



**UN KURDU, *TENEBRIO MOLITOR* (COLEOPTERA:
TENEBRIONIDAE) (LINNAEUS, 1758)'UN
MÜCADELESİNDE KULLANILMAK ÜZERE
DENSOVİRUS TABANLI BİYOİNSEKTİSİT
GELİŞTİRİLMESİ**

Yasemin AŞ GÜLER

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

2026

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI



UN KURDU, *TENEBRIO MOLITOR* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)
(LİNNAEUS, 1758)'UN MÜCADELESİNDE KULLANILMAK ÜZERE
DENSOVİRUS TABANLI BİYOİNSEKTİSİT GELİŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Yasemin AŞ GÜLER

Danışman: Doç Dr. Gözde Büşra EROĞLU

ERZURUM, 2026

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

UN KURDU, *TENEBRIO MOLITOR* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)
(LINNAEUS, 1758)'UN MÜCADELESİNDE KULLANILMAK ÜZERE
DENSOVİRUS TABANLI BİYOİNSEKTİSİT GELİŞTİRİLMESİ

Doç. Dr. Gözde Büşra EROĞLU danışmanlığında Yasemin AŞ GÜLER tarafından hazırlanan bu çalışma 23.12.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **Oy çokluğu ile** kabul edilmiştir.

Danışman:	Doç. Dr. Gözde Büşra EROĞLU Erzurum Teknik Üniversitesi	İmza	
Üye:	Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ Karadeniz Teknik Üniversitesi	İmza	
Üye:	Prof. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ Erzurum Teknik Üniversitesi	İmza	

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

Prof. Dr. İlker KAZAZ
Enstitü Müdürü

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 1240939 nolu 1002-A Hızlı Destek Programı ve 2210-C Öncelikli Alan Burs Programı ile desteklenmiştir.

ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ VE ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etik ilkelere uygun davrandığımı ve tezin hazırlanması sürecinde üretken yapay zekâ programlarından destek alınmadığını beyan ederim.

23.12.2025

İmzası

Yasemin AŞ GÜLER

TEŞEKKÜR

Erzurum Teknik Üniversitesi'ndeki yüksek lisans eğitimim süresince destek, bilgi ve tecrübeleri ile bana ilham veren ve yol gösteren sayın danışman hocam Doç. Dr. Gözde Büşra EROĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Tez savunma jürisi üyelerim sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ ve Prof. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tezim süresince laboratuvar alt yapı imkanlarından faydalanmamı sağlamaları nedeniyle ETÜ Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi yönetimine teşekkür ederim.

Tez çalışmamı iki program (1002-A, 2210-C) ile destekleyen ve burs sağlayan TÜBİTAK kurumuna teşekkür ederim.

Yardımlarını ve desteklerini eksik etmeyen sevgili laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Akademik hayatım boyunca bana yol gösterici olan, her konuda bana yardımını esirgemeyen ve tecrübeleri ile beni her daim bir adım önde tutan sevgili eşim Seyfettin GÜLER'e çok teşekkür ederim.

Yasemin AŞ GÜLER

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ
UN KURDU, *TENEBRIO MOLITOR* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)
(LİNNAEUS, 1758)'UN MÜCADELESİNDE KULLANILMAK ÜZERE
DENSOVİRUS TABANLI BİYOİNSEKTİSİT GELİŞTİRİLMESİ Adı SOYADI

Yasemin AŞ GÜLER

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç Dr. Gözde Büşra EROĞLU

Un kurdu, *Tenebrio molitor*, Coleoptera takımında bulunan dünya çapında depolanmış ürünlere ciddi hasarlar veren zararlı bir böcektir. Bu böcek ile mücadelede kimyasal yöntemler ön plana çıksa da, kimyasalların olumsuz etkileri ve yüksek maliyeti göz önüne alındığında, zararlı böceklerle karşı biyolojik mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi zorunluluk haline gelmiştir. Böcek virüslerinden biri olan densoviruslerin de biyolojik mücadelede kullanılma potansiyelinin yüksek olduğu bilinmektedir. Bu tez çalışmasında Türkiye'de ilk kez *T. molitor* zararlısından tarafımızca densovirus tanımlanmış olup TmDNV-TR adıyla ICTV verilerine işlenmiştir. İzole edilen ve saflaştırılan TmDNV-TR izolatının TEM görüntüsü alınmış ve boyutu 28,95 nm olduğu görülmüştür. Tam genom analizi yapıldıktan sonra da genom boyutu 5467 bp olarak bulunmuştur. Yapılan REN ve amino asit varyasyonu çalışmalarında tüm gen bölgelerinde amino asit varyasyonları olduğu tespit edilmiştir. Ardından maksimum olasılıklı filogenetik ağacı, Kimura-2 tablosu çizilmiştir. Kimura tablosu sonucu TmDNV-TR ile veritabanındaki diğer TmDNV'ler arasındaki genetik uzaklık değeri 0,023 olarak belirlenmiştir. Daha sonra virüsün *T. molitor* üzerinde doz yanıt testi yapılmıştır ve istatistiksel veri analizi, 8. günün sonunda LD₅₀: 1,091 x 10⁵ kopya/mL-1, LT₅₀: 5 gün, LD₉₅: 8,94 x 10⁷ kopya/mL-1 ve LT₉₅: 7 gün olduğunu ortaya koymuştur. Densovirusün böcek üzerinde öldürücülüğü kanıtlandıktan sonra bu virüs ile Tenebriokiller adlı bir formülasyon hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonun doz yanıt testi sonucunda da beş doz formülasyon *T. molitor* larvaları için patojenik sonuçlanmıştır. Son işlem olan formülasyonun stabilite test deneylerinde ise, 14. günün sonunda taze formülasyonun (0 ay) ölüm oranı %100 iken, 4°C'de 3 ve 6 ayın sonunda ölüm oranı %100, 25°C'de ise 3 ve 6 ayın sonunda ölüm oranı sırasıyla %98 ve %95 olarak bulunmuştur. Densovirus tabanlı, adını Tenebriokiller koyduğumuz bu biyoinsektisit hazırlanması ile beraber, *T. molitor* mücadelesine önemli bir katkı sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Densovirus, *Tenebrio molitor*, Biyoinsektisit, Formülasyon

ABSTRACT

Ms. Thesis

UN KURDU, *TENEbrio MOLITOR* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) (LINNAEUS, 1758)'UN MÜCADELESİNDE KULLANILMAK ÜZERE DENSOVİRUS TABANLI BİYOİNSEKTİSİT GELİŞTİRİLMESİ

Yasemin AŞ GÜLER

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology And Genetics

Supervisor: Doç. Dr. Gözde Büşra EROĞLU

The mealworm beetle, *Tenebrio molitor*, is a harmful insect belonging to the Coleoptera order that causes serious damage to stored products worldwide. Although chemical methods are primarily used to combat this insect, the negative effects and high cost of chemicals have made it imperative to develop biological control methods against harmful insects. It is known that densoviruses, which are one type of insect virus, have high potential for use in biological control. In this thesis study, a densovirus was identified from *T. molitor* for the first time in Turkey by our team and was entered into the ICTV database under the name TmDNV-TR. A TEM image was taken of the isolated and purified TmDNV isolate, and its size was found to be 28.95 nm. After a complete genome analysis, the genome size was found to be 5467 bp. REN and amino acid variation studies revealed amino acid variations in all gene regions. Subsequently, a maximum likelihood phylogenetic tree and Kimura-2 matrix were constructed. The Kimura matrix result determined the genetic distance value between TmDNV-TR and other TmDNVs in the database to be 0.023. Subsequently, a dose response test of the virus on *T. molitor* was performed, and statistical data analysis revealed that at the end of day 8, LD₅₀: 1.091 x 10⁵ copies/mL⁻¹, LT₅₀: 5 days, LD₉₅: 8.94 x 10⁷ copies/mL⁻¹, and LT₉₅: 7 days. After the lethality of the densovirus on insects was proven, a formulation called Tenebriokillers was prepared using this virus. The dose response test results of the prepared formulation also showed that five doses of the formulation were pathogenic to *T. molitor* larvae. In the final step, the formulation stability test experiments showed that at the end of the 14th day, the mortality rate of the fresh formulation (0 months) was 100%, while at 4°C, the mortality rate at the end of 3 and 6 months was 100%, and at 25°C, the mortality rate at the end of 3 and 6 months was 98% and 95%, respectively. With the preparation of this densovirus-based bioinsecticide, which we named Tenebriokiller, a significant contribution has been made to the control of *T. molitor*.

