konsantrasyonda seyreltiği hazırlandı. Hazırlanan her bir seyreltikten lameller üzerine ince smearler hazırlandı, açık havada kurutuldu. Her bir numune metanol içinde 2 dk fikse edildikten sonra tekrar açık havada kurutuldu. Lameller üzerine alınan küçük parçalar SEM çalışmalarında kullanılan stampalar üzerine PIB içeren yüzey üste gelecek şekilde yapıştırıldı. 100 nm kalınlığında altın ile kaplandıktan sonra SEM mikroskobu (JSM 6400) ile incelenerek PIB morfolojisi belirlendi ve fotoğrafları çekildi.

2.3.3.2. ManeMNPV'ye Ait PIB'lerin Transmisyon Mikroskobu ile İncelenmesi

Bu çalışmada tespit edilen NPV'unun SNPV'mi yoksa MNPV'mi olduğunu belirlemek ve sahip olduğu virionların morfolojik özelliklerini tespit etmek için bir seri TEM mikroskobu çalışmaları yapıldı.

Bu amaçla infekte olmuş larval doku % 2,5'luk glutaraldehitte 5 saat oda sıcaklığında fikse edildi. Kakodilat tamponu ile yıkandıktan sonra, %2'lik OsO_4 'de 2 saat postfiksasyona tabii tutuldu. % 30'dan saf alkole uzanan etanol serilerinden geçirilerek dehidrasyona tabii tutuldu. Dehidrasyondan sonra numune epoxy resin'e gömülerek çok ince kesitler alındı ve bu kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandı (Keddie, Erlandson, 1995, Radek, Fabel, 2000). Kesitler Philips JM 208 marka elektron mikroskobunda incelendi.

2.4. Moleküler Yöntemler ile ManeMNPV'nün Belirlenmesi

Viral infeksiyon varlığının tam doğru tespiti ve tespit edilen virusun karakterizasyonu moleküler teknikler kullanılarakda yapılmaktadır. Bu teknikler için öncelikle PIB'ler saflaştırıldıktan sonra virionlar elde edildi ve bu viruse ait DNA izole edildi. Bu işlemler aşağıda açıklandığı gibi gerçekleştirildi.

2.4.1. İnfekte Olmuş Böceklerden Polihedral İnküzyon Yapılarının (PIB) Saflaştırılması

Ağır infeksiyon gösteren bir larva Eppendorf tüpü içinde 0,5 ml STE-C (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA; 50 mM NaCl; 10 mM Cysteine) tamponu ile ezildi. Elde edilen larval süspansiyona 1 mg/ml SDS ve 0,066 mg/ml DNaz içeren STE-C'den 1 ml eklendikten sonra 20 dk sallayıcıda, oda sıcaklığında bekletildi. 1000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek böcek dokuları çöktüldü ve PIB içeren üst sıvı yeni tüpe aktarıldı (Levin vd., 1997).

Pellet 500 µl % 0,1'lik SDS ile karıştırıldı ve yeniden 1.000 rpm'de santrifüj edilerek böcek dokularına karışan PIB'lerin süpernatanta geçmesi sağlandı ve süpernatant bir önceki süpernatanta eklendi. Süpernatant 6000 rpm'de 15 sn santrifüj edilerek daha hafif böcek dokuları çöktürüldü ve elde edilen süpernatant yeni tüpe aktararak 12.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek PIB'ler çöktürüldü. Süpernatant alındıktan sonra yeniden 12.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek kalan PIB'ler çöktürüldü ve bir önceki PIB içeren pellete eklendi.

Elde edilen pellet 750 µl suda çözüldü ve 12.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Dipteki gri renkli PIB tabakasının üstündeki siyah ince böcek dokularını içeren tabaka süpernatant ile birlikte nazikçe alındı (Kelly vd., 1989). PIB içeren pellet 150 µl % 0,1'lik SDS ile çözülerek -20'de muhafaza edildi (Strokovskaya vd., 1996).

2.4.2. Virionların Elde Edilmesi

Elde edilen 150 µl'lik PIB solüsyonuna 30 µl 0,5 M EDTA ve 3 µl proteinaz K ilave edilerek 37°C'de 1,5 saat sabit sallamada bekletildi. 17 µl 1 M Na₂CO₃ ilave edilip 37°C'de 20 dk bekletilerek polihedralardan virionların salınması sağlandı. Çözülmemiş polihedralar 5.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek çöktürüldü. Virion içeren süpernatant başka bir tüpe aktarıldı.

2.4.3. Viral DNA'nın Elde Edilmesi

Elde edilen viral partiküller 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA içinde çözüldükten sonra viral DNA'nın salınması için 37°C'de 1 saat 1/20 hacim proteinaz K

(20mg/ml) ve 1/10 hacim %10'luk SDS ile muamele edildi. Viral DNA bir fenol:kloroform (1:1), bir fenol:kloroform:izomilalkol (25:24:1) ve bir kloroform:izomilalkol (24:1) ekstraksiyonunun takip ettiği, 1 dakikalık, 13.000 rpm'deki üç ekstraksiyon ile saflaştırıldı (Ward vd., 1987; Kondo vd., 1994; Lewin vd., 1997).

2.4.4. DNA-DNA Hibridizasyonu ile NPV'lerin Belirlenmesi

2.4.4.1. Hibridizasyonda Kullanılacak Probların Elde Edilmesi

Hibridizasyon deneyi için AcNPV'nun polihedrin genine özgü işaretli problar kullanıldı. Bu problar, *Autographa californica* NPV'nün polihedrin geninin bir bölümü, Acp2F; 5'-TAG GTG TAC GAC AAC AAG T-3' ve Acp2R; 5'-TTG TAG AAG TTC TCC CAG AT-3' primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı.

PCR reaksiyonun gerçekleştirilmesi için, 33.5 µl steril su, 5 µl 10xPCR tamponu, 3 µl 25 mM MgCl₂, 2.5 µl 2 mM dört farklı dNTP, 0.5 µl primer 1(20 µM), 0.5 µl primer 2 (20 µM), 0.4 µl Tag DNA polimeraz (10 ünite/ml) ve 3 µg kalıp DNA kullanıldı. Bunun için hazırlanan reaksiyon karışımından her bir numune için 45 µl alınarak, 0.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine konuldu ve kalıp DNA kontrol hariç her bir tüpe ilave edildi (Moraes, Maruniak, 1997). Daha sonra her bir numune, başlangıç denatürasyonu için 94°C'de 2 dakika tutulduktan sonra 94 °C'de 1 dakika, 60°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika şeklinde 40 kez döngü sağlandıktan sonra 72°C'de 6 dakika tutularak PCR reaksiyonu durduruldu. Her PCR ürününden 12 µl kullanılarak ürünler %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra jelden kesilerek alındı.

Fragmentin jelden temizlenmesi Ultrafree-DA (Millipore) tüpleri kullanılarak gerçekleştirildi. Jelden kesilen DNA fragmenti tüplerin filtre ihtiva eden üst kısmına yerleştirilerek kapak kapatıldı. 5.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Tüpün üstündeki filtre kısmı çıkartıldı, altta toplanan sıvı -20 °C'de muhafaza edildi.

2.4.4.2. Probların İşaretlenmesi

Elde edilen PCR ürünlerinden 4 µl alınarak 12 µl dH₂O eklendi. 10 dk kaynayan su içinde bekletildi. Hemen buz üzerine alınıp karıştırıldıktan sonra 4 µl Dig-High Prime

(Vial 1, Roche Diagnostics GmbH)'den ilave edildi ve santrifüj edildi. 37°C'de 16 saat inkübasyondan sonra 65°C'de 10 dk bekletilerek reaksiyon durduruldu. Kullanılncaya kadar -20'de muhafaza edildi.

2.4.4.3. Hibridizasyon Yöntemi

Hibridizasyon prosedürü Ward vd.,(1987) tarafından açıklanan metod modifiye edilerek gerçekleştirildi. ManeMNPV'ye ait viral DNA'dan 3 µg nitroseluloz membrana geçirildi. Pozitif kontrol olarak AcNPV DNA'sı, negatif kontrol olarakta infekte olmamış, sağlıklı böcek homojenatından slot-blot cihazı (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) yardımıyla membrana uygulandı. Oda sıcaklığında 30 dk kurutulduktan sonra, numuneler 5 dk UV ışığı ile muamele edilerek membrana bağlandı. Prehibridizasyon öncesi membran 2 x SSC, % 1'lik SDS içerisinde 65°C'de 30 dk iki kez yıkandı. Prehibridizasyon ve hibridizasyon Roche Diagnostics GmbH (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I) tarafından tavsiye edilen prosedüre göre gerçekleştirildi.

2.4.5. Viral DNA'ların Restriksiyon Endonükleaz Analizi

Saflaştırılan viral DNA restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek karşılaştırıldı. Bunun için viral DNA 6 saat 37°C'de 5 ünite restriksiyon enzim/1 mg DNA ile kesildi. Her bir restriksiyon enzimi (*Bam*HI, *Eco*RI ve *Hind* III) tavsiye edilen uygun tampon kullanılarak DNA ile inkübe edildi (Harvey, Tanada, 1985).

2.4.5.1. DNA Fragmentlerinin Agaroze Jel Elektroforezi

DNA fragmentleri % 0.8'lik agaroz jel kullanılarak 22 V'ta 16 saat'lık bir sürede ayrıldı. DNA fragmentlerinin moleküler ağırlığı restriksiyon enzimleri ile kesilmiş λ DNA'sının fragmentleri ile karşılaştırılarak hesaplandı (Allway, Payne, 1983).

2.4.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile NPV'lerin Belirlenmesi

PCR ile NPV'lerin hızlı ve doğru tespiti son zamanlarda en çok kullanılan bir metottur. Birçok NPV virusu PCR ile tespit edilmiş ve bu viruslara ait polihedrin genine özgü primerler belirlenmiştir. Bu çalışmada da ManeMNPV virusu PCR ile belirlenmiştir. PCR ile virus varlığı belirlenirken, her bir virus için muhtemel kontaminasyonları önlemek için ayrı bir PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Her reaksiyon için, kalıp DNA hariç bütün PCR elemanlarının bulunduğu negatif kontrol kullanıldı (Moraes, Maruniak, 1997). PCR reaksiyonu için şu primerler kullanıldı.

R- 5' TTG TAA(G) AAG TTC(T) TCC CAG-3'

F- 5' TAT GTT TAT GAT AAT AAA-3'

PCR reaksiyonun gerçekleştirilmesi için, 33.6 µl steril su, 5 µl 10xPCR tamponu, 3 µl 25 mM MgCl₂, 2.5 µl 2 mM dNTPs, .5 µl primer 1(20 µM), 0.5 µl primer 2 (20 µM), 0.4 µl *Tag* polimeraz (10 ünite/ml) ve 3 µg ManeMNPV DNA'sı kullanıldı. Bunun için hazırlanan reaksiyon karışımından her bir numune için 45 µl alınarak, 0.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine konuldu ve kalıp DNA kontrol hariç her bir tüpe ilave edildi. Daha sonra her bir numune, başlangıç denatürasyonu için 94°C'de 2 dakika tutulduktan sonra 94 °C'de 1 dakika, 60°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika şeklinde 40 kez döngü sağlandıktan sonra 72°C'de 6 dakika tutularak PCR reaksiyonu durduruldu. Her PCR ürününden 12 µl kullanılarak ürünler agaroz jelde gösterildi.

2.4.7. ManeMNPV'na Ait Polihedrin Geninin Sekans Analizi

PCR ürünleri pDrive Cloning Vector (Quiagen, Hilden, Germany) olarak bilinen bir klonlama vektörüne aktarıldı. *E. coli* (DH5 suşu) hücreleri standart metodlar kullanılarak elektrotransformasyon için kullanıldı. Transform olmuş hücreler 100 µg/ml Ampicillin içeren LB ortamına ekildi ve 37 °C'de büyütüldü. Pozitif klonları seçmek için standart T7 ve SP6 primerleri kullanılarak PCR yapıldı. Plasmid DNA bakterilerden "The Nucleo Spin Plasmid Kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Germany)" kullanılarak izole edildi. Her iki zincirin DNA-sekanssı analizi T7 ve SP6 primerleri kullanılarak MWG (Ebersberg, Germany) ile gerçekleştirildi.

2.5. ManeMNPV'nun İnfeksiyon Özelliğinin Belirlenmesi

ManeMNPV'nun infeksiyon özelliğini belirlemek için bu virusa ait PIB yapılar hemositometre ile sayılarak konsantrasyonları 1×10^8 PIB/ml olacak şekilde ayarlandı (Stairs, 1964). Bu konsantrasyondaki PIB solüsyonu taze yapraklara sürüldükten sonra yapraklar açık havada kurutuldu. 25 adet birinci instar *M. neustria* larvasını içeren her bir deney grubu bu yapraklar ile pupa oluncaya kadar beslendi. Kontrol grubu virus ile muamele edilmemiş yapraklar ile beslendi (Ziemnicka, 1981). Her iki deney grubunun besinleri günlük olarak taze besinler ile değiştirildi. Ölen larvalar hemen alınıp diseksiyonları yapılarak mikroskop altında ölüm nedenleri belirlendi ve ölüm oranı günlük olarak kaydedilerek deney sonucunda oranlar aşağıda belirtilen Abbott (1925) formülü ile hesaplandı.