Keywords: Densoviruses, *Tenebrio molitor*, Bioinsecticide, Formulation

İÇİNDEKİLER

ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ VE ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Depo Zararlıların Sınıflandırılması	3
1.2. Yaygın Depo Tahıl Zararlıları.....	4
1.3. Biyopestisitler	4
1.4. Densoviruslerin Sınıflandırılması	6
1.5. Densoviruslerin Genom Organizasyonu	7
1.6. Densoviruslerin Replikasyonu	8
1.7. Böceklerde Densovirus Semptomları.....	9
1.8. Biyolojik Mücadelede ve Konakçı Yelpazesinde Densoviruslerin Kullanılabilirliği.....	11
3.1. Böcek Yetiştirme.....	16
3.2. <i>T. molitor</i> Larvalarından Morfolojik Densovirus Karakterizasyonu	16
3.3. Virus Saflaştırması ve Elektron Mikroskopisi	16
3.4. <i>T. molitor</i> Larvalarından Viral DNA Ekstraksiyonu ve Kısmi <i>nsI</i> Geninin Amplifikasyonu.....	17
3.5. Tam genom analizi.....	18
3.6. Filogenetik ve Kimura-2 parametre analizi.....	18
3.7. Amino asit polimorfizmi ve restriksiyon endonükleaz profilleri	18
3.8. Densovirus Doz belirleme	19
3.9. Densovirusün <i>T. molitor</i> Larvaları Üzerinde Biyotest Çalışması	21
3.10. Formülasyon Hazırlama	21
3.11. Formülasyonun Farklı Sıcaklıklarda Stabilitésinin <i>in vivo</i> Şartlarda Değerlendirilmesi.....	22

3.12. İstatistiksel analiz	22
4.1. Böcek Yetiştirme.....	23
4.2. <i>T. molitor</i> Larvalarından Morfolojik Densovirus Karakterizasyonu	23
4.3. <i>T. molitor</i> Larvalarından Viral DNA Ekstraksiyonu ve Kısmi <i>nsI</i> Geninin Amplifikasyonu.....	24
4.4. Tam Genom Analizi.....	25
4.5. Filogenetik ağaç analizi	25
4.6. Kimura-2 Parametre Analizi	26
4.7. Aminoasit Polimorfizmi ve Restriksiyon Endonükleaz Profilleri	28
4.8. Densovirus Doz belirleme	31
4.9. Densovirusün <i>T. molitor</i> Larvaları Üzerinde Biyotest Çalışması	31
4.10. Formülasyon Hazırlama	33
4.11. Formülasyonun Doz Yanıt Testi	33
4.12. Formülasyonun Farklı Sıcaklıklarda Stabilitésinin <i>in vivo</i> Şartlarda Değerlendirilmesi	35
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	41
TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR.....	50
1. Makaleler	50

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. <i>T. molitor</i> 'un Biyolojik Sınıflandırması.....	3
Tablo 3.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar ve Modelleri	15
Tablo 4.1. TmDNV-TR ile diğer densovirüs genomlarının Kimura-2 parametre analiz27	
Tablo 4.2. <i>BsmAI</i> , <i>ApeKI</i> ve <i>BbvI</i> enzimlerine göre TmDNV-TR ve referans genomun (TmDNV) kısıtlama endonükleaz profili	29
Tablo 4.3. TmDNV-TR ve referans genomun (TmDNV) amino asit değişikliklerine neden olan varyasyon bölgeleri	29
Tablo 4.4. <i>Tenebrio molitor</i> larvaları üzerinde TmDNV-TR izolatının bulaşıcılığı için probit analizi ile tahmin edilen doz-ölüm oranı.....	32
Tablo 4.5. Formülasyon içeriği	33
Tablo 4.6. <i>Tenebrio molitor</i> larvaları üzerinde formülasyonun bulaşıcılığı için probit analizi ile tahmin edilen doz-ölüm oranı	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>T. molitor</i> yaşam döngüsü	2
Şekil 1.2. Densoviruslerin sınıflandırılması.	7
Şekil 1.3. Densoviruslerin yapısı (a) İkosahedral kapsid simetrisi olan virüs partikülünün morfolojik yapısı (b) ns1 proteininin yapısı (c) DNV genom haritası.	8
Şekil 1.4. Densovirus replikasyon süreci.	9
Şekil 1.5. <i>Tenebrio molitor</i> 'da densovirus patogenezinin şematik gösterimi.	10
Şekil 3.1. Tezde kullanılan yöntemlerin iş akışı	15
Şekil 3.2. pUC19 vektörü	21
Şekil 4.1. <i>T. molitor</i> larvaları a. Sağlıklı larvalar, b. Densovirus enfeksiyonu sonucunda ölen larvalar	23
Şekil 4.2. TmDNV elektron mikroskopisi görüntüsü	24
Şekil 4.3. Viral izolatların kısmi ns1 gen bölgesinin amplifikasyonu jel görüntüsü	25
Şekil 4.4. TmDNV-TR izolatının lineer genom haritası.	25
Şekil 4.5. <i>T. molitor</i> densovirusü ve tüm genom dizisine dayalı olarak yakından ilişkili densoviruslerin 1000 tekrarına dayanan maksimum olasılıklı filogenetik ağacı	26
Şekil 4.6. <i>In silico</i> kısıtlama endonükleaz profili	28
Şekil 4.7. Larvaların biyotest çalışma görüntüsü	31
Şekil 4.8. 8. günün sonunda, ham densovirusün (TmDNV-TR) beş farklı dozuna ($4 \times 10^4 - 4 \times 10^8$ kopya/mL ⁻¹) maruz bırakılan 10. evre <i>Tenebrio molitor</i> larvalarına ait Kaplan–Meier sağ kalım grafiği	32
Şekil 4.9. Biyotest çalışmasında ölen larvalar	33
Şekil 4.10. 9. günün sonunda, formülasyonun beş farklı dozuna ($2.8 \times 10^4 - 2.8 \times 10^8$ kopya/mL) maruz bırakılan 10. evre <i>Tenebrio molitor</i> larvalarına ait Kaplan–Meier sağ kalım grafiği	34
Şekil 4.11. Formülasyonun stabilite testi öncesi görüntüsü	35
Şekil 4.12. Formülasyonun stabilite testi. Uygulamadan sonraki 10. gün sonunda 10. evre <i>Tenebrio molitor</i> larvalarında gözlenen düzeltilmiş ölüm oranları. (LSD karşılaştırma testi: $p > 0.05$)	35
Şekil 4.13. Densovirusün izolasyonu ve formülasyon aşamaları	36

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

°C	Derece
µL	Mikrolitre
m	Metre
Mda	Mega dalton
%	Yüzde işareti
Mg	Mikrogram
Ng	Nanogram
Cm	Santimetre
G	Santrifüj devir sayısı
V	Volt
R ²	Regresyon Eğrisi
Ct	Döngü eşiği
LD ₅₀	Popülasyonun %50'sini öldüren doz
LT ₅₀	Popülasyonun %50'sinin öldüğü zaman dilimi
LD ₉₅	Popülasyonun %95'ini öldüren doz
LT ₉₅	Popülasyonun %95'inin öldüğü zaman dilimi
X ²	Ki-kare
Bç	Baz çifti
DNV	Densonükleoz virüs (Densovirüs)
ITR	Ters terminal tekrarı
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
VP	Yapısal protein
NS	Yapısal olmayan protein
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
ssDNA	Tek iplikçikli DNA
PBS	Fosfat tamponlu salin
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RT- PCR	Gerçek zamanlı PCR
LBamp	Ampisilin içeren luria besiyeri
NCBI	National Center for Biotechnology Information

pH	Bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesini tarif eden ölçü birimi
dH ₂ O	Distile su
LSD	En küçük anlamlı fark
<i>FL</i>	Güven aralığı
<i>SE</i>	Standart hata
<i>df</i>	Serbestlik derecesi



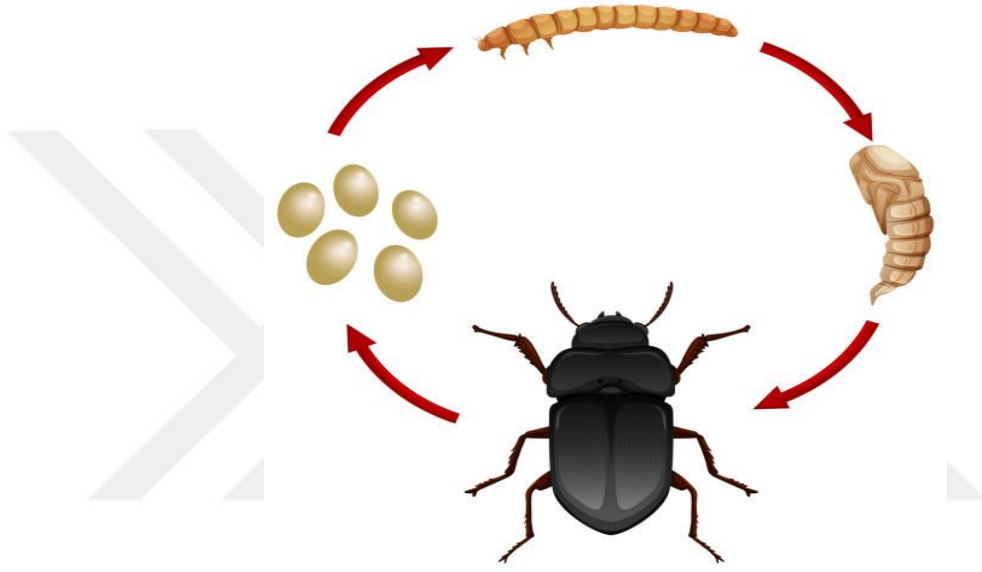
1. GİRİŞ

Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae) halk arasında sarı un kurdu olarak bilinmektedir. Avrupa’da yaygın olarak yetiştirilen ve ticareti yapılan bir böcek türüdür (Megido, 2015). *T. molitor* türünün kökeni Doğu Akdeniz bölgesi sayılsa da, kolonizasyon ve ticaret nedeniyle şu anda dünya çapında çeşitli bölgelerde bulunmaktadır (Toviho, 2022). *T. molitor* ‘un yüksek besin ve ticari değeri göz önüne alındığında, tarım endüstrisi bu böceğin seri üretimine büyük ilgi göstermektedir. Araştırmalar, un kurdu ununun besin profilinin soya ununa benzer olduğunu ve bu nedenle hayvan yemlerinde soya unu ve diğer geleneksel protein kaynaklarının yerine kullanılabileceğini göstermiştir (Toviho, 2022). Bu faydaların yanı sıra bu böceğin ürün kontaminasyonu ve kaybı gibi zararlı etmenleri de mevcuttur. Dünya çapında depolanmış ürünleri önemli derecede etkileyen ve un, tahıl ve türevleri ürünlerde hem miktar hem de kalite kaybına sebep olan önemli bir zararlı türüdür. Bu türün hem larvası hem de yetişkini, beslendikleri ürünlerin üzerine dışkılarını bırakarak ürünlerin kontaminasyonuna da neden olmaktadır (Hagstrum, 2009). Ayrıca son yıllarda hayvan yemi ve alternatif protein kaynağı üretiminde değerlendirilen bir tür olması, *T. Molitor*’un biyolojisi, hastalıkları ve yönetim stratejileri üzerine araştırmaların önemini artırmaktadır. Bazı çalışmalarda, depolanmış böceklerin gıda olarak tüketilmesinin hayvansal proteinlere değerli bir alternatif olduğu gösterilmiş olsa da (Caparros Megido, 2014), insan gıdası olarak satılan taze larvalarda potansiyel gıda kaynaklı patojenlerin varlığı bildirilmektedir (Stoops J, 2016). Bu durum, depolanan ürünlerin hijyeninin bozulmasına yol açmakla beraber, bunları tüketen insanların sağlığını tehlikeye atmaktadır. İnsanların kontamine gıdaları bilmeden tüketmesi, ishal, solunum alerjileri, kaşıntı, astım, iştah kaybı, gelişme geriliği ve bakteriyel enfeksiyonlar gibi hastalıklara yol açmaktadır. Bunun yanı sıra *T. molitor*, depolardaki ölü farelerden veba basilini de gıdalara taşıyabilmektedir. Ayrıca, tahıl işçileri ve bu türü evcil hayvan yemi olarak üreten kişilerde de astım anafilaksisi ve alerjik reaksiyonlar gibi solunum bozukluklarına neden olduğu da bildirilmektedir (Freye, 1996).

Tahılların etkili bir şekilde depolanması, gıda güvenliğini sağlamak ve tarımı desteklemek için çok önemlidir. Bu, kıtlık dönemlerinde ve gelecekteki tüketim için tahılların mevcudiyetini sağlamak amacıyla hasat edilen tahılların korunmasını içerir. Yetersiz depolama tesisleri, fazla hasat dönemlerinde israf ve kıtlık dönemlerinde

kıtlığa yol açabilmektedir. Son zamanlarda, depolama, özellikle depolanan tohum ve tahılların kalitesini ve miktarını tehdit eden mantar ve böcek istilaları gibi önemli zorluklarla karşı karşıyadır. Bu durum, önemli ekonomik kayıplara yol açmakta ve gıda güvenliğini tehlikeye atmaktadır (Jose, 2024).

Bu sebeple *T. molitor*'un zararlı olarak neden olduğu ekonomik kayıplar ve artan üretim/ticari kullanım, etkin ve sürdürülebilir kontrol yöntemleri geliştirilmesi ihtiyacını güçlendirmektedir (Moruzzo, 2021). Bu durum, *T. molitor* yetiştiriciliğini hem ekonomik hem de biyoteknolojik açıdan ön plana çıkarmaktadır (Çanakçı, 2019).



Şekil 1.1. *T. molitor* yaşam döngüsü (iStock)

T. molitor holometabol (yumurta → larva → pupa → ergin) yaşam döngüsüne sahiptir. Yumurtadan çıkış süresi çevresel koşullara bağlıdır ve birkaç gün ila bir hafta arasında değişmektedir. Böceğin larva dönemi, beslenme ve büyüme açısından en zarar verici aşamadır. *T. molitor*'ün erginlerinde dişi birey gıda ortamına tek tek veya toplu olarak 400-500 kadar yumurta bırakmaktadır (Said, 2022). Gıda ortamında yumurtadan çıkan larvaların yaşama döneminin oldukça uzun (17-18 instar) olmasından ötürü, gıdalara olan zararı arttırmaktadır (Morales-Ramos, 2015). Gelişim süresi sıcaklık, nem ve besin kalitesi gibi çevresel faktörlere bağlıdır. Ayrıca bağışıklık ve stres yanıtları üzerine yapılan çalışmalar, türün çeşitli patojenlere karşı karmaşık savunma mekanizmaları geliştirdiğini göstermektedir (Muñoz-Seijas, 2024). Özellikle kimyasal pestisitlerin zararlılarda direnç gelişmesine neden olması ve ürün üzerinde kalıntılar bırakarak hedef olmayan organizmalar üzerinde toksik etkilere sahip olması bu

pestisitlerin kullanımını önemli derecede kısıtlamaktadır. Bu nedenle zararlı böcekleri kontrol etmek için doğal yöntemler kullanılmalıdır (Talukder, 2009). Bu yöntemlerin başında hastalıklı böceklerden izole edilen mikrobiyal patojenlerin organik biyopestisit olarak kullanılma potansiyeli üzerine yapılan çalışmalar gelmektedir.

Tablo 1.1. *T. molitor*'un Biyolojik Sınıflandırması (Vikipedi, 2025)

Üst Alem	Eukaryota
Alem	Animalia
Alt Alem	Eumetazoa
Şube	Arthropoda
Alt Şube	Hexapoda
Sınıf	Insecta
Takım	Coleoptera (kın kanatlılar)
Familya	Tenebrionidae (kara böcekgiller)
Alt Familya	Tenebrioninae
Cins	<i>Tenebrio</i>
Tür	<i>T. molitor</i>

1.1. Depo Zararlılarının Sınıflandırılması

Birincil ve ikincil zararlılar, hem hasarlı hem de hasarsız tahıllarla beslenebilme özellikleri nedeniyle depo böcek zararlılarının ana türleridir (Deshwal, 2020). Birincil zararlılar, verdikleri zararın derecesine göre büyük ve küçük kategorilere ayrılmaktadırlar. Birincil zararlılar arasında, dış besleyiciler tahılların dış kısımlarını, yani tohum ve endospermi tüketmektedir (Demis, 2022). Bu gruba örnek olarak, *Angoumois* tahıl güvesi (*Sitotroga cerealella*), tahıl ambarı böceği (*Sitophilus granarius*), baklagil böceği (*Bruchus rufimanus*) ve pirinç böceği (*Sitophilus oryzae*) sayılabilmektedir. Buna karşılık, içten beslenenler tohumların içinde yaşamakta, tahılların üzerine veya içine yumurta bırakıp önemli çimlenme kaybına neden olmaktadır (Srivastava, 2016). Hem dış besleyiciler hem de iç besleyiciler, hasarlı veya mekanik olarak kırılmış tohumlara saldırarak önemli hasara neden olmaktadır. Öte yandan, ikincil zararlılar, zaten istila edilmiş mahsullerle beslenir ve parçalanmış tohumlar, mantar büyümesi, ölü böcekler ve hayvan atıkları gibi organik kalıntılara odaklanmaktadır (Kumar, 2017). Yaygın örnekler arasında akarlar ve peynir akarları

bulunmaktadır. İkincil zararlıların neden olduğu hasar, çimlenme kaybı, kontaminasyon, ağ oluşumu, topaklanma ve depolanan tahılların genel bozulmasına neden olur ve bu durum genellikle mantar aktivitesi ve nem göçü nedeniyle daha da kötüleşmektedir (Ahmad, 2021).