Abbott formülü : $100 \times (\text{Test grubundaki ölüm yüzdesi} - \text{Kontrol grubundaki ölüm yüzdesi}) / (\%100 - \text{Kontrol grubundaki ölüm yüzdesi})$

Bu deneyler farklı zamanlarda iki kez tekrarlanarak iki deneyin ortalaması sonuç olarak alındı.

2.6. ManeMNPV'nun Histopatolojisinin İncelenmesi

Larvaların diseksiyonu süresince ManeMNPV'nun hangi dokuları infekte ettiği araştırıldı. Bu amaçla fizyolojik su içinde diseksiyonu yapılan larvaların farklı dokuları mikroskop altında incelenerek infeksiyonun hangi dokularda gerçekleştiği belirlendi. Tespit edilen infekte olmuş dokuların fotoğrafları çekildi.

2.7. ManeMNPV'nun Konak Hassasiyetinin Belirlenmesi

Baculoviruslar çoğu zaman dar bir konak spektrumuna sahiptirler. Bu nedenle tespit edilen bir baculovirusun konak spektrumu oldukça önem kazanmaktadır. ManeMNPV virusunun konak spektrumunu belirlemek için *Gypsonoma dealbana* (Lep; Tortriciidae), *Cydia pomonella* (Lep; Tortriciidae), *Euproctis chrysorrhoea* (Lep; Lymantriidae), *Pieris*

brassicae (Lep; Pieridae), *Yponomeuta malinellus* (Lep; Yponomeutidae) ve *Hyphantria cunea* (Lep; Arctidae) larvaları kullanıldı. İnfeksiyon testlerinde 1×10^8 PIB/ml oranında ManeMNPV kullanıldı. Her böceğe ait 25 adet larva ManeMNPV'ye ait PIB'ler ile bulaştırılmış yapraklar ile beslendi. Kontrol grubu virus ile muamele edilmemiş yapraklar ile beslendi. Her iki deney grubunun besinleri günlük olarak taze besinler ile değiştirildi. Ölen larvalar hemen alınıp diseksiyonları yapılarak mikroskop altında ölüm nedenleri belirlendi ve ölüm oranı günlük olarak kaydedilerek deney sonucunda oranlar Abbott formülü ile hesaplandı (Abbott, 1925). Bu deneyler farklı zamanlarda iki kez tekrarlanarak iki deneyin ortalaması sonuç olarak alındı.

2.8. ManeMNPV'nun Optimum İnfeksiyon Sıcaklığının Belirlenmesi

Literatürde farklı NPV'lerin böcekleri farklı sıcaklıklarda infekte ettikleri tespit edilmiştir. NPV'lerinin böceklerde gelişimi sıcaklığa bağlıdır. Yüksek sıcaklık hastalığın düşük sıcaklıklardakinden daha hızlı gelişmesini sağlar (Krieg, 1955; 1968). Bu nedenle ManeMNPV'nun optimum infeksiyon sıcaklığını belirlemek için aynı dozda virus konsantrasyonu aynı instar larvalara üç farklı grupta uygulandı (Ziemnicka, 1981). Bu gruplar 20°C, 25°C ve 30°C'de beslenerek infeksiyonun gerçekleşmesi sağlandı. Her sıcaklıkta gerçekleşen ölümler günlük olarak kaydedilerek deney sonucunda oranlar Abbott formülü (Abbott, 1925) ile hesaplandı. Bu deneyler farklı zamanlarda üç kez tekrarlanarak üç deneyin ortalaması sonuç olarak alındı.

2.9. ManeMNPV'nun Vertikal İnfeksiyonunun Belirlenmesi

Böcek viruslarının yağmur vasıtasıyla yapraklardan ya da ölü larvalardan toprağa geçtikleri bilinmektedir (Mohamed vd., 1982). Toz, rüzgar ve yağmur muhtemelen NPV'yi topraktan yaprak yüzeylerine taşır (Olofson, 1988a; Entwistle vd., 1983). Ayrıca ağaçların üst dallarında infekte olmuş larva kadavralarının parçalanmasıyla dağılan PIB'ler alt dallardaki diğer kolonileri kolaylıkla infekte edebilmektedir (Cunningham ve Entwistle, 1981). Düşük dozla infekte olmuş dişi NPV'yi yumurtalar vasıtasıyla gelecek generasyona taşıyabilmektedir. Böyle dişi bireyler yumurtlama esnasında yumurta yüzeylerini NPV'ler ile kontamine ederek taşınımında rol oynarlar. Viruslar konak generasyonları arasında ya da yıllarca toprakta infeksiyon özelliklerini koruyabilirler (Olofson, 1988b; Olofson, 1988c; Weseloh, Andreadis, 1986).

Malacosoma neustria kısa bir larval periyoda sahiptir. Bu nedenle ManeMNPV'nun bu kısa periyotta taşınımı ve yeni generasyona aktarımı oldukça önem arz etmektedir. ManeMNPV'nun taşınımında düşük dozda infekte olmuş dişilerin büyük rol oynadığı düşünülmektedir. ManeMNPV'nun taşınımında dişi bireylerin rolünü belirlemek için larvalar yumurtadan çıkmadan önce Mayıs ayının ilk haftasında dişi bireylerin bıraktığı yumurta kümeleri toplanarak laboratuara getirildi. Dört yumurta kümesi çalışmada kullanıldı. Her yumurta kümesi ikiye bölünerek, yumurtaların yarısının yüzeyleri ince bir fırça yardımıyla sterilize edildi ve Mayısın ikinci haftasıyla birlikte yüzey sterilizasyonu uygulanmış ve uygulanmamış yumurtalardan çıkmaya başlayan larvalar ince uçlu iğne yardımıyla nazıkçe ayrı ayrı alınarak besleme kaplarına konuldu. Her iki gruba ait larvalar daha önceden alınmış ve UV ile muamele edilmiş taze yapraklar ile 21 gün süre ile beslendi. Her iki gruptaki ölüm oranları günlük olarak kaydedildi.

2.10. ManeMNPV'nun Horizontal İnfeksiyonunun Belirlenmesi

NPV'ler bağırsakta replike olduğu için viral infeksiyon, toplu haldeki larval populasyon içinde hızlıca yayılabilir. Baculovirusların taşınımı ve populasyon içindeki diğer bireylere ulaşarak onlarda infeksiyon oluşturmaları, bu virusların biyolojik mücadelede kullanımı açısından büyük önem arz etmektedir. ManeMNPV'de horizontal infeksiyonu belirlemek için üç deney grubu oluşturuldu. Birinci grupta 50 larva ManeMNPV ile infekte edildi. Bu grup pozitif kontrol olarak kullanıldı. İkinci grupta önce 50 larva ManeMNPV ile muamele edilmiş yapraklar ile beslendikten 7 gün sonra bu gruba önceden ManeMNPV ile muamele edilmemiş yapraklar ile beslenmemiş 50 sağlıklı larva eklendi ve oluşan yeni grup ManeMNPV ile muamele edilmemiş taze yapraklar ile beslendi. Üçüncü grupta ise sağlıklı 50 larva virus ile muamele edilmemiş taze yapraklar ile beslendi. Bu grupta negatif kontrol olarak kullanıldı. Her üç grupta gerçekleşen ölümler günlük olarak kaydedilerek deney sonucunda oranlar Abbott formülü ile hesaplandı.

3. BULGULAR

3.1. *Malacosoma neustria*'da Viral İnfeksiyonun Belirlenmesi

1998-2002 yılları arasında çalışılan bu doktora tezinde, Lepidoptera grubuna ait olan ve önemli bir tarımsal zararlı olarak kabul edilen yüzük kelebeği (*Malacosoma neustria* Lep; Lasiocampidae)'nde hastalık oluşturan viral patojenler ve bunların biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılma potansiyeli araştırılmıştır. Tez süresince yapılan çalışmalar sonucunda, Samsun, Ordu, Trabzon ve Gümüşhane illerinden temin edilen böceğe ait numunelerden sadece Gümüşhane (Köse) yöresinden toplanan larvalarda Baculoviridae familyasına ait bir nukleopolihedrovirusu (NPV) tespit edildi.

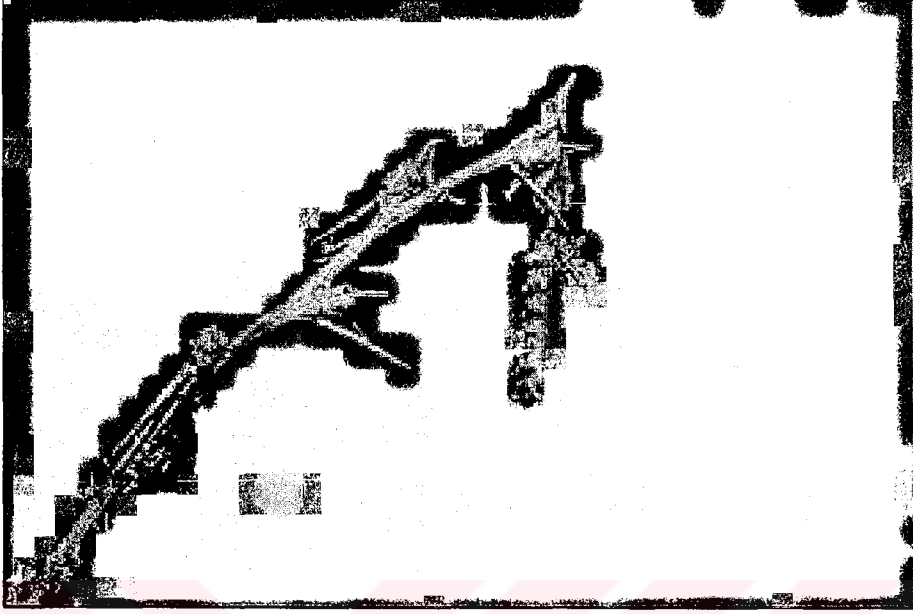
Arazi çalışmaları sırasında tespit edilen virus enfeksiyonu Mayıs son günleri ve Haziranın ilk günlerinde larvaların çıkışıyla birlikte her yıl gözlemlendi.

3.1.1. Viral İnfeksiyonun Makroskopik Görünümü

Virus varlığı ilk olarak infekte olmuş taze böcek dokularının doğrudan incelenmesiyle tespit edildi. Arazi çalışmalarında bazı larvaların önce uyuşuk bir hal aldıkları, hareketlerinin yavaşladıkları, yemelerine son verdikleri, ölmeden önce ağacın tepesine tırmandıkları ve arka bacaklarından asılı olarak öldükleri ve ölen larvaların vücutlarının sıvı hale geçtiği gözlemlendi (Şekil 7).

Gözlenen genel hastalık semptomları *Malacosoma neustria* larvalarında Baculoviridae familyasına ait olan bir NPV enfeksiyonu olduğunu gösterdi. Virus ile infekte olan *M. neustria* larvaları tipik NPV enfeksiyonuna ait hastalık semptomlarını gösterdi.

Arazi çalışmaları sırasında viral enfeksiyonun larval koloniler içinde oldukça yoğun olduğu, bir larvadaki diğerine kolaylıkla bulaşabildiği gözlemlendi. Çoğu zaman enfeksiyonun tespit edildiği larva gruplarında hemen hemen tüm grup üyelerinde görüldüğü tespit edildi.



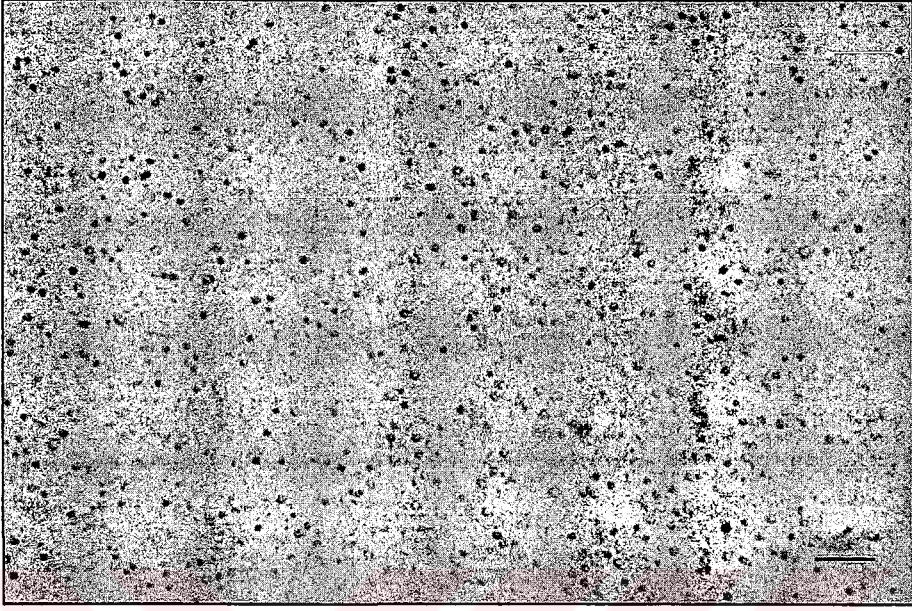
Şekil 7. Nukleopolihedrovirus ile infekte olmuş *Malacosoma neustria* larvası

3.1.2. Viral İnfeksiyonun Mikroskopik Olarak Belirlenmesi

3.1.2.1. Işık Mikroskobu ile Viral İnfeksiyonun Belirlenmesi

Laboratuara getirilen ve makroskopik incelemeler sonucunda viral hastalık varlığından şüphe edilen larvaların mikroskopik inceleme sonuçları aşağıda verilmiştir.