1.2. Yaygın Depo Tahıl Zararlıları

Depolanan tahıllardaki zararlılar, dünya çapında gıda güvenliği ve tarım ekonomileri için önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Başlıca kategoriler arasında un ve tahıl böcekleri, tahıl kurdu (*Sitophilus granarius*), böcekler ve güveler, un kurdu (*T. molitor*), kitap biti (*Psocoptera*), tahıl akarı (*Acarus siro L.*) ve un güvesi (*Pyrallis farinalis*) bulunmaktadır (Rajendran, 2020). En yaygın ve yıkıcı zararlılar arasında, pas kırmızısı un böceği (*Tribolium castaneum*), karışık un böceği (*Tribolium confusum*), testere dişli tahıl böceği (*Oryzaephilus surinamensis*), büyük dolap böceği (*Blattella germanica*) ve küçük dolap böceği (*Blattella germanica*) gibi tahıl ve un böcekleri bulunmaktadır. Bu zararlılar tahıl, un, fındık ve çikolata gibi çeşitli gıda maddelerine bulaşarak, bulaştıkları ürünlerde kötü koku ve tat değişikliklerine neden olmaktadır. İstilaları önlemek için uygun arındırma ve havalandırma şarttır ve haşere yönetimi uzmanları erken teşhis ve tedaviyi önermektedir (Kumar, 2017).

1.3. Biyopestisitler

Biyopestisitler; hayvanlar, bitkiler, bakteriler ve çeşitli mineraller şeklinde özetlenebilecek birden fazla doğal ana maddeden oluşan ve vektörle mücadelede bu yöntemlerin kullanılması esasına dayanan pestisit çeşitleridir (Pesticides, 2025). Biyopestisitler, çevre dostu özellikleri ile önemli zararlıları kontrol edebildiği gibi genellikle kimyasal pestisitlerden daha az toksik ve zararlıdır. Bu sebeple de çevre ve insan sağlığı için daha az tehdit oluşturduğu düşünülmektedir (Mazid, 2011). Bu avantajlarından ötürü tüm dünyada biyolojik mücadele kapsamında oldukça önem kazanmış ve kimyasal pestisitlere göre etki yavaşlığı, raf ömrü kısalığı gibi olumsuz özellikleri olmasına rağmen yinede en önemli faktör olan sağlık ve dönüştürülebilirlik gibi üstünlüklerinden dolayı ön plana çıkan bir mücadele yöntemidir (Balcı, 2020). Biyolojik mücadelede ana etmen olarak mantar, nematod, bakteri, protozoa ve virüsler kullanılmaktadır. Bu mikroorganizmaların yaygın kullanılması ve giderek bununla ilgili çalışmaların artış göstermesi; kimyasal maddelerden farklı olarak konak spesifik

olmaları, hedef olmayan organizmalara zarar vermemeleri, doğada kalıntı bırakmamaları, çevre dostu ve güvenilir olmaları gibi sebeplerden ötürüdür (Eroglu G. B., 2022). Virüsler bu mikroorganizmalar arasında en yaygın olarak kullanılanlardır ve virüsler genellikle sindirim sistemi ile ağız yoluyla konakçılarına girer ve enfeksiyona neden olmaktadır (Tokarev Y.S, 2020). Virüs bulaşmış böceğin sindirim sistemi bozulmakta ve böylece birçok organın zarar görmesiyle böcek hastalanıp ölmektedir. Entomopatojenik virüslerin en az 16 familyasının böceklerle mücadelede etkili olduğu gözlemlenmiştir (Tanada, 2012). Bu grubun öne çıkan entomopatojeni bakülovirüslerdir. Bakülovirüsler çeşitli tarım ve orman zararlılarının kontrolünde biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılmaktadır (Payne, 1986), ve ticari olarak üretilmektedir (Lacey, 2015). Bakülovirüslerin bilinen konakçılarının çoğu Lepidoptera takımına ait olup, diğerleri ise Diptera ve Hymenoptera takımlarına aittir (Jehle, 2006). Son zamanlarda artan çalışmalar ile birlikte bakülovirüslere ek olarak densoviruslerinde biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılması ön plana çıkmaktadır. Bunun başlıca sebeplerinden biri densoviruslerin daha geniş bir dağılıma sahip olmasıdır. Blattodea, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Odonata ve Orthoptera dahil olmak üzere birçok böcek takımından izole edilmiştir (Harish, 2022).

Densovirusler, Parvoviridae ailesinde yer almakta ve ekinodermatalar, böcekler ve kabuklular gibi omurgasızları enfekte etmektedir (Kawase, 2017). Doğrusal, tek iplikli genom yapısına sahip (Cotmore, 2019) bu virüsler 18-28 nm boyutlarıyla en küçük DNA virüsleri arasında yer alırlar ve zarfsızlardır (Becnel, 2007). Bu da onları çevresel koşullara daha dirençli ve diğer virüslerden farklı kılar. Dictyoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Coleoptera, Lepidoptera ve Orthoptera dahil olmak üzere çok çeşitli böcek takımlarından izole edilmiş olup (Aş & Eroğlu, 2025), biyolojik kontrollerinde kullanılabilirliklerine dair çalışmalar yapılmıştır.

Densovirusler, densonükleoz virüsleri (DNV) olarak da bilinir ve enfekte olmuş hücrelerin karakteristik olarak yoğun boyanmış çekirdekler geliştirmesi nedeniyle bu isimle anılırlar (Afanasiev, 2000). DNV'ler omurgasız konakçıların çekirdeklerinde çoğalır ve büyük dairesel inklüzyonlar oluştururlar. İlk olarak 1964 yılında *Galleria mellonella* larvalarından tanımlanmıştır. DNV'lerin, omurgasızlara özgü olmaları, oral enfeksiyonla yayılabilmeleri, stabil olmaları ve konakta belirgin morfolojik semptomlar göstermeleri gibi biyolojik mücadele için önemli avantajları bulunmaktadır (Pigeyre, 2019). DNV içerikli dünyada önemli bir biyopestisit olan Biokiller adlı ürün, bugüne

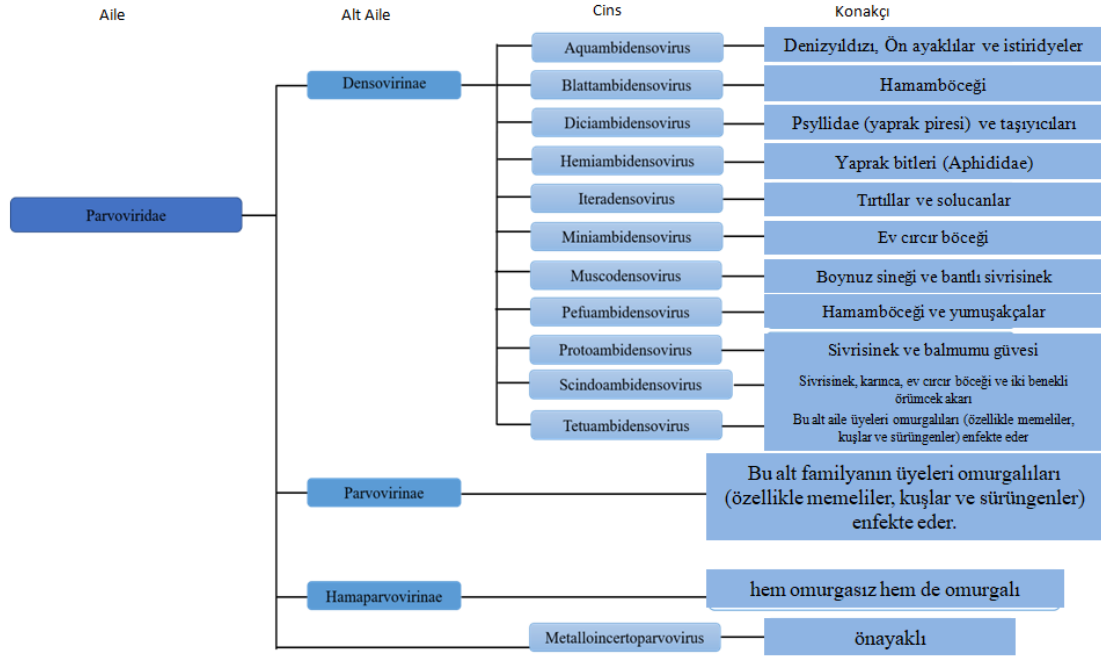
kadar ticari olarak satılan tek densovirus bazlı üründür (Biokiller, Çin). Bu ürün, *Periplaneta fuliginosa*'dan izole edilen bir densovirus (PfDNV) içermektedir ve yirmi yıldır hamamböceği kontrolü için jel formunda geliştirilip satılmaktadır (Wang Dong, 2012). Çin'de, *Periplaneta fuliginosa* densovirus virüsü (PfDNV, cins Ambidensovirus, family Parvoviridae) içeren ilk densovirus biyopestisit ürünü olan Biokiller Cockroach Killer Bait Gel'in ticarileştirilmesi göz önüne alındığında, DNV'lerin ve/veya rekombinant DNV biyopestisitlerin kullanımı ulaşılabilir bir hedef haline gelmiştir (Sun, 2019).

1.4. Densoviruslerin Sınıflandırılması

Parvoviridae familyası 1975 yılında tanıtılmıştır. Ardından 1993 yılında omurgalıları enfekte eden Parvovirinae ve omurgasızları enfekte eden Densovirinae olmak üzere iki alt familyaya ayrılmaktadır (Cotmore SF A.-M. M.-H., 2019). İki alt familyanın da çok dar bir konakçı spektrumuna sahip olması sebebiyle, bu sınıflandırma uzun süredir filogenetik analizlerle desteklenmektedir. 2012 yılında Chapparvovirus olarak bilinen bir cins tanıtılmıştır, fakat bu cinse ait izolatlar, böbrek ve karaciğer gibi bazı omurgalı dokularında, dışkıda ve hatta kanda tespit edilmiştir (Reuter G, 2014). Aynı zamanda, eklembacaklıların genomlarında endojen chapparvovirus dizilerinin tanımlanması, hem Parvoviridae familyasının hem de Densovirinae alt familyasının sınıflandırmasının düzenlenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır (Mietzsch M, 2019). Densovirusler, birçok böcek türünden izole edilmiş ve tüm densoviruslerde yüksek oranda korunmuş olan ns1 proteininin dizi benzerliğine göre cinslere ayrılmaktadır. Densoviruslerin aynı türün üyeleri olarak kabul edilebilmesi için, ns1 proteinlerinin amino asit dizisi benzerliği %85'ten fazla olmalıdır. Ayrıca, aynı cinsin üyeleri ns1 proteinleri arasında en az %35 benzerlik olmalıdır (Penzes JJ, 2020).

ICTV'nin son güncellemesine göre, Parvoviridae familyası artık üç alt familyaya (Densovirinae, Parvovirinae ve Hamaparvovirinae) ve bir sınıflandırılmamış cinse (Metalloincertoparvovirus) ayrılmıştır (Penzes JJ, 2020). Densovirinae alt familyası, 2020 yılında 11 cinse ayrılmıştır (Şekil 2). ICTV taksonomi tarayıcısından alınan verilere göre, Densovirinae alt familyasının 11 cinsi 64 tür içerir ve bu türlerin cinsler içindeki dağılımı şu şekildedir: Aquambidensovirus (24 tür), Leafambidensovirus (6 tür), Diciambidensovirus (3 tür), Hemiambidensovirus (3 tür), Iteradensovirus (7 tür), Miniambidensovirus (1 tür), Muscodensovirus (2 tür), Pefuambidensovirus (2 tür),

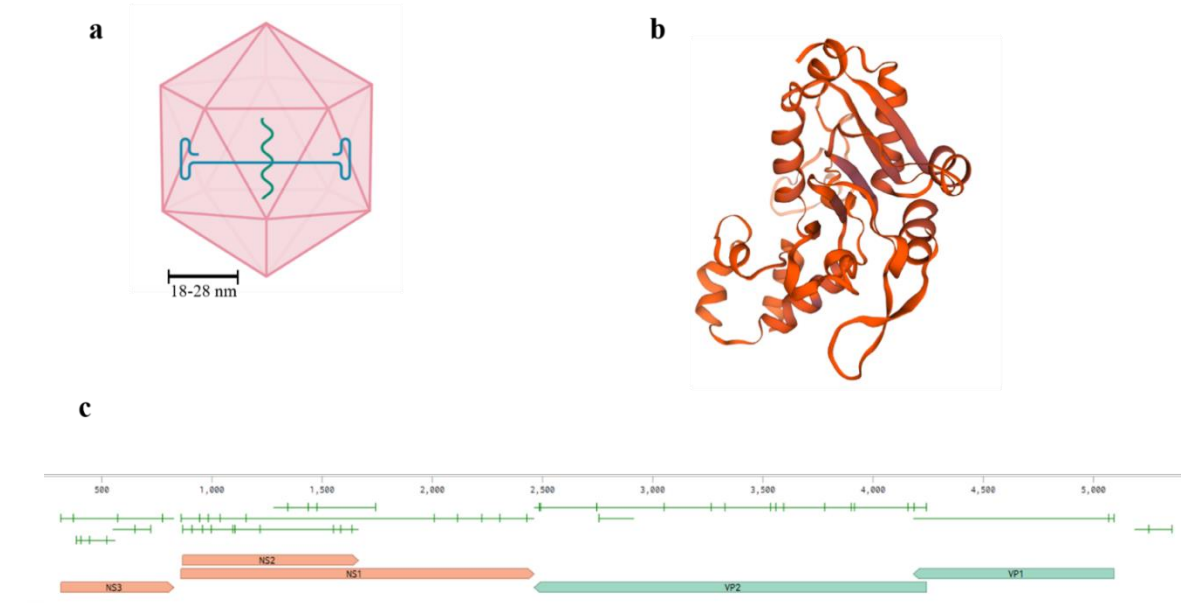
Protoambidensovirus (7 tür), Scindoambidensovirus (6 tür) ve Tetuambidensovirus (3 tür).



Şekil 1.2. Densovirüslerin sınıflandırılması (Aş & Eroğlu, 2025)

1.5. Densovirüslerin Genom Organizasyonu

DNV'ler, ikosahedral simetriye sahip, tek iplikli, zarfsız DNA virüsleridir ve genom boyutu yaklaşık 4000-6000 bp'dir (El-Far M., 2004). Tüm DNV'ler, replikasyon ve genom paketlenme için gerekli olan Y şeklinde ters terminal tekrarlarından (ITR) oluşan bir yapıya sahiptir (Kapelinskaya TV, 2011) (Şekil 3a). DNV'lerin moleküler kütlesi yaklaşık 6 Mda'dır ve bunun %20±30'u DNA, geri kalanı ise çoğunlukla proteindir (Johnson RM, 2018). Yapısal (VP) ve yapısal olmayan (NS) olmak üzere, genomda iki tür protein kodlanmaktadır. NS, viral genomun replikasyonundan sorumludur ve özellikle *ns1* olarak bilinen protein tüm DNV'lerde yüksek oranda korunmuş olduğundan, virüs sınıflandırması için önemli bir parametre olarak kabul edilmektedir (Cotmore SF A.-M. M.-H., 2019)(Şekil 3b). Yapısal proteinler, viral kapsidin oluşumundan sorumludur (Grenet ASG, 2015). Tüm DNV genomları, her bir zincirin 5' yarısında eşit olarak dağılmış NS ve VP genlerine sahiptir (Johnson RM, 2018)(Şekil 3c).