Işık mikroskobu çalışmaları direkt dokunun incelenmesi ve farklı boyama metodları ile virus inklüzyon yapılarının boyanarak belirlenmesi şeklinde olmak üzere iki şekilde gerçekleştirildi. Doğrudan taze dokuların incelenmesi çalışmalarında, infekte olmuş dokulardaki çekirdek ve sitoplazma incelenen normal dokular ile karşılaştırılarak net bir şekilde ayırt edildi. Taze preparatlardaki doku hücrelerinde ayrıntının kaybolması, özellikle çekirdeğin dağılması, çekirdek ya da sitoplazmada sık materyalin görünümü infeksiyonu ve virojenik bir gelişimi gösterdi. İnfeksiyonun çok ilerlediği durumlarda NPV'ye ait PIB yapıları süspansiyon halinde kolaylıkla gözlenebildi (Şekil 8).



Şekil 8. NPV ile infekte olmuş larval dokudan direkt olarak hazırlanmış preparatta PIB yapıları (Barlar: 10 μ m)

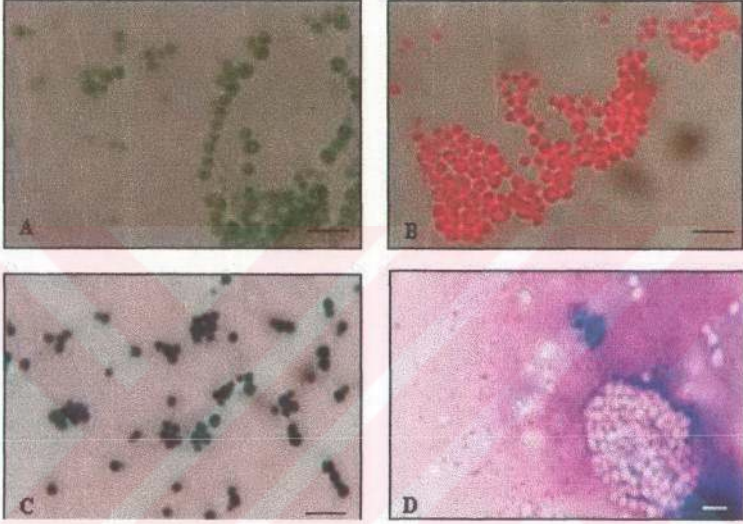
Çeşitli hastalık tipleri, farklı inklüzyon yapılarının varlığı ile karakterize edilir. Özellikle malpigi tüpleri gibi böcek dokularında organik olmayan kristaller mevcuttur. Organik olmayan bu kristaller çoğu zaman virus inklüzyonlarının şekil ve hacimlerine benzerler. Virus inklüzyon yapılarını inorganik kristallerden ayırmak ve bunları tespit etmek için, değişik boyama metodları kullanıldı. Boyama metodlarıyla da infekte edilmiş hücrelerin ayrıntıları ayırt edilebildi.

Pochil'in boyama metodu kullanılması sonucunda ManeMNPV'ye ait olan Polihedral Inklüzyon Yapıları (PIB) açık yeşilimsi-sarı renkli olarak görüldüler (Şekil 9A).

Shvetsova'nın yöntemi ile açık havada kurutulmuş yayma preperatın boyanması sonucunda ışık mikroskobunda polihedralar pembe renkli diğer hücre kısımları açık renkli görüldü (Şekil 9 B).

Buffalo Black 12B Naftalin Black 12B, Amido Schwartz veya Acid Black 1 olarakta bilinir. Bu boyama sonucunda ışık mikroskobunda polihedralar siyah renkli olarak görüldü (Şekil 9 C).

Giemsa boyası nüklear ve stoplazmik hücresel ayrıntıları net olarak ayırabilen farklı bir boyadır. Bu yüzden değişik virus gruplarının replikasyon alanlarının teşhisinde yardımcıdır. Bu boyama sonucunda PIB'ler renksiz, diğer yapılar koyu mavi renkli göründü (Şekil 9 D).

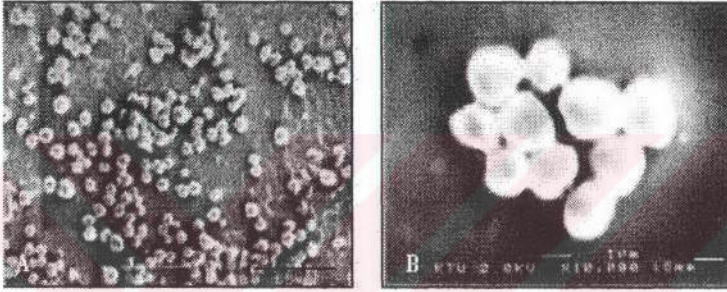


Şekil 9. Farklı boyama metotlarıyla tespit edilmiş PIB yapıları. A) Pochil'in metodu ile boyanmış açık yeşil renkli PIB'ler, B) Shvetsova'nın yöntemi ile boyanmış pembe renkli PIB'ler, C) Buffalo Black 12B ile boyanmış siyah renkli PIB'ler, D) Giemsa boyama neticesinde çekirdek içinde renksiz PIB'ler (Barlar: 5 μ m)

Tespit edilen viral ajanın nükleopolihedrovirus'mu yoksa sitoplazmik polihedrovirus'mu olduğunu belirlemek için yapılan diferansiyel giemsa boyama metodunda tespit edilen viral ajanlar giemsa zonunda renksiz, pikrik asit-giemsa zonunda renksiz yada sarı ve buffalo black zonunda siyah boyandı.

3.1.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile ManeMNPV'nun İncelenmesi

SEM mikroskobu çalışmalarında ManeMNPV'ye ait polihedraların genellikle yuvarlak, düzensiz, çok kenarlı bir şekile sahip oldukları tespit edildi (Şekil 10 A, B). Polihedra grupları içinde çoğu zaman normalden çok daha fazla büyük yada çok daha küçük polihedral yapılar tespit edildi.



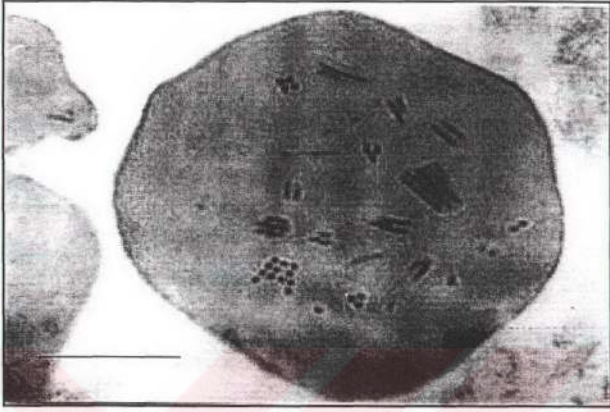
Şekil 10. ManeMNPV'ye ait PIB'lerin SEM Mikroskobunda görünümü
(Bar: A, 10 μ m; B, 1 μ m)

3.1.2.3. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile ManeMNPV'nun İncelenmesi

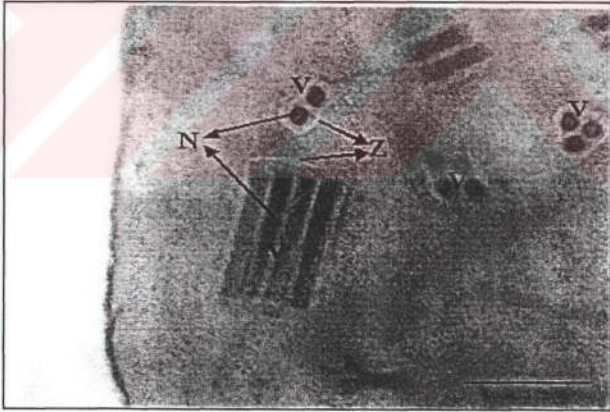
Baculovirüslerden nukleopolihedrovirüsler sahip oldukları her bir virionun içerdiği nukleokapsid sayısına dayanılarak iki temel gruba ayrılırlar.

Tespit edilen NPV'nun her bir virionunun içerdiği nukleokapsid sayısının bir ya da birden çok olduğunu belirlemek için yapılan elektron mikroskobu çalışmalarında izole edilen virusa ait her bir virionun Şekil 12 ve 13'te görüldüğü gibi birden çok nukleokapsite sahip olduğu ve ortalama 300 nm uzunluğunda olduğu tespit edildi (Şekil 11). Her virionda 2 ila 18 adet arasında nukleokapsid gözlemlendi. Bu nukleokapsidlerin 240 x 35 nm boyutlarında olduğu belirlendi (Şekil 12 ve 13).

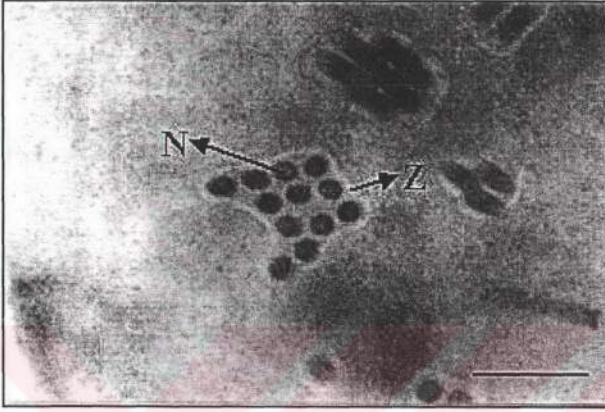
Elde edilen sonuçlar literatürdeki mevcut virion ölçüleriyle karşılaştırıldı.



Şekil 11. ManeMNPV'ye ait PIB'lerin TEM'deki enine kesiti
(Bar: 0.5µm)



Şekil 12. ManeMNPV'ye ait bir virionun TEM'deki boyuna kesiti
V: Virion, Z: Zarf, N: Nukleokapsid (Bar: 300 nm)



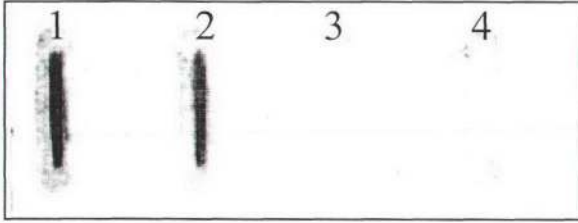
Şekil 13. ManeMNPV'ye ait bir virionun TEM'deki enine kesiti;
Z: Zarf, N: Nukelokapsid (Bar: 300 nm)

3.2. Moleküler Yöntemler ile ManeMNPV'nün Belirlenmesi

3.2.1. DNA-DNA Hibridizasyon ile NPV'lerin Belirlenmesi

Tespit edilen virusun Baculoviridae familyasından NPV grubuna ait bir virus olduğunu kanıtlamak için bu gruptan detaylı çalışılmış bir virus olan AcMNPV virusundan elde edilmiş proplar kullanılarak yapılan hibridizasyon sonucunda AcMNPV (pozitif kontrol) ve ManeMNPV'de hibridizasyon olurken sağlıklı böcek homojenatında (negatif kontrol) hiçbir hibridizasyon olmadı.

Hibridizasyon sonuçları Şekil 14'te gösterilmektedir.



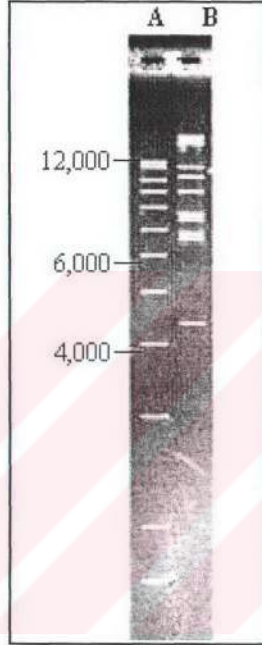
Şekil 14. ManeMNPV'nun DNA-DNA hibridizasyon yöntemi ile belirlenmesi; 1-AcMNPV (Pozitif Kontrol), 2-ManeMNPV (İnfekte olmuş *M. neustria* larvalarından izole edilmiş), 3-Sağlıklı larva homojenatı (Negatif Kontrol), 4- Boş gözcük (Negatif Kontrol)

3.2.2. Viral DNA'nın Restriksiyon Endonükleaz Analizi

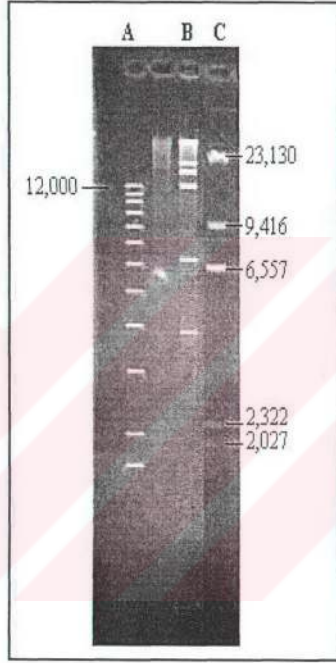
Restriksiyon endonükleaz analizi baculovirusların karşılaştırılmasında günümüzde çok kullanılan moleküler metotlardan biridir. Farklı ülkelerde tespit edilen viral suşların karşılaştırılmalarında kullanıldıkları gibi, aynı ülke içersinde farklı bölgelerden izole edilen farklı suşların karşılaştırılmalarında da kullanılırlar.