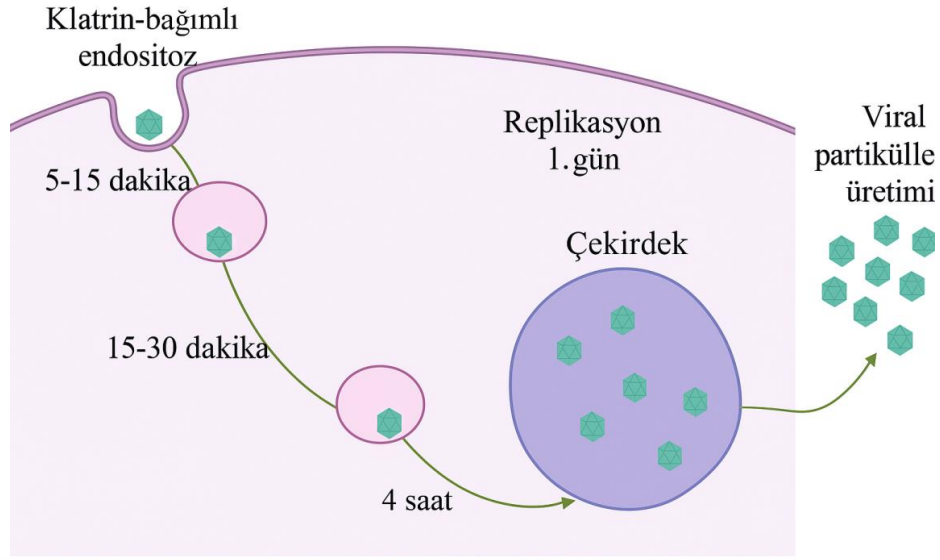


Şekil 1.3. Densoviruslerin yapısı (a) İkosahedral kapsid simetrisi olan virüs partikülünün morfolojik yapısı (b) *ns1* proteininin yapısı (c) DNV genom haritası (Aş & Eroğlu, 2025)

1.6. Densoviruslerin Replikasyonu

DNV'ler, klatrin aracılı endositoz yoluyla hücreye girmektedirler ve konak çekirdeğinde çoğalmaktadırlar (BA, 1985). Hücre yüzeyindeki glikoproteinler, glikanlar ve glikolipidler gibi çeşitli reseptörleri kullanarak hücreye girmektedirler (De Beeck AO, 1997). Endositozdan sonra, konak hücrenin endolizozomal sisteminden geçerler ve çekirdeğe ulaşırlar. Bu süre zarfında, viral partikül pH 7,4 ile pH 4,0 arasında değişen asidik bir ortama maruz kalmaktadır (Grenet ASG, 2015).

Virüs çekirdeğe ulaştığında, mRNA transkripsiyonu gerçekleşmekte ve *ns1* replikasyonu başlatılmaktadır. Ardından, konağın S fazı replikasyon mekanizması kullanılarak replikasyon başlamaktadır (Cotmore SF T. P., 2007). Replikasyon sırasında, saç tokası yapısı sürekli olarak açılır ve replike edilmektedir. Ardından, yuvarlanan saç tokası replikasyon süreci başlamaktadır. Bu süreçte, genom boyunca hareket etmek için replikasyon yönünü değiştirmek üzere yeniden katlanmaktadır. Bu, genomun birçok kopyasını içeren bir molekül üretmekte ve yeni oluşan ssDNA'lar bu konkatemerden çıkarılıp, kapside paketlenmektedir. Son olarak, olgun viryonlar ekzositoz veya lizis yoluyla hücreden çıkmakta ve replikasyon süreci sona ermektedir (Şekil4).

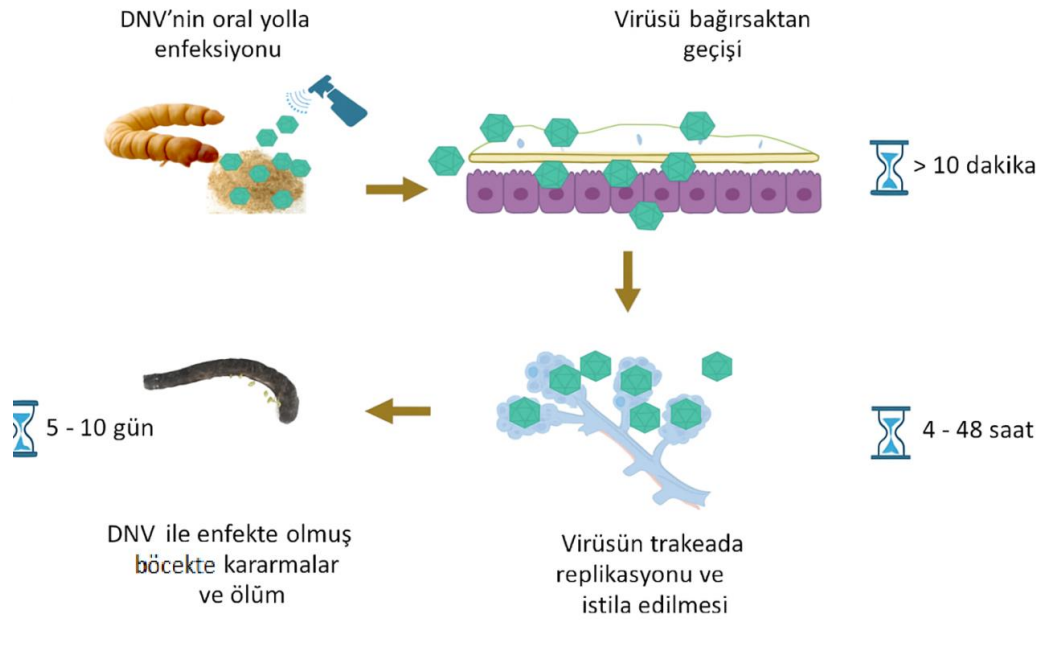


Şekil 1.3. Densovirus replikasyon süreci (Aş & Eroğlu, 2025)

1.7. Böceklerde Densovirus Semptomları

DNV enfeksiyonu, böcek dokularında büyük virion partiküllerinin ve sitoplazmik parakristal virion dizilerinin birikmesinden kaynaklanan atomal aşırı büyüme ile karakterizedir (Harish S, 2021). DNV'ler konakçı organizmalarda ciddi hastalıklara neden olmakta ve yüksek virülansları ve bulaşıcılıkları nedeniyle önemli böcek zararlılarının biyolojik mücadelesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, densovirusler klasik biyopestisitlere göre bir ilerlemeyi temsil etmekte ve geleneksel böcek ilaçlarına, türlere özgü bir alternatif sunmaktadır (El-Far M S. J., 2012). DNV enfeksiyonunun semptomları genellikle iştahsızlık ve uyuşuklukla başlamaktadır. Ardından topallama ve deri değiştirme veya metamorfozun engellenmesi gelmektedir. Enfekte olan larvalar yavaş yavaş siyahlaşarak felç olmaktadır. Hamam böcekleri ve ev circır böceklerinde yaygın belirtiler arasında arka bacakların felci ve koordinasyonsuz hareketler bulunmaktadır (Eberle KE, 2012). DNV, konakçı larvaları enfekte ederek kütikül pigmentasyonunda değişiklikler, hareket kaybı ve ölüm gibi çeşitli belirtilere neden olmaktadır. Parazitliğin ve hasarın ciddiyeti, enfeksiyonun türüne bağlı olarak önemli ölçüde değişmektedir. Enfekte larvalarda gözlenen en çarpıcı belirti, vücudun tamamen kararmasıdır. Bu kararmadan önce, larvaların orta bağırsağında koyu renk değişikliği gözlenmektedir (El-Far, Li, Fediere, S, & Tijssen, 2004). Bazı densovirus türleri, konakçıların bağırsaklarında tümör benzeri lezyonlara da neden olmaktadır.

Enfekte olmuş larvalarda, bağırsak duvarının kalınlaşması ve opaklaşması ile birlikte orta bağırsak epitel hücrelerinde ciddi bozulma görülmektedir. Bu değişiklikler bağırsak içeriğinin bulanıklaşmasına neden olmaktadır. Beslenme yoluyla enfekte olan larvalarda, virüsün orta bağırsak hücrelerinde çoğaldığı ve bağırsak bariyerine zarar veren bir patojenik mekanizmaya yol açtığı bulunmuştur (Wang Y, 2013) (Şekil 5). Peritrofik membran, böceklerde orta bağırsakta koruyucu bir astar görevi gören kritik bir bileşendir. Önemli bir bariyer görevi görerek, ağızdan alınan virüslerin nüfuz etmesini ve enfeksiyonu başlatmasını zor ve karmaşık hale getirmektedir. DNV kapsidlerinin bu bariyere nasıl yapıştığını ve hedef hücrelere ulaşmak için bu bariyeri nasıl aştığını araştırmak için yapılan bir çalışmada mikroskopi, biyokimya, proteomik ve transkriptomik gibi yöntemler bir arada kullanılmıştır. Sonuçlar, peritrofik membran, açıkta kalan müsinler ve müsin olmayan protein reseptörlerinin DNV ve diğer böcek patojenleri için bağlanma bölgeleri olarak işlev gördüğünü göstermektedir. Bu, virüs ile kitin, glikanlar ve proteinler gibi bileşenler arasındaki etkileşimin bu sürecin temel mekanizmaları olduğunu vurgulamaktadır (Pigeyre, 2019).