Üç farklı enzim kullanılarak gerçekleştirilen ManeMNPV genomunun restriksiyon endonükleaz analizi her bir enzim için farklı sayıda ve büyüklükte *EcoRI*, *BamHI* ve *HindIII* fragmentlerini oluşturdu. REN analizleri sonucunda 12 kb üzerinde *HindIII* için bir fragment oluşurken, *EcoRI* enzimi için iki ve *BamHI* enzimi için ise 3 fragmentin oluştuğu tespit edildi.

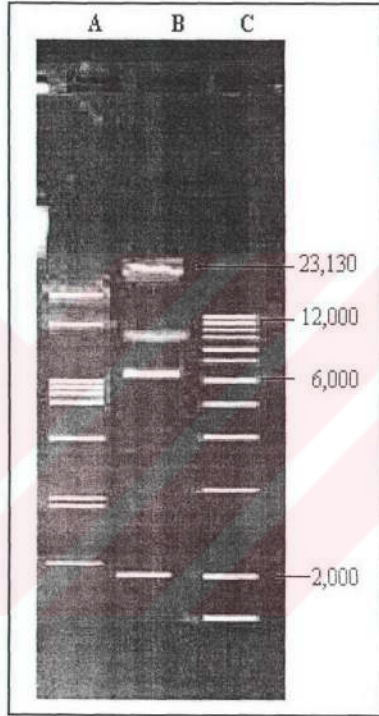
Bu fragmentlerin kullanılan enzimlere göre dizilişleri Şekil 15, 16 ve 17'de verilmektedir.



Şekil 15. *EcoR* I ile kesilmiş ManeMNPV DNA'sının agaroz jel elektroforezi. A: Moleküler işaret (1 kb plus DNA işaret, 0.8 µg/Göz, Gibco), B: *EcoR* I ile kesilmiş ManeMNPV DNA'sı



Şekil 16. *Bam*HI ile kesilmiş ManeMNPV DNA'sının agaroz jel elektroforezi. A: Moleküler işaret (1 kb plus DNA işaret, 0.8 µg/Göz, Gibco), B: *Bam*HI I fragmentleri, C: λ DNA/*Hind* III işareti (Gibco, 0.8 µg/Göz)



Şekil 17. *Hind* III ile kesilmiş ManeMNPV DNA'sının agaroz jel elektroforezi. A: *Hind* III fragmentleri, B: λ DNA/*Hind* III işareti (0.8 μ g/Göz, Gibco), C: Moleküler işaret (1 kb plus DNA işaret, 0.8 μ g/Göz, Gibco)

3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile ManeMNPV'nun Belirlenmesi

ManeMNPV'ye ait polihedrin geni PCR ile çoğaltılarak agaroz jelde gösterildi (Şekil 18). PCR sonucunda polihedrin geni için beklenen yaklaşık 600 bp'lik bir fragment elde edildi.



Şekil 18. PCR ile çoğaltılmış ManeMNPV'ye ait polihedrin geni

3.2.4. ManeMNPV'na Ait Polihedrin Geninin Sekansı

PCR yöntemiyle çoğaltılan ManeMNPV Türk izolatının polihedrin geninin sekansı aşağıdaki gibi tespit edildi.

```
TATGTTTATG ATAATAAATA TTACAAAAAC CTCGGACATG TGATCAAAAA
CGCCAAGCGC AAGAAGAATG CCGCCGAGCA CGAGCTAGAA GAGCGCAACC
TGGACCCCCT TGACAAGTAC TTAGTGGCCG AAGATCCTTT CTTGGGACCT
GGCAAAAACC AAAAATCAC ATTGTTCAAG GAAATTCGTA ATGTCAAACC
GGACACGATG AACTCATCG TAACTGGAG CGGCAAAGAG TTTCTGCGTG
AAACTTGGAC CCGTTTCATG GAAGACAGCT TCCCCATTGT CAACGACCAG
GAAATAATGG ACGTGTCTTCT AGTGGTCAAC ATGCGCCCAA CGAAACCGAA
```

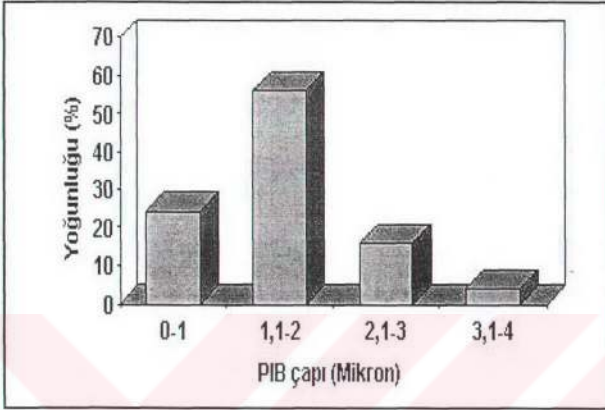
CCGTTGTTTC AGATTTTGG CTCAACACGC GTTACGGTGT GACTCTGACT
 ATGTTCCGCA CGAGGTGATC AGGATTGTGG AACCTTCGTA CGTAGGTAGC
 AACAACGAGT ACCGCATCAG TTTGGGCAAA CGATACAACG GATGCCCAGT
 TATGAACTTG CATTCAAGT ACACCAATTC CTTTGAAGAT TTCATCAACC
 GAGTGATCTG GGAAAACTT

Belirlenen bu polihedrin geni baz sırası gen bankasında mevcut diğer NPV polihedrin genleriyle karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma sonucunda bu genin, bu virusun Letonya izolatu ile %99, Ukrayna izolatu ile ise de %98 oranında bir benzerlik gösterdiği belirlendi. ManeMNPV geni Lasiocampidae familyasından sonra en çok benzerliği sırasıyla Noctuidae ve Lymantriidae familyasının üyelerinde enfeksiyon gösteren NPV virüsleriyle benzerlik göstermektedir.

3.3. ManeMNPV'nun Morfolojik Özellikleri

Elde edilen viral ajana ait PIB yapıların dış morfolojilerinin belirlenmesi için SEM çalışmaları yapıldı. Bu çalışmalar sonucunda PIB'lerin çok kenarlı, bazen düzensiz yuvarlak yapılı oldukları belirlendi.

Işık mikroskobu altında farklı dokularda tesadüfi olarak seçilen 50 PIB'nin çapı ölçüldü. Bu ölçümler sonucunda PIB'lerin 0,76-3,85µm aralığında, ortalama $1,64 \pm 0,52 \mu\text{m}$ çapında olduğu belirlendi (Şekil 19). PIB'lerin % 56'sının 1,1-2,2 µm aralığında yoğunlaştığı tespit edildi.



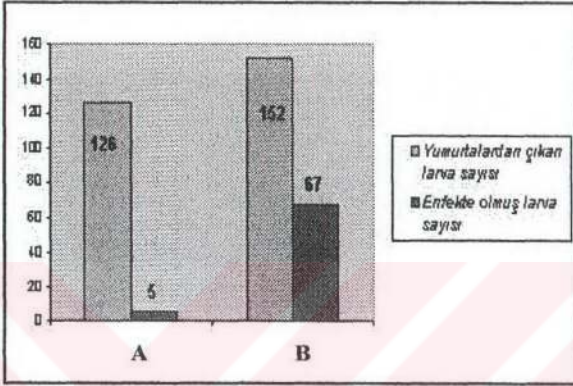
Şekil 19. ManeMNPV PIB yapılarının çaplarının dağılımı

3.4. ManeMNPV'nun Taşınımı

3.4.1. ManeMNPV'nun Vertikal İnfeksiyonu

ManeMNPV'nun taşınımında dişi bireylerin rolünü belirlemek için yapılan çalışmalar sonucunda formaldehit ile muamele edilmemiş yumurtalardan çıkan 152 larvalardan 67'sinde (% 44) NPV enfeksiyonu gözlenirken, formaldehit ile muamele edilmiş yumurtalardan çıkan 126 larvadan 5 tanesinde (% 4) NPV enfeksiyonu görüldü (Şekil 20).

Bu sonuç ManeMNPV'nun taşınımında dişi bireyin büyük rol oynadığını göstermektedir.



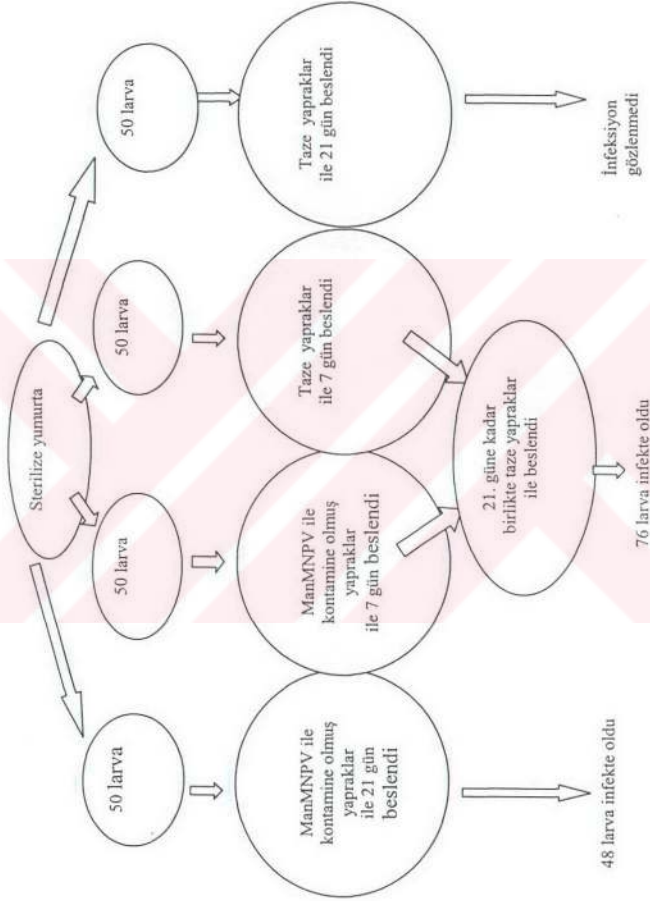
Şekil 20. ManeMNPV'nün dişi bireyler tarafından yeni generasyona aktarımı
A; formaldehit uygulanmış, B; formaldehit uygulanmamış

3.4.2. *Malacosoma neustria* Populasyonunda ManeMNPV'nun Horizontal Enfeksiyonu

Horizontal enfeksiyonu belirlemek için yapılan laboratuvar çalışmalarında, deney grubuna ilave edilen sağlıklı larvalardan kontrol gruplarına göre 28 tane daha fazla larvada viral enfeksiyon tespit edildi.

Deney süresince larvalar arasında horizontal enfeksiyonun hızla arttığı ve enfeksiyon oranının larva sayısı ile doğru orantılı olarak değiştiği gözlemlendi.

Horizontal enfeksiyon deneyi ve sonuçları Şekil 21'de gösterilmektedir.



Şekil 21. ManeMNPV'nin horizontal dağılımı

3.5. ManeMNPV'nun İnfeksiyon Özelliği

ManeMNPV'nun infeksiyon yeteneğini belirlemek için 1×10^8 PIB/ml oranında virus konsantrasyonu birinci instar *M. neustria* larvalarına uygulandı. Bu dozaj larvalar üzerinde % 98'lik bir ölüm oranı sağladı. Buna ilave olarak ManeMNPV'nun farklı konsantrasyonları uygulanarak ölüm oranları belirlendi. Larval ölüm en erken 5. günde başlarken, 7. günde bitti. İnfeksiyonun günlere göre gelişimi ve oranı Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. ManeMNPV'nun infeksiyon özelliği

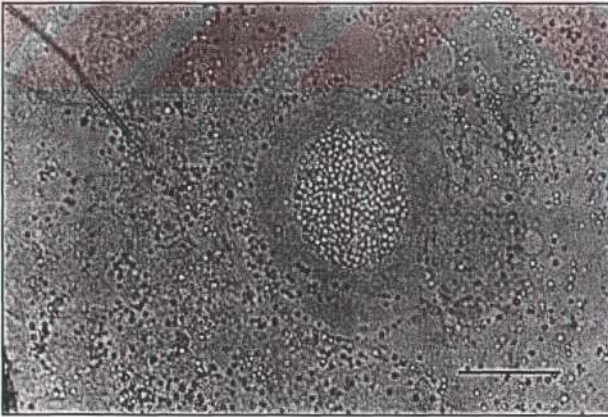
Uygulanan dozaj	Enfeksiyon süresi (gün)	Ölüm oranı (%)
1×10^8 PIB/ml	1	-
	2	-
	3	-
	4	-
	5	32
	6	60
	7	6
	8	-
	9	-
	10	-
	11	-
	12	-
	13	-
	14	-
Toplam	14	98

3.6. ManeMNPV'nun Histopatolojisi

Larvaların diseksiyonu süresince ManeMNPV'nun hangi dokuları infekte ettiği araştırıldı. Gözlemler sonucunda trake, hipodermis, hemosit ve yağ dokuları en çok infeksiyonun gözlemlendiği dokular oldu. Şekil 22 ve 23'de sırasıyla trake sisteminde ve hemosit hücrelerinde infeksiyon olduğu görülmektedir. İnfekte olmuş hücrelerin oldukça genişlediği, hemosit hücrelerinde çekirdeğin 20μ 'a kadar genişlediği görülmektedir.

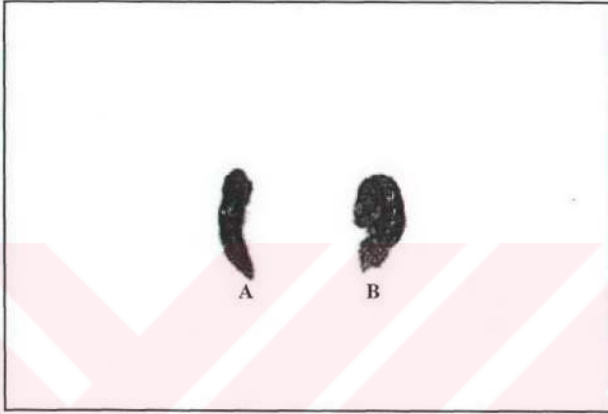


Şekil 22. NPV ile infekte olmuş trake dokusu; oklar ManeMNPV'na ait PIB gruplarını gösteriyor. (Bar: 20 μ m)



Şekil 23. NPV ile infekte olmuş lenfosit (Bar: 20 μ m)

Diğer yandan bazı infekte olmuş larvaların pupa safhasında gelişimlerini tam olarak tamamlayamadıkları tespit edildi (Şekil 24).



Şekil 24. Sağlıklı ve düşük dozda infekte olmuş larvalara ait pupalar.
Viral enfeksiyonun pupalar üzerindeki etkisi
A: Sağlıklı pupa, B: Düşük dozda infekte olmuş pupa

3.7. ManeMNPV'nun Konak Hassasiyeti

ManeMNPV'nun konak spektrumunu belirlemek için *Gypsonoma dealbana*, *Cydia pomonella* (Lep; Tortriciidae), *Euproctis chrysorrhoea* (Lep; Lymantriidae), *Pieris brassicae* (Lep; Pieridae), *Hyphantria cunea* (Lep; Arctiidae) ve *Yponomeuta malinellus* (Lep; Yponomeutidae) larvaları kullanıldı. Enfeksiyon testlerinde 1×10^8 PIB/ml oranında ManeMNPV kullanıldı. Yapılan testler sonunda ManeMNPV hiçbir böcek üzerinde enfeksiyon göstermedi (Tablo 4).

Tablo 4. ManeMNPV'nun konak hassasiyeti

Test edilen böcek	Larva sayısı	Virus dozajı (Polihedra/ml)	Ölüm nedeni ve oranı	
			Virus	Diğer
Lasiocampidae				
<i>Malacosoma neustria</i>	25	1 x 10 ⁸	98	0
Lymantriidae				
<i>Euproctis chrysorrhoea</i>	25	1 x 10 ⁸	0	0
Tortricidae				
<i>Gypsonoma dealbana</i>	25	1 x 10 ⁸	0	8
<i>Cydia pomonella</i>	25	1 x 10 ⁸	0	0
Pieridae				
<i>Pieris brassicae</i>	25	1 x 10 ⁸	0	20
Yponomeutidae				
<i>Yponomeuta malinellus</i>	25	1 x 10 ⁸	0	0
Arctiidae				
<i>Hyphantria cunea</i>	25	1 x 10 ⁸	0	0

3.8. ManeMNPV'nun Optimum Enfeksiyon Sıcaklığı

ManeMNPV'nun en yüksek enfeksiyon gösterdiği optimum sıcaklığı belirlemek için yapılan çalışmaların sonuçları Tablo 5'de gösterilmektedir. Çalışmalar sonucunda ManeMNPV'nun optimum enfeksiyon sıcaklığı 25°C olarak tespit edildi. Gerek doğal popülasyon içinde gerekse deneysel olarak enfekte olmuş larvalar arasında yapılan gözlemlerde enfekte olmuş larvalarda vücut sıvılaşmasının en hızlı 20-25° C arasında olduğu 25° C üzerinde sıvılaşmanın yavaş olduğu ancak ölümlerin yine yüksek oranda olduğu gözlemlendi. Sıcaklığın artışıyla birlikte sıvılaşmanın azalmasıyla kutikülünün bozulmadığı iç dokuların enfeksiyonuyla larval ölümün gerçekleştiği belirlendi.

Tablo 5. ManeMNPV'nun farklı sıcaklıklardaki infeksiyon oranı

Uygulanan sıcaklık (°C)	Ölüm oranı (%)	
	Virus ile	Diğer nedenler ile
20	63,3	3,3
25	93,3	3,3
30	83,3	6,7

4. İRDELEME

1998-2002 yılları arasında çalışılan bu doktora tezinde, Lepidoptera grubuna ait olan ve önemli bir tarımsal zararlı olarak kabul edilen yüzük kelebeği (*Malacosoma neustria* Lep; Lasiocampidae)'nde hastalık oluşturan viral patojenler ve bunların biyolojik mücadele ajanı olarak kullanımı araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda Gümüşhane-Köse yöresinden toplanan *M. neustria* larvalarında Baculoviridae familyasından bir nucleopolihedrovirus tespit edildi.

Virus varlığı ilk olarak infekte olmuş taze böcek dokularının doğrudan incelenmesiyle tespit edildi. Arazi çalışmalarında bazı larvaların önce uyusuk bir hal aldıkları, yemelerine son verdikleri, ölmeden önce ağacın tepesine tırmandıkları ve arka bacaklarından asılı olarak öldükleri ve ölen larvaların vücutlarının sıvı hale geçtiği gözlemlendi. Bu dış semptomlar bunun tipik bir viral hastalık olduğunu göstermektedir (Coppel, Mertins, 1977).

İnfeksiyon varlığından şüphelenilen dokuların mikroskop altında sağlıklı dokular ile karşılaştırılmasında, ayrımının kaybolması, özellikle çekirdeğin dağılması, çekirdek ya da sitoplazmada sık materyalin görünümü, çekirdek ve sitoplazmada yoğun gruplaşmış şekillerin olması gibi farklı özellikler tespit edildi. Bu özellikler infeksiyonu ve virojenik bir gelişimi ifade eder (Evans, Shapiro, 1997). İnfeksiyonun çok fazla ilerlemediği hücrelerde sitoplazmada ve çekirdekte tespit edilen gruplaşmış yuvarlak yapıların infeksiyona neden olan viral ajanın oluşturmuş olduğu inklüzyon yapıları olduğunu ifade etmektedir. Virusların oluşturmuş olduğu inklüzyon yapılar bazı boyama metotlarıyla kolaylıkla tespit edilebilmektedir. Uygulanan boyama metoduna göre inklüzyon yapıları ya hiç boyanmazlar, ya da kullanılan boyanın rengini alırlar. *M. neustria*'da infeksiyon gösteren viral ajanın inklüzyon yapılarını belirlemek için yapılan boyama metotlarından Giemsa metodunda, şüphelenilen inklüzyon yapılar boyanmazken, pikrik asit, eosin ve naftalaminin kullanıldığı metotlarda, şüphelenilen inklüzyon yapılar sırasıyla sarı-yeşilimsi, açık pembe ve siyah renkli yapılar olarak tespit edildi. Dolayısıyla bu sonuçlar bu inklüzyon yapılarının viral inklüzyon yapısı olduğunu göstermektedir. Baculoviridae, Reoviridae ve Poxviridae familyasına ait böcek virusları inklüzyon yapısı oluşturmaktadır.

Bu familyalardan Baculoviridae'ye ait NPV virusları ile Reoviridae'ye ait CPV virusları birbirine benzer inklüzyon yapıları oluşturmaktadırlar. Bu iki gruba ait inklüzyon

yapıları farklılaştırıcı Giemsa boyama metodu kullanılarak ayırt edilebilirler. Bu amaçla uygulanan boyama metodunda inklüzyon yapılarının boyama metodunda kullanılan Giemsa zonunda renksiz, pikrik asit-Giemsa zonunda sarımsı ve buffalo siyahı zonunda siyah olarak boyanması ve çekirdek içinde replike olması onun bir nükleopolihedrovirusu olduğunu göstermektedir.

Böcek viruslarının teşhisi ve karakterizasyonunda yalnızca morfolojik özelliklerin kullanılması her zaman yeterli değildir. Bu çalışmaların elektron mikroskobu çalışmaları yada moleküler teknikler ile desteklenmesi gerekir. Bu nedenle tez süresince tespit edilen virusun SEM mikroskobu çalışmaları da yapıldı. Bu çalışmalar sonucunda Şekil 10'da görüldüğü gibi tespit edilen virusun inklüzyon yapıları NPV viruslarının PIB yapılarının temel karakteristik özelliği olan çok kenarlı, düzensiz şekilli oldukları tespit edildi.

Baculoviridae familyasından olan NPV virusları 0.2-15 µm çapındaki polihedral inklüzyon yapılarına sahiptirler (Cunningham, 1988; Demirbağ, Beldüz, 1997). Her bir virus tipi kendine özgü bir çap genişliğine sahiptir. Bu nedenle bu tez süresince tespit edilen NPV'nun oluşturmuş olduğu PIB yapılarından tesadüf olarak 50 tanesinin ölçülmesi sonucunda tespit edilen virusun 1,64±0,52 µm çapında PIB yapılarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç Tablo 6'da literatürde belirtilen diğer *Malacosoma* orijinli NPV'ler ile karşılaştırılmıştır. Literatürdeki diğer ManeMNPV'lere ait PIB yapılarıyla karşılaştırılma yapıldığında bu çalışmada tespit edilen ManeMNPV'nin Polanya izolatından (Lipa vd., 1968) nispeten, ancak Litvanya izolatından (Jankevica vd., 1998) önemli derecede büyük olduğu Tablo 6'da görülmektedir.

Tablo 6. Bazı *Malacosoma* türlerinden izole edilen NPV PIB'lerinin çapları

Tür	Çap	Kaynak
<i>M. neustria</i>	0,76-3,85 (1,64±0,52)µm	Bu çalışmada
<i>M. neustria</i>	1-3,5 µm	Lipa, 1968
<i>M. neustria</i>	0,85-1,4 µm	Jankevica vd., 1998
<i>M. americanum</i>	1,1-1,7 (1,44) µm	Ackermann, Smirnov, 1983
<i>M. distria</i>	0,7-1,8 (1,34) µm	Ackermann, Smirnov, 1983
<i>M. distria</i>	0,5- 2,5 µm	Keddie, Erlanson, 1995
<i>M. apicola</i>	0,6-4,5 µm	Benz, 1963

Tespit edilen NPV'nun her bir virionunun içerdği nukleokapsid sayısının bir ya da birden çok olduğunu belirlemek için yapılan elektron mikroskobu çalışmalarından bu virusun her bir virionunun Şekil 12 ve 13'de görüldüğü gibi 2 ila 18 adet arasında değişen oranda nukleokapsid içerdği belirlenmiştir. Bilimoria'ya göre (1986 ve 1991) sahip olduğu virionun içerdği nukleokapsid sayısına dayanılarak bu NPV'nun bir MNPV (her virionunda birden çok nukleokapside sahip virus grubu) olduğu anlaşılmaktadır.

Literatürde *Malacosoma* cinsine ait böceklerden izole edilen mevcut MNPV'lar ile bu izolatin morfolojik ve anatomik yapıları karşılaştırıldığında (Tablo 6 ve 7), bu izolatin tespit edilen diğer viruslardan daha küçük nukleokapsidlere sahip olduğu ve her bir virionunda literatürdeki mevcut viruslardan daha fazla sayıda nukleokapsid bulunduğunu görülmektedir. İzole edilen virusun bu özellikleri onun *Malacosoma neustria* Multinukleopolihedrovirusu (ManeMNPV)'nün yeni bir izolatu olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlardan dolayı bu virus izolatu hem yeni bir izolat hem de Türkiye'den belirlenen ilk NPV olması nedeniyle ManeMNPV'nun Türk izolatu olarak tanımlanmıştır.