Şekil 1.4. *Tenebrio molitor*'da densovirus patogenezinin şematik gösterimi (Aş & Eroğlu, 2025)

1.8. Biyolojik Mücadelede ve Konakçı Yelpazesinde Densovirüslerin Kullanılabilirliği

Biyolojik mücadelede böcek virüslerinin kullanımı 1911 yılından beri bilinmektedir (J., 1998). Densovirüsler (DNV) ilk olarak 60 yıl önce keşfedilmiş olmasına rağmen, omurgalılara bulaşmadıkları gösterilene kadar biyolojik mücadele için aday olarak değerlendirilmemiştir (Johnson RM, 2018). Ancak, son 20 yılda yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, bunların omurgalılarda hiç çoğalamadığını gösterdiğinden, artık bakülovirüslerin alternatifi olarak önemli bir biyolojik kontrol ajanı olarak ortaya çıkmaktadır (Jiang H, 2007) (Batoool K, 2022). DNV'lerin yüksek virülans ve konak spesifikliğı, omurgalılara bulaşamama ve aşırı çevre koşullarına karşı yüksek direnç gibi bazı özellikleri, onları tarım ve tıp açısından önemli zararlıların popülasyonlarına karşı potansiyel olarak etkili biyolojik kontrol ajanları haline getirmektedir (Penzes JJ, 2020). Ayrıca, densovirüsler DNA virüsleri oldukları ve bu nedenle bir DNA onarım mekanizmasına sahip oldukları için, mutasyonların konakçı özgüllüğünü değiştirmesine izin vermemektedirler (Parry R, 2019).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Krieg ve ark. *T. molitor*'ü enfekte eden bir virüsü ilk kez tanımlamıştır (Krieg, 1969), Elektron mikroskopunda görüntülenen viral yapıların densovirus olabileceği düşünülmüştür. Ancak moleküler analiz ve biyotest yapılmamıştır (Kelly, 1979) ve (Black, 1981) yine elektron mikroskopisi ile *T. molitor*'ün iridovirus (tip 29) ile enfekte olduğunu bildirmiş ve yapılan çalışmalar sonucunda virüs replikasyonunun sitoplazmada gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

La Fauce ve ark. *T. molitor* larvalarını bir kabuklu türü olan *Penaeus merguensis* densovirus ile enfekte etmiş ve larvaların %20'sinin bu virüsü çoğalttığını belirtmiştir (La Fauce, 2008). Böylece böcek modellerinin kabukluların viral hastalıkları için potansiyel kullanım imkanı sunduğunu bildirmiştir.

Szelei ve ark. *T. molitor* larvalarını incelerken yağ gövdesi gibi çeşitli dokularında renk bozulması ve sitopatik modifikasyonlar tespit etmiştir (Szelei, 2011). Ayrıca, *T. molitor*'ün yetiştirildiği alanda densovirus ile enfekte *Acheta domesticus* olması sebebiyle böcek türleri arasında densovirusün yatay olarak bulaşma olasılığı olduğu bildirilmiştir.

Sinnuengnong ve ark. (2018), *Penaeus stylirostris*'ten izole ettikleri densovirusün (PstDNV) boyutunun 20 nm olduğunu bildirmişlerdir, bu da literatürdeki diğer PstDNV izolatlarıyla tutarlıdır (Hou, 2009). Armien ve ark. , *T. molitor*'dan izole ettikleri virüsün çapının 23,79 ila 26,99 nm arasında değiştiğini ve ortalama 25,19 nm olduğunu bildirmiştir (Armién, 2023). Kim ve ark, *Gryllus bimaculatus*'tan izole ettikleri densovirusün boyutunun 20-25 nm olduğunu bildirmiştir (Kim, 2024).

Gencer ve ark. Farklı bir böcekten izole edilen yaban tip ve rekombinant tip iridovirusü (tip 6) enjeksiyon yolu ile *T. molitor* larvalarına vermişlerdir (Gencer, 2020). Biyotest çalışmaları sonucunda larvalarda felç gözlenmiş ve enfeksiyondan üç gün sonra larvaların koyu bir renk alarak öldüğünü bildirmiştir.

Armien ve ark. *T. molitor* üreten bir tesiste toplu ölümler olduğunu bildirmişlerdir (Armién, 2023). Yapılan moleküler analizler sonucunda bu ölümlerin kaynağının bir densovirus olduğunu tespit etmişlerdir. Böceklerde epidermis, ön ve arka bağırsak, trakeal epitel hücrelerinin virüs enfeksiyonundan etkilendiğini bildirmişlerdir. Enfeksiyon sonucunda böceklerin hareket kabiliyetinde, gıda alımında, solunumunda ve

vücut su dengesinde bozulmalar meydana gelmiş ve ölüm oranı %100 olarak belirlenmiştir.

Penzes ve ark. Parvoviridae familyası, hem omurgalıları hem de omurgasızları enfekte edebilen geniş bir virüs grubu olduğunu yazmaktadır (Penzes JJ, 2020). Ancak, omurgasızları enfekte eden Densovirinae alt familyasının konakçı spektrumu konusunda belirsizlikler bulunmaktadır. 1960'larda densoviruslerin (DNV) fare L hücrelerini enfekte edebileceği bildirilmiş olsa da (67-69), daha sonra bu gözlemlerin viral replikasyonu göstermediği anlaşılmıştır. DNV enfeksiyonu, (El-Far M., 2004) ve arkadaşları (2004) tarafından viral transkripsiyon, replikasyon, entegrasyon ve üretim açısından incelenmiştir. Bulgular, L hücrelerinin ve diğer omurgalı hücrelerinin densovirus replikasyonunu veya transkripsiyonunu desteklemediğini, oysa viral DNA replikasyonu ve transkripsiyonunun L. Dispar hücrelerinde (LD652) gerçekleştiğini göstermiştir. Viral genomun LD652 hücrelerinde plazmidten çıkarıldığı ve hem NS hem de VP mRNA'larının tespit edildiği, ancak L hücrelerinde tespit edilmediği bildirilmiştir. Viral genomun L hücrelerinde konakçı kromozomuna entegre olduğu, ancak entegrasyondan sonra transkripsiyonun gerçekleşmediği belirtilmiştir. Sonuç olarak, densoviruslerin böcek hücrelerinde verimli replikasyon ve transkripsiyon gerçekleştirebildiği, ancak memeli hücrelerinde enfeksiyonu başlatamadığı gösterilmiştir. Bu, densoviruslerin gen terapisi vektörleri olarak potansiyelini artırmaktadır.

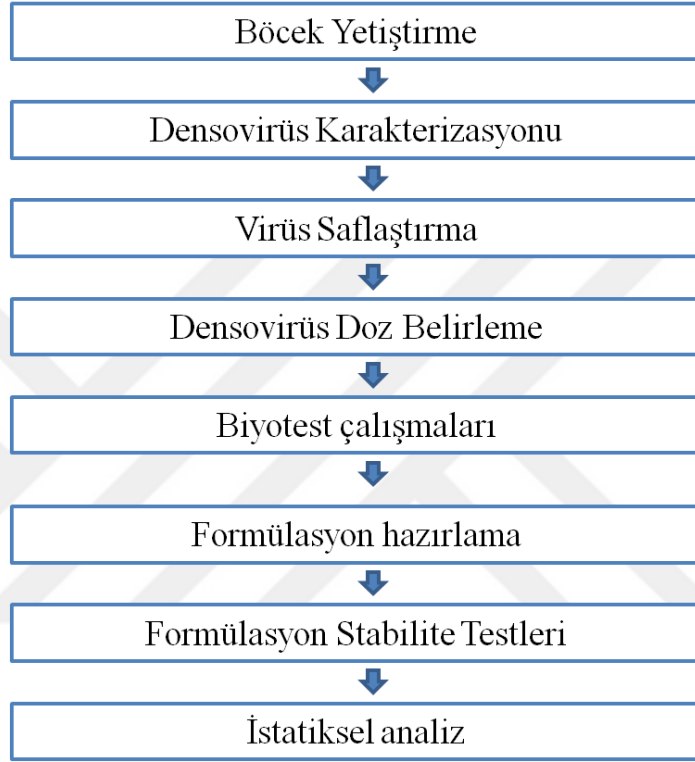
Literatür özetinden de anlaşılacağı gibi *T. molitor*'den şimdiye kadar densovirus ve iridovirus olmak üzere iki çeşit entomopatojen virüs tespit edilmiştir. Her iki virüste DNA virüsüdür ancak aralarında önemli farklar bulunmaktadır. Bunlardan ilki iridoviruslerin oral enfektivitesinin oldukça düşük olmasıdır. Bu nedenle iridovirusler böceklere enjeksiyon yolu ile verilmektedir (Williams T. B.-S., 2005). İridovirusler rekombinant hale getirilerek oral enfektiviteleri hızlandırılabilir (Ozgen, 2014). Ancak pek çok ülkede rekombinant ürünlerin biyopestisit olarak uygulanması yasak olduğundan dolayı bu çalışmalar 'pure science' olarak laboratuvar ölçeğinde kalmaktadır. Densoviruslerin ise oral enfektivitesinin hızlı olduğu bilinmektedir (Kittayapong P. B., 2001). İridovirus ile densovirusler arasındaki bir diğer fark ise densoviruslerin zarfsız olması, iridoviruslerin ise zarflı olmasıdır. Zarfsız virüslerin termostabilitesinin zarflı virüslere göre daha yüksek olması formüle hale getirilen virüslerin raf ömrü ve depolaması için önemlidir (Kadji, 2022). Densoviruslerin, konak