Tablo 7. Bazı *Malacosoma* türlerinden izole edilen NPV nukleokapsidlerinin büyüklükleri

Tür	Nukleokapsid büyüklüğü	Her viriondaki nukleokapsid sayısı	Kaynak
<i>M. neustria</i>	240 x 35 nm	2-18	Bu çalışmada
<i>M. neustria</i>	310 x 50 nm	3-6	Lipa, 1968
<i>M. neustria</i>	360 x 80 nm	1-11	Jankevica vd., 1998
<i>M. neustria</i>	250 x 25 nm	2-7	Ponsen vd. (1964)
<i>M. neustria</i>	315-324 x 40-46 nm	-	Bergold (1953)
<i>M. neustria testacea</i>	333 x 39 nm	2 (en fazla)	Hukuhara vd. (1966)
<i>M. apicola</i>	270-370 x 35-41nm	2	Benz, 1963
<i>M. americanum</i>	316 x 45 nm	-	Bergold, MacGuan (1951)
<i>M. distria</i>	315-324 x 40-46 nm	-	Steinhaus (1969), Bergold (1953)

Literatüre bakıldığında şimdiye kadar yapılan çalışmalar NPV'lerin karakterizasyonunda yeterli görüldüğü halde bu tezde, yukarıda açıklanan morfolojik ve elektron mikroskobu çalışmaları moleküler teknikler kullanılarak desteklenmiştir. Bu amaçla DNA-DNA hibridizasyon tekniği kullanılarak yapılan çalışmalarla da tespit edilen virusun bir NPV olduğu gösterildi. Bunun için *Autographa californica* nukleopolihedrovirus (AcNPV)'ün polihedrin genine ait problemler ile yapılan hibridizasyon çalışmalarında, tespit edilen virustan elde edilen DNA problemler ile hibridize oldu. Benzer şekilde Kukan, Myers (1995) AcNPV'nun polihedrin genini kullanarak *Malacosoma californicum pluviale*'den NPV'nu belirlemişlerdir. DNA hibridizasyon metodunun etkili olduğu Ward vd., (1987) tarafından da belirtilmiştir. Bu hibridizasyon sonuçları tespit edilen virusun NPV olduğunu göstermekte ve önceki morfolojik çalışmalarda elde edilen sonuçları desteklemektedir. Ayrıca hibridizasyon sonuçları Kukan, Myers (1995)'in sonuçları ile birlikte *Malacosoma* cinsi böceklerden elde edilen NPV'lerin AcNPV ile genomik olarak nispeten yakın olduğunu göstermektedir.

Bu tezde ManeMNPV tespitinde kullanılan bir diğer metot ise polimeraz zincir reaksiyonudur. Şekil 18'de görüldüğü gibi PCR ile ManeMNPV'ye ait polihedrin geni kolaylıkla çoğaltılmıştır. PCR ile NPV polihedrin genine spesifik primerler kullanılarak çok kolay ve hızlı virus varlığı tespit edilebilir. Bu metod diğer tespit metodlarıyla karşılaştırıldığında en hızlı ve güvenli tespit yöntemi olarak kabul edilmektedir (Woo, 2001). ManeMNPV polihedrin geninin sekans edilmesi sonucu, Tablo 8'de görüldüğü gibi bu genin bu virusun Letonya izolatu ile %99, Ukrayna izolatu ile ise de %98 oranında bir benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. ManeMNPV geni Lasiocampidae familyasından sonra en çok benzerliği sırasıyla Noctuidae ve Lymantriidae familyasının üyelerinde enfeksiyon gösteren NPV'ler ile benzerlik göstermektedir.

Elde edilen ManeMNPV DNA'sı ile ilgili yapılan bir diğer çalışma viral DNA'nın restriksiyon endonükleaz analizidir. İlk defa bu tezde ManeMNPV'na ait DNA'nın *Bam*HI profili ile ilave olarak *Eco*RI ve *Hind*III profilleri belirlenmiştir. Restriksiyon endonükleaz analizi aynı virusun farklı coğrafik izolatlarının karşılaştırılmasında kullanılan önemli bir tekniktir (Murillo vd., 2001). Kikhno ve Stokovskaya (1997) ManeMNPV'nun *Bam*HI, *Kpn*I and *Pst*I profillerini belirlemişlerdir. ManeMNPV'nun bu çalışmada elde edilen *Bam*HI profili Ukrayna izolatının *Bam*HI profilinden farklılık göstermektedir. Ukrayna izolatının *Bam*HI profilinde 9.4 kb'nin üzerinde 3 fragment oluşurken, Türk izolatında 9.4 kb'nin üzerinde 4 fragment oluşmuştur. Bu sonuçlarda bu tezde tanımlanan virusun

ManeMNPV'nun yeni bir suşu olduğunu gösteren elektron mikroskobu çalışmalarını desteklemektedir.

Tablo 8. ManeMNPV'ye ait polihedrin gen sekansının gen bankasındaki bazı diğer NPV'ler ile olan benzerliği

Virus	Gen Bank. kayıt no	Böcek familyası	Baz benzerliği	%
<i>Malacosoma neustria</i> NPV	(AJ277555)	Lasiocampidae	564/569	99
<i>Malacosoma neustria</i> NPV	(X55658)	Lasiocampidae	560/569	98
<i>Malacosoma dissstria</i> NPV	(U61732)	Lasiocampidae	521/569	91
<i>Spodoptera littoralis</i> NPV	(D01017)	Noctuidae	301/360	83
<i>Spodoptera exigua</i> NPV	(AF169823)	Noctuidae	221/254	87
<i>Orgyia pseudotsugata</i> NPV	(M32433)	Lymantriidae	238/278	85
<i>Orgyia pseudotsugata</i> NPV	(U75930)	Lymantriidae	308/373	82
<i>Perina nuda</i> NPV	(U22824)	Lymantriidae	307/373	82
<i>Trichoplusia ni</i> NPV	(AF093405)	Noctuidae	262/314	83
<i>Mamestra brassicae</i> NPV	(M20927)	Noctuidae	286/347	82
<i>Autographa californica</i> NPV	(M25054)	Noctuidae	283/344	82

Böcek viruslarının yağmur vasıtasıyla yapraklardan ya da ölü larvalardan toprağa geçtikleri bilinmektedir (Mohamed vd.,1982). Toz, rüzgar ve yağmur muhtemelen NPV'yi topraktan yaprak yüzeylerine taşır (Olofson, 1988a; Entwistle vd., 1983). Parazit ve predatörler NsNPV'yi farklı bölgelerdeki popülasyonlara taşıyarak enfeksiyonun farklı popülasyonlara ulaşmasını sağlarlar. Ayrıca ağaçların üst dallarında enfekte olmuş larva kadavralarının parçalanmasıyla dağılan PIB'ler alt dallardaki diğer kolonileri kolaylıkla enfekte edebilmektedir (Cunningham, Entwistle, 1981). Düşük dozla enfekte olmuş dişi NPV'yi yumurtalar vasıtasıyla gelecek generasyona taşıyabilmektedir. Böyle dişi bireyler yumurtlama esnasında yumurta yüzeylerini NPV'ler ile kontamine ederek taşınımı rol oynarlar. Viruslar konak generasyonları arasında yada yıllarca toprakta enfeksiyon özelliklerini koruyabilirler (Olofson,1988b; Olofson,1988c; Weseloh, Andreadis,1986).

Malacosoma neustria kısa bir larval periyoda sahiptir. Bu nedenle ManeMNPV'nun bu kısa periyod içinde taşınımı ve yeni generasyona aktarımı oldukça önem arz etmektedir. ManeMNPV'nun vertikal enfeksiyonunda düşük dozda enfekte olmuş dişilerin rolünün

olup olmadığını belirlemek için yapılan çalışmalar, Şekil 20'de görüldüğü gibi ManeMNPV'nün taşınımında düşük dozda infekte olmuş dişilerin büyük rol oynadığını göstermektedir. Bu yolla NPV gelecek generasyona taşınarak, gelecek generasyondaki populasyon yoğunluğunu da etkilemektedir.

ManeMNPV'nun horizontal infeksiyonunu belirlemek için yapılan çalışmalarda da bu infeksiyonun önemli derecede populasyon içinde viral infeksiyonun yayılmasında rol oynadığını göstermektedir. Şekil 21'den anlaşıldığı gibi laboratuvar şartlarında yapılan çalışmalarda horizontal infeksiyon ile populasyon içindeki viral infeksiyon % 58 daha fazla artmıştır. Bu sonuçlar horizontal infeksiyonun ManeMNPV'nun biyolojik mücadelede kullanılmasında büyük rol oynayacağını göstermektedir.

NPV'lerin taşınımı ile ilgili *N. sertifer* üzerinde yapılan çalışmalar bu tezdeki sonuçları desteklemektedir. Düşük dozla infekte olmuş dişi *N. sertifer* erginleri NsNPV'yi yumurtalar vasıtasıyla gelecek generasyona taşımaktadır. Viral infeksiyon, populasyon içinde hızlıca yayılabilmektedir (Cunningham, Entwistle, 1981). Ayrıca çam ağaçlarının üst dallarında infekte olmuş larva kadavralarının parçalanmasıyla dağılan PIB'ler alt dallardaki diğer kolonileri kolaylıkla infekte edebilmektedir. Parazit ve predatörler NPV'yi farklı bölgelerdeki populasyonlara taşıyarak infeksiyonun farklı populasyonlara ulaşmasını sağlarlar (Greathead, 1976).

Üç yıllık arazi çalışmaları süresince, bu taşınım sayesinde *M. neustria* populasyonunun ManeMNPV tarafından baskı altına alındığı ve önemli derecede populasyon yoğunluğundaki artışların virus tarafından engellendiği gözlenmiştir.

ManeMNPV'nun infeksiyon özelliğini belirlemek için 1×10^8 PIB/ml oranında virus konsantrasyonu birinci instar *M. neustria* larvalarına uygulandı. Bu doz laboratuvar koşullarında birinci instar larvalar üzerinde kayda değer bir ölüm oranı (% 98) sağladı.

ManeMNPV'nun konak spektrumunu belirlemek için yapılan çalışmalarda ManeMNPV testlerde kullanılan *Gypsonoma dealbana*, *Cydia pomonella* (Lep; Tortriciidae), *Euproctis chrysorrhoea* (Lep; Lymantriidae), *Pieris brassicae* (Lep; Pieridae), *Yponomeuta malinellus* (Lep; Yponomeutidae) ve *Hyphantria cunea* (Lep; Arctiidae) larvalarından hiç biri üzerinde infeksiyon göstermemiştir. Bu sonuçlar ManeMNPV'nun konak spektrumunun çok dar olduğunu göstermektedir. Literatürde Benz (1963) *M. neustria* larvalarını *M. alpicola*'dan elde edilen bir NPV ile infekte edememiştir. Stairs (1966) dört *Malacosoma* türüne ait viruslar arasındaki kros infeksiyonlarda kayda değer farklılıklar gözledi. Bu bilgilere dayanarak Lipa (1968) *Malacosoma* viruslarının

konak hassasiyetlerinin çalışılması gerektiğini vurguladı. Diğer yandan Lipa vd. (1968) ManeMNPV uyguladıkları 22 böcekten sadece üçünde infeksiyon gözleyebildiler. Bu çalışmadaki ManeMNPV'nun konak hassasiyetini belirlemek için test edilen 5 böceğin hepsi Lipa vd. (1968) test ettikleri böceklerden farklıdır. Dolayısıyla hem Lipa vd. (1968) tarafından yapılan çalışma hem de bu çalışma *Malacosoma* orijinli virusların konak spektrumunun oldukça dar olduğunu göstermektedir. Lipa vd. (1968) *M. neustria*'yı *B. mori*'ye ait NPV ile infekte edemedi. Diğer taraftan Hukuhara, Hashimoto (1966) *M. neustria testacea*'yı *B. mori* orijinli iki CPV suşu ile infekte etmeyi başardılar. Benzer sonuçlar başka çalışmalarda da elde edildi (Hukuhara vd., 1966; Mitsunashi, 1996). Bu sonuçlar muhtemelen NPV'lerinin CPV'dan çok daha fazla konak hassasiyetine sahip olduklarını göstermektedir.

ManeMNPV'nun histopatolojisini ve semptomlarını belirlemek için yapılan çalışmalarda, ManeMNPV bilinen genel NPV'lara ait semptomları gösterirken hemositler, hipodermis, trakeal matriks, yağ dokusu ve nadiren de bağırsak epitel hücreleri infeksiyonun gerçekleştiği dokular oldu. Diprionidae orijinli NPV'lerinin dışındaki NPV'ları için bağırsak epitelinin infeksiyonu sıklıkla karşılaşılan bir durum değildir. Jankevica vd. (1998) ManeMNPV'nun Litvanya izolatını yeni bir suş olarak nitelerken bağırsak epitelinde gözledikleri böyle bir infeksiyonu yeni suş kriterlerinden biri olarak kabul etmişlerdir. Bu durum bu çalışmada bulunan NPV için büyük önem arz etmektedir.

ManeMNPV'nun optimum infeksiyon sıcaklığını belirlemek için yapılan çalışmalar sonucunda ManeMNPV'nun optimum infeksiyon sıcaklığı 25°C olarak tespit edildi. Gerek doğal populasyon içinde gerekse deneysel olarak infekte olmuş larvalar arasında yapılan gözlemlerde infekte olmuş larvalarda vücut sıvılaşmasının en hızlı 20-25° arasında olduğu 25° üzerinde sıvılaşmanın yavaş olduğu ancak ölümlerin yine yüksek oranda olduğu gözlemlendi. Sıcaklığın artışıyla birlikte sıvılaşmanın azalmasıyla kütikulanın bozulmadığı iç dokuların infeksiyonuyla larval ölümün gerçekleştiği belirlendi. Benzer bir çalışmada Ziemnicka (1981) *Stilpnotia salicis* nukleopolihedrovirusu (SsNPV) ile en yüksek infeksiyonu 30°C'de elde etti. Diğer taraftan *Neodiprion sertifer* Nukleopolihedrovirusu ile %100 mortalite elde etmek için en uygun sıcaklık 22°C olarak tavsiye edilmektedir (Cunningham, Entwistle, 1981).

NPV'nin larvalarda gelişimi sıcaklığa bağlıdır. Yüksek sıcaklık hastalığın düşük sıcaklıklardakinden daha hızlı gelişmesini sağlar (Krieg, 1955; 1968). Soğuk iklimde NPV bir kontrol ölçüsü olarak kullanıldığı zaman, bu gerçek gözden kaçırılmamalıdır. Bununla

birlikte düşük sıcaklıklarda larvalar gelişimlerini tamamlamak için normalden daha fazla zamana ihtiyaç duyarlar. Bird (1953) soğuk bölgelerde virus ile infekte olmuş larvalarda hastalığın çok yavaş geliştiğini, fakat larval gelişim periyodunun uzamasından dolayı bu larvaların sıcak iklimlerdeki ile aynı safhada öldüklerini tespit etmiştir. Twernmyr (1969) tarafından yapılan bir çalışmada, virus ile infekte olmuş *N. sertifer* larvalarının LT_{50} değerleri, $12^{\circ}C$ 'de 19,3; $18^{\circ}C$ 'de 9,5 ve $24^{\circ}C$ 'de 4,6 gün olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan da anlaşıldığı gibi sıcaklığın düşmesiyle NPV'nin aktivitesi yavaşlamaktadır. Ancak aynı çalışmada düşük sıcaklıktaki kontrol grubundaki ortalama larval gelişim periyodunun LT_{50} değerinkinden daha fazla oranda uzadığı tespit edilmiştir. Bu da NPV'nin düşük sıcaklıklarda bile etkili bir kontrol ajanı olabileceğini göstermektedir.

Ülkemizde önemli bir tarımsal zararlı olan *M. neustria* popülasyonunu etkileyen çok az faktör olduğu halde bu zararlı nukleopolihedrovirusu ile en kolay kontrol edilebilen böceklerden biridir. Bu tez süresince tespit edilen virus etkili, seçici ve güvenli bir biyolojik kontrol ajanıdır (Fuxa, 1990; 1991). *M. neustria*'ya karşı yapılan çalışmalarda en iyi sonuçlar NPV virusları ile elde edilmiştir. Tüm dünyada ayrıntılı olarak çalışılıp, kullanıma sunulduğu halde, ülkemizde zararlı böcekler ile biyolojik mücadelede virusların kullanımına yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır. Türkiye literatürüne bakıldığında bu çalışma ülkemizde böcek virusları üzerine yapılan ilk ve en ayrıntılı çalışmadır. Dolayısıyla bu çalışma örnek alınarak ülkemizde hem bu zararlıya karşı hem de diğer zararlılara karşı viral kontrol ajanlarının seçimi, geliştirilmesi ve kullanımı teşvik edilecek, yeni böcek viruslarının tespitine yönelik çalışmalar hız kazanacaktır.

5. SONUÇLAR

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

1. Lepidoptera grubuna ait olan yüzük kelebeği (*Malacosoma neustria* Lep; Lasiocampidae) ile mücadelede kullanılmak üzere onların doğal düşmanı olan virüsler araştırılmış ve Gümüşhane yöresinden toplanan larvalarda bir viral enfeksiyon tespit edilmiştir.
2. *M. neustria*'da tespit edilen virüsün morfolojik, ileri anatomik ve moleküler çalışmalar sonucunda Baculoviridae familyasından olan ve her virionda birden çok nükleokapsid içeren bir nükleopolihedrovirus (NPV) olduğu tespit edildi ve ManeMNPV olarak adlandırıldı.
3. Yapılan elektron mikroskobu ve moleküler çalışmalar bu virüsün literatürde bu böcekten izole edilmiş NPV'lardan farklı özelliklerde olduğunu göstermektedir. Bu nedenle bu virüs ManeMNPV'nun yeni bir izolatı olarak tanımlandı. Bu virüs dünya literatürü için yeni bir izolat, Türkiye literatürü için yeni bir virüs olarak kaydedilmiştir.
4. ManeMNPV'nun populasyon içindeki enfeksiyonunun çok yüksek olduğu ve yeni generasyona taşınımının düşük dozda viral enfeksiyon taşıyan dişiler ile yüksek oranda gerçekleştiği tespit edildi.
5. Yapılan çalışmalar sonucunda 1×10^8 PIB/ml konsantrasyonundaki virüs dozu ile biyolojik mücadelede kullanılmak üzere yeterli ölüm oranı elde edildi. Bu sonuçlar ile ManeMNPV'nun *M. neustria* ile mücadelede etkili bir şekilde kullanılabileceği ortaya konulmaktadır.
6. ManeMNPV'nun konak spektrumunun çok sınırlı olduğu bulundu. Öyle ki ManeMNPV test edilen *Gypsonoma dealbana*, *Cydia pomonella* (Lep; Tortricidae), *Euproctis chrysorrhoea* (Lep; Lymantriidae), *Pieris brassicae* (Lep; Pieridae), *Yponomeuta malinellus* (Lep; Yponomeutidae) ve *Hyphantria cunea* (Lep; Arctiidae) larvaları üzerinde hiçbir enfeksiyon göstermedi.
7. ManeMNPV için optimum enfeksiyon sıcaklığı 25°C'de olarak bulundu.
8. Bu çalışmayla ülkemizde ilk defa bir böcek virüsü tespit edilerek tanımlanmakta ve biyolojik mücadele ajanı olarak sunulmaktadır.

6. ÖNERİLER

Ülkemizde tarımsal zararlılar ile mücadele tamamen kimyasal ilaçlar kullanılarak yapılmaktadır. Kimyasal ilaçlar kullanılırken, bunların bir çok yan etkileri ortaya çıkmaktadır. Bir çok yönden bazı canlı grupları ciddi zararlar görmektedirler. Bununla birlikte biyolojik mücadele kimyasal kontrol yöntemleriyle bağlantılı birçok problemi ortadan kaldırmaktadır. Bu nedenle biyolojik kontrol, kimyasal ilaçlarla karşılaştırıldığında ekolojik dengeyi bozmayan alternatif bir mücadele yöntemidir. Bu tez sonucunda tespit edilen ManeMNPV önemli bir fındık ve meyve zararlısı olan *M. neustria* ile mücadelede kimyasallara alternatif olarak kullanılmalıdır. Bu amaçla bu virusun kütle üretimi gerçekleştirilmeli ve ticari şekli sunulmalıdır. Böylece hem bu zararlıyla mücadelede kullanılan kimyasalların çevreye yapmış olduğu olumsuz etkiler ortadan kalkacak hem de ekonomik açıdan daha düşük maliyet gerektirecektir. Bu virusun konak spektrumu ve etki oranı rekombinant teknikler kullanılarak geliştirilebilir. Bu virüs literatürde mevcut diğer virüsler ile karşılaştırılabilir. Virusun genomik kütüphanesi oluşturularak biyoteknolojide kullanılma imkanları artırılabilir. Bu çalışma ülkemizde bu alanda yapılan ilk çalışma olması nedeniyle, bu alanda çalışacak diğer araştırmacılar için örnek alınacak temel bir çalışma olacaktır. Bu çalışmada sunulan bilgiler kullanılarak diğer tarımsal zararlılar ile mücadelede yeni viral ajanların tespiti mümkün olabilir.

7. KAYNAKLAR

- Abbott, W., S., 1925, A method of computing the effectiveness of an insecticide, J. Econ. Entomol., 18, 265-267.
- Adams, J., R., 1991, Introduction and classification of viruses of invertebrates. In: Atlas of Invertebrate Viruses (J. R. Adams and J.R. Bonami, Eds), CRC Press, London, 1-8.
- Adams, J., R., McClintock, J., T., 1991, Baculoviridae. Nuclear Polyhedrosis Viruses. In: Atlas of Invertebrate Viruses (J. R. Adams and J.R. Bonami, Eds), CRC Press, London, 87-204.
- Ackermann, H., W., Smirnov, W., A., 1983, A morphological investigation of 23 Baculoviruses. J. Invertebrate Pathol., 41, 269-280.
- Allaway, G., P., Payne, C., C., 1983, A biochemical and biological comparison of three European isolates of nuclear polyhedrosis viruses from *Agrotis segetum*, Arch. Virology, 75, 43-54.
- Benz, G., 1963, A nuclear polyhedrosis of *Malacosoma alpicola* (Staundinger), J. Insect Pathol., 5, 215-241.
- Bergold, G., 1953, Insect viruses, In "Advances in Virus Research" 1, 91-139.
- Bergold, G., McGuan B., M., 1951, Virus diseases of the forest tent caterpillars. Canada Dept. agr., Forest Insect Invest. Bi-Monthly prog. Rept. 7, 1, 2-3.
- Bilimoria, S., L., 1991, The biology of nuclear polyhedrosis viruses, In: Viruses of Invertebrates (Edt. E. Kurstak), Marcel Dekker, New York, 1-72.
- Bilimoria, S., L., 1986, Taxonomy and identification of baculoviruses. In: The Biology of Baculoviruses (R. R. Granados and D.A. Federici. Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL., Vol. 1, 37-59.
- Bird, F., T., 1953, The Use of Virus Disease in the Biological Control of the European Pine Sawfly, *Neodiprion sertifer* (Geoffr.), Can. Ent., 85, 437-446.
- Bonami, J. R., ve Adams, J. R., 1991, Birnaviridae, In: Atlas of Invertebrate Viruses (J. R. Adams and J.R. Bonami, Eds), CRC Press, London, 436-442.
- Brown, F., 1986, Classification and nomenclature of viruses, Summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Intervirology, 25, 141.

- Burges, H., D., Hussey, N., W., 1971, Microbial Control of Insects and Mites, Academic Press, London, New York.
- Coppel, C., H., Mertins, J., W., 1977, Biological Insect Pest Suppression, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 314 S.
- Couch, J. A., 1991, Baculoviridae. Nuclear Polyhedrosis Viruses of Invertebrates Other than Insects. In: Atlas of Invertebrate Viruses (J. R. Adams and J.R. Bonami, Eds), CRC Press, London, 205-224.
- Cunningham, J., C., 1988, Baculoviruses- Their Status Compared to *Bacillus thuringiensis* as Microbial Insecticides. Outlook on Agriculture.
- Cunningham, J., T., 1998, North America, Insect Viruses and Pest Management, John Wiley and Sons, London, 313-331.
- Cunningham, J., C., 1995, Baculoviruses as microbial insecticides. In Novel Approaches to Integrated Pest Management, ed. R Reuveni, Lewis, Boca Raton, FL, 261-292.
- Cunningham, J., T., Entwistle, P., F., 1981, Control of Sawflies by Baculovirus, Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980, London, Academic Press, 379-407.
- Çanakçıoğlu, H., 1983, Orman Entomolojisi, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul.
- Deacon, J., 1983, Microbial Control of Plant Pests & Diseases. Published by Van Nostrand Reinhold (UK) Co. Ltd. Molly Millars Lane, Wokingham, Berkshire, England.
- Demirbağ, Z., Beldüz, A., O., 1997, Baculovirüs'ün Biyolojik Mücadeledeki Önemi, Kökem Dergisi, 20, 1, 49-58.
- Demirbağ, Z., Beldüz, A.O., Demir, İ. 1998. Baculovirus'ün ekspresyon vektörü olarak biyoteknolojide kullanılması. Tr. J. of Biology, 22:249-262.
- Ecevit, O., 1988, Zırai Mücadele İlaçları ve Çevreye Olan Etkileri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları, Samsun.
- Entwistle, P., F., Adams, P., H., W., Ewans, H., F., Rivers, C., 1983, Epizootiology of a Nuclear Polyhedrosis Virus (Baculoviridae) in European Spruce Sawfly (*Gilpinia hercyniae*): Spread of Disease from Small Epicentres in Other Hosts, J. Appl. Ecol., 20, 473-487.
- Evans, H. and Shapiro, M., 1997, Viruses, Manual of Techniques in Insect Pathology, Academic Press, London, 17-54.
- Federici, B., A., Hamm, J. J., Styer, E.L., 1991, Ascoviridae. In: Atlas of Invertebrate Viruses (J. R. Adams and J.R. Bonami, Eds), CRC Press, London, 339-349.

- Fuxa, J., R., 1990, New directions for insect control with baculoviruses. In *New Directions in Biological Control*, ed. RR Baker, PE Dunn, Wiley-Liss, New York, 97-113.
- Fuxa, J., R., 1991, Insect control with baculoviruses. *Biotech. Adv.* 9, 425-442.
- Goodwin, R.H., Milner, R.J., Beaton, C.D. 1991. Entomopoxvirinae. In: *Atlas of Invertebrate Viruses* (J. R. Adams and J.R. Bonami, Eds), CRC Press, London, 259-281.
- Greathead, D., J., 1976, A Review of Biological Control in Western and Southern Europe, Slough, Commonwealth Agricultural Bureaux Farnham Royal, 182.
- Gröner, A., 1986, Specificity and Safety of Baculoviruses: The Biology of Baculoviruses, Granados, R., ve Federici, B., (I). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 177 S.
- Harvey, J., Tanada, Y., 1985, Characterization of the DNAs of five baculoviruses pathogenic for the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *J. Invertebrate Pathol.*, 46, 174-179.
- Huber, J., 1986, Use of Baculoviruses as Pesticides: The Biology of Baculoviruses, Granados, R.R., Federici, B. A., (II), CRS Pres, Inc., Boca Raton, Florida, 181 S.
- Huger, A. M., Krieg, A., 1991, Baculoviridae. Nonoccluded Baculoviruses. In: *Atlas of Invertebrate Viruses* (J. R. Adams and J.R. Bonami, Eds), CRC Press, London, 287-320.
- Hukuhara, T., Hashimoto, Y., 1966, Studies of two strains of cytoplasmic polyhedrosis virus, *J. Invert. Pathol.*, 8, 184-192.
- Hukuhara, T., Akutsu, K., Watanabe, H., 1966, Nuclear polyhedroses of several insects. *Jap. J. Appl. Ent. Zool.*, 10, 181-184.
- Hunter-Fujita, R. F., Entwistle, P. F., Evans, H. F., Crook, N. E., 1998, General laboratory practice. In: *Insect Viruses and Pest Management*, London, John Wiley & Sons; pp. 359-473.
- Jankevica, L. And Zarins, I., 1997, Biological control of *Malacosoma neustria* L. Population with Latvian isolate of nuclear polyhedrosis virus. BCPC Symposium Proceedings No 68: Microbial Insecticides: Novelty or Necessity? 285-288.
- Jankevica, L., Cudare, Z., Ose, V., 1998, New isolate of *Malacosoma neustria* nuclear polyhedrosis virus in Latvia, *J. Invertebrate Pathol.*, 71, 283-285.
- Kelly, P. M., Speight, M., R., Entwistle, P., F., 1989, Mass production and purification of *Euproctis chrysorrhoea* (L.) nuclear polyhedrosis virus, *J. Virological Methods*, 25, 93-100.

- Keddie, A., Erlanson, M., 1995, Characterization of a nuclear polyhedrosis virus from the forest tent caterpillar, *Malacosoma disstria*, J. Invertebrate Pathol., 65, 43-47.
- Kikhno, I. M and Stokovskaya, L. I., 1997, Physical mapping of *Malacosoma neustria* nuclear polyhedrosis virus genome, Biopolimery i Kletka, 13 (3) 218-221.
- Kondo, A., Yamamoto, M., Takashi, S., Maeda, S., 1994, Isolation and characterization of nuclear polyhedrosis viruses from the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) found in Shiga, Japan. Appl. Entomol. Zool., 29, 105-111.
- Krieg, A., 1955, Untersuchungen uber die Polyedrose von *Neodiprion sertifer* (Geoffr.), Arch. ges. Virusforsch., 6, 163-174.
- Krieg, A., 1968, Grundlagen der Insektenpathologie, Wissenschaftliche Forschungsberichte, Steinkopf Verlag, Darmstadt, 304 S.
- Kukan, B., Myers, J., H., 1995, DNA hybridization assay for detection of nuclear polyhedrosis virus in tent caterpillars, J. Invert. Pathol., 66, 231-236.
- Lewin, D., G., Laitinen, A. M., Clarke, T., Lukarotti, C., J., Morin, B., Otvos, S., I., 1997, Characterization of nuclear polyhedrosis viruses from three subspecies of *Lambdina fiscellaria*. J. Invertebrate Pathol., 69, 125-134.
- Lipa, J., J., 1975, An Outline of Insect Pathology, Warsaw, Poland.
- Lipa, J., J., 1998, Eastern Europe and the Former Soviet Union, Insect Viruses and Pest Management, London, John Wiley & Sons, 216-231.
- Lipa, J., J., Gershenson, M., Gudz-Gorban, A., P., 1968, Electron microscopy, histopathology and pathogenicity of nuclear polyhedrosis virus of *Malacosoma neustria* L. Acta Microbiologica Polonica, 17, 191-202.
- Matthews, R., E., F., 1982, Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Intervirology, 17, 1.
- Miller, L., K., 1997, Introduction to the Baculoviruses. In: Baculoviruses (Miller, L. K. Ed.), Plenum Press, New York, 1-6.
- Mitsuhashi, J., 1996, A continuously growing cell line from larval hemocytes of *Malacosoma neustria testaceae*, Jpn. J. Ent., 64 (3): 692-699
- Mohamed, M., A., Coppel, H., C., Podgwaite, J., D., 1982, Persistence in soil and on foliage of nucleopolyhedrosis virus of the European pine sawfly, *Neodiprion sertifer* (Hymenoptera: iprionidae), Environmental Entomol., 11, 5, 1116-1118.

- Moscardi, F., 1999, Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera, Annu. Rev. Entomol., 44, 257-289.
- Moraes, R., R., Maruniak, E., 1997, Detection and identification of multiply baculovirus using the polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease analysis, J. Virological Methods, 63, 209-217.
- Murillo, R., Munoz, D., Lipa, J. J., And Cabellero, P., 2001. Biochemical characterization of three nucleopolyhedrovirus isolates of *Spodoptera exigua* and *Mamestra brassicae*. J. Appl. Ent. 125, 267-270.
- Olofsson, E., 1988a, Dispersal of the nuclear polyhedrosis virus of *Neodiprion sertifer* from soil to pine foliage with dust, Entomol.exp.appl., 46, 181-186.
- Olofsson, E., 1988b, Environmental persistence of the European pine sawfly in relation to epizootics in Swedish scots pine forests, J. Invertebrate Pathol., 52, 119-129.
- Olofsson, E., 1988c, Persistence and dispersal of the nuclear polyhedrosis virus of *Neodiprion sertifer* (Geoffroy) (Hymenoptera:Diprionidae) in a virus-free lodgepole pine plantation in Sweden, Can.Ent. 120, 887-892.
- Payne, C. A., 1988, Pathogenes for The Control of Insects: Where Next? Philosophi Transactions of The Royal Society of London. B 318, 225-248.
- Peter, G., 1984, *Plant Pests and Their Control*, Fenemore, London.
- Poinar, G.O., 1978, *Identification of The Groups of Insect Pathogens*, Plenum Press, New York.
- Ponsen, M.B., Henstra S., van der Scheer, C., 1964, Electron microscope observations of nuclear polyhedra from *Malacosoma neustria* (Lepidoptera, Lasiocampide), Neth. J. Plant Pathol., 70, 101-104.
- Radek, R., Fabel, P., 2000, A new entomopoxvirus from a Cockroach: Light and electron microscopy, J. Invert. Pathol., 75, 19-27.
- Stairs, G., R., 1964, Infection of *Malacosoma disstria* Hübner with nuclear-polyhedrosis viruses from other species of *Malacosoma* (Lepidoptera, Lasiocampide), J. Insect Pathol. 6, 164-169.
- Steinhaus, E. A., 1956, Microbial control: The emergence of an idea, J. Agriculture Sci., 26, 107-160.
- Steinhaus, E., A., 1949, Nomenclature and classification of insect viruses, Bacteriol. Revs., 3, 203-223.

- Strokovskaya, L., Ziemnicka, J., Michalik, J., 1996, Genetic variability of four natural isolates of the *Stilpnottia salicis* multiple-envoleped nuclear polyhedrosis virus, Acta Biochimica Polonica, 43, 633-638.
- Tanada, Y., Hess, R., T., 1991, Baculoviridae. Granulosis Viruses. In: Atlas of Invertebrate Viruses (J. R. Adams and J.R. Bonami, Eds), CRC Press, London, 225-258.
- T. C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, 1995, Zırai Mücadele Teknik Talimatı, Ankara.
- T. C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, 1992, Fındık Zararlıları ve Hastalıkları ile Mücadele, Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Tuncer, C., Ecevit, O., Akça, İ., 1997, Observation on biology of the filbert aphid (*Myzocallis coryli*, Homoptera:Aphidae) in hazelnut orchards, Fourth Int. Sym. Hazelnut. (Eds. A., İ., Köksal, Y., Okay, N., T., Güneş), Acta Hort., 445 ISHS, 485-489.
- Tuncer, C. ve Ecevit, O., 1997. Current status of hazelnut pests in Turkey. Fourth Int. Sym. Hazelnut. (Eds. A.İ. Köksal, Y. Okay, N.T. Güneş). Acta Hort.445 ISHS 1997, 545-552.
- Tvermyr, S., 1969, Effect of Nuclear Polyhedrosis Virus in *Neodiprion serttifer* (Geoffr.) (Hymenoptera: Diprionidae) at Different Temperatures, Entomophaga, 14, 654-250.
- Ward, V., K., Fleming, S., B., Kalmakoff, J., 1987, Comparison of a DNA-DNA dot-blot hybridisation assay with light microscopy and radioimmunoassay for the detection of a nuclear polyhedrosis virus, J. Virological Methods, 15, 65-73.
- Weiser, J., 1969, An Atlas of Insect Diseases, Publishing House of The Czechoslovak Academy of Sciences, Prague.
- Weseloh, R., M., Andreadis, T., G., 1986, Laboratory assessment of forest microhabitat substrates as sources of the gypsy moth nuclear polyhedrosis virus, J. Invertebrate Pathol., 48, 27-33.
- Woo, S., D., 2001, Rapid detection of multiple nucleopolyhedroviruses using polymerase chain reaction, Mol. Cells, 11, 334-340.
- Yaman, M., 1998, Zararlı böceklerin kontrolünde alternatif bir yöntem: Biyolojik mücadele, Çevre ve İnsan, T.C. Çevre Bakanlığı Yayın Organı, Sayı:40, 44-45.
- Yaman, M., Demirbağ, Z., 1998, Biyolojik ajanların insektisidal etkilerini belirleme yöntemleri, Ekoloji Çevre Dergisi, 8, 29, 11-14.

- Yaman, M., Demirbağ, Z. and Beldüz, A.O., 1999, Investigation on the bacterial flora as a potential biocontrol agent of chestnut weevil, *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae) in Turkey, Biologia, Bratislava, 54, 679-683.
- Yaman, M., Nalçacıoğlu, R., Demirbağ, Z., 2001, Viral Control of The European Pine Sawfly, *Neodiprion sertifer* (Geoffroy) in Turkey, Tr. J. Biology, 25, 419-425.
- Yaman, M., Nalçacıoğlu, R., Demirbağ, Z., 2002a, Studies on bacterial flora in the population of fall webworm, *Hyphantria cunea* Drury. (Lepidoptera: Arctiidae), Journal of Applied Entomology 126:470-474.
- Yaman, M., Ertürk, Ö., Demirbağ, Z., 2002b, Studies of Bacteria as Microbial Control Agents of The Lackey Moth, *Malacosoma neustria* (Lepidoptera, Lasiocampidae) in Turkey, Polish Academy of Sciences: Biological Sciences (Baskıda)
- Ziennicka, J., 1981, Studies on nuclear and cytoplasmic polyhedrosis viruses of the satin moth (*Stilpnotia salicis* L.) (Lepidoptera, Lymantriidae).

ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Samsun'un Çarşamba ilçesinde doğdu. İlkokulu Beyyenice İlkokulu, orta okulu Atatürk Ortaokulu ve lise öğrenimini Çarşamba Lisesinde tamamladıktan sonra 1989-1990 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fatih Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği Bölümünde Lisans öğrenimine başladı. 4 yıl Milli Eğitim Bakanlığı'ndan burslu olarak öğrenim gördüğü bu bölümden 1993 yılında Biyoloji Öğretmeni unvanı ile mezun oldu. Aynı yıl M.E.B.'na bağlı olarak öğretmenliğe başladı. 1994 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olarak Biyoloji Bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı. 1998 yılında yüksek lisans eğitimini tamamlayarak, aynı yıl doktora eğitimine başladı. M.E.B.'nda 5 yıl öğretmen olarak görev yaptıktan sonra, 1998 yılı sonunda K.T.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne Araştırma Görevlisi olarak atandı. 1999 yılında M.E.B. tarafından açılan Yurt Dışı Bursları sınavını kazanarak, Polonya Hükümeti Araştırma Bursu'nu almaya hak kazandı. Aynı yıl içinde Polonya'nın Poznan şehrindeki Bitki Koruma Enstitüsünde, Biyolojik Mücadele ve Karantina Bölümünde, böcek patolojisi ve biyolojik mücadele üzerine Prof. Dr. Jerzy J. Lipa ile araştırmalar yaparak bu alanda gerekli deneyim ve tecrübeleri kazandı. 2001 yılında NATO tarafından sağlanan TUBITAK-NATO-A2 Yurt Dışı Araştırma Bursları Sınavını kazanarak Almanya'nın Berlin şehrinde, Berlin Üniversitesi, Biyoloji Enstitüsünde, Prof. Dr. Klaus Hausmann ve Dr. Renate Radek ile Elektron Mikroskobu kullanımı ve böceklerde patojenik virüs ve protozoaların karakterizasyonları üzerine çalışmalar yaptı. Aynı bursun ikinci bölümü ile Almanya'nın Neustadt şehrinde Dr. Johannes Jehle ile böcek virüslerinin moleküler karakterizasyonu üzerine çalışmalar yaptı. Halen K.T.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmalarını sürdürmektedir.