böceklerinin ölümünden sonra 18 aydan uzun süre aktif olarak bulaşıcı konumunda olduğu bildirilmiştir (Tokarev Y. M., 2020). Bu bağlamda densovirusler ideal bir biyolojik mücadele ajanı olabilir. Bir diğer fark ise viruslerin *in vitro* ortamda üretim seçenekleridir. Densoviruslerin genomu (4-6 kb), (Cotmore SF A.-M. M.-H., ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: Parvoviridae, 2019) iridoviruslerin genomuna (212 kb) (Jakob, 2001) göre oldukça küçük olduğu için *in vitro* ortamda bakteriyel bir vektör ile de oldukça hızlı ve çok miktarda üretilebilirler (Guo, 2000). Ancak iridoviruslerin *in vitro* üretimi böcek hücre kültürüne bağlıdır (Gencer, 2020) ve bu durum büyük ölçekli üretimde maliyeti oldukça arttırmaktadır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışması Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (YÜTAM) Laboratuvarlarında yapılmıştır. Yapılmış olan yöntemlerin iş akışı aşağıda verilmektedir (Şekil 6).



Şekil 3.1. Tezde kullanılan yöntemlerin iş akışı

Tablo 3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar ve Modelleri

Jel Görüntüleme Sistemi	Bio-rad Chemidoc MP İmaging
Elektroforez Sistemi	BioRad Mini ReadySub-Cell™
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
Mikrobiyolojik Steril Kabin	ESCO NordicSafe™
RT-PCR Cihazı	Qiagen Rotor-Gene Q

Tablo 3.1. (devamı) Çalışmasında Kullanılan Cihazlar ve Modelleri

Mini Santrifüj	WiseSpin
Ultrasantrifüj	Hitachi micro ultracentrifuge CS 150NX
Otoklav	WiseSpin
Isı Bloğu	Bioer
Doku parçalama cihazı	Tissuelyser LT (Qiagen)
Hassas terazi	Weightlab instruments
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik

3.1. Böcek Yetiştirme

Deneylerde kullanılan *T. molitor* larvaları yerel bir evcil hayvan dükkânından temin edildi. Tür tanımlaması, Brendell (1975) tarafından açıklanan yöntem izlenerek, larvalar binoküler mikroskop altında incelenerek doğrulandı. Larvalar hava geçirgen plastik kutularda (9 × 16 × 5 cm) barındırıldı ve 26 °C, %65 bağıl nem ve 12:12 saat aydınlık/karanlık fotoperiyot ayarlı bir iklim odasında tutuldu. Yeni nesiller, deneylerde kullanılmak üzere kırılmış buğdayla beslenerek yetiştirildi (Ribeiro, 2018). Larvalar tam buğday unu ile beslendi ve su ihtiyaçlarını karşılamak için kaplara çeyrek dilim havuç konuldu.

3.2. *T. molitor* Larvalarından Morfolojik Densovirus Karakterizasyonu

Yetiştirilen böceklerde zamanla kararmalar, harekette yavaşlamalar gözlemlendi. Karararak ve hastalanarak ölen larvalar, Genomik DNA analizi yapılması için bir tüpte birleştirilerek -20 °C saklandı.

3.3. Virüs Saflaştırması ve Elektron Mikroskopisi

Virüs saflaştırılması, kendiliğinden ölen ve densovirus semptomları (vücudun kararması) gösteren *T. molitor* kadavraları üzerinde gerçekleştirildi. Bu larvalar test tüplerine yerleştirildi. Tüplerin içine 600 µl fosfat tamponu (PBS) ve steril metal boncuk eklenerek doku parçalama homojenizatöründe 45 dakika boyunca ezildi. Hücre kalıntılarını gidermek için tülbentten 3 kez ve diğer olası kirleticileri gidermek için 0,22 µm filtreden süzüldü. Virüs, 4°C'de 2 saat boyunca 155.000 g'de ultrasantrifüjleme ile

çökeltildi. Tüm tüplerdeki peletler 500 µl dH₂O içinde çözüldü ve konsantrasyonu belirlemek için hepsi tek bir tüpte birleştirildi. Virüslerin yapısını görmek ve boyutlarını belirlemek için virüs numunesi TEM için hazırlandı. 100 µl saf virüs fiksasyona tabi tutuldu. %2,5 glutaraldehit eklendi ve +4 °C'de bir gece boyunca fiksasyona tabi tutuldu. İlk fiksasyon adımından sonra, çözelti iki kez PBS ile yıkandı ve %1 osmium tetroxide ile muamele edildi ve +4 °C'de 1 saat tutuldu. İkinci fiksasyon adımından sonra, çözelti iki kez PBS ile yıkandı. Fiksasyondan sonra, saflaştırılmış virüsler %2 uranil asetat içeren bir ızgara üzerine 3 dakika boyunca yerleştirildi, üç kez ultra saf dH₂O ile yıkandı, havada kurutuldu ve TEM (Hitachi 7800) ile 200.000x büyütme oranında incelendi.

3.4. *T. molitor* Larvalarından Viral DNA Ekstraksiyonu ve Kısmi *nsI* Geninin Amplifikasyonu

Viral DNA, üreticinin talimatlarına göre Ecotech genomik DNA Kiti (kat no: E1075) kullanılarak izole edildi. 200 lizis tamponu ve 10 µl Proteinaz K, 100 µl virüse eklendi ve 55 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Ardından 10 µl RNaz A eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. 400 µl bağlanma tamponu ve 200 µl mutlak etanol eklendikten sonra, tüm karışım kolona aktarıldı. Oda sıcaklığında 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra, kolon yıkama tamponu ile yıkandı, santrifüjde 1 dakika kurutuldu ve 35 µl elüsyon tamponu ile elüe edildi. Elde edilen DNA'nın saflığı ve miktarı bir µdrop ile ölçüldü. Virüsün varlığını doğrulamak için, dejenere primer çifti (F: 5'-GWMAGGGWGACGAGCAACGTTC-3', R: (5'-RTTTCCTWGGTTCRTARTTWGGTTC-3') kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi (Tokarev Y. M., 2020). PCR reaksiyonu 50 µl olarak hazırlandı. Hazırlanan karışım şu şekildeydi: 2 µl ileri ve geri primer, 50 µg DNA, 25 µl EcoTaq 2x PCR Master Mix ve 50 µl'ye kadar dH₂O. PCR koşulları 35 döngü boyunca 98 °C'de 30 saniye, 94 °C'de 10 saniye, 61 °C'de 15 saniye ve 72 °C'de 1 dakika olup, son uzatma 72 °C'de 1 dakikadır. Reaksiyondan sonra, PCR ürünleri 3 µl Clearband güvenli DNA jel boyama solüsyonu (kat no. SDGS1) içeren %0,9 agaroz jel üzerinde 80 V'da çalıştırıldı. Elde edilen bantlar, Eco PURE jel saflaştırma kiti (kat no: 5003) kullanılarak jelden saflaştırıldı ve dizileme için Intergen'e (Ankara, Türkiye) gönderildi.

3.5. Tam genom analizi

Virüsün varlığını doğrulamak için kısmi gen dizisi elde edildikten sonra, her izolatin DNA örnekleri tam genom analizi için soğuk zincir ile Intergen'e (Ankara, Türkiye) gönderildi. Şirket tarafından gerçekleştirilen prosedürler aşağıda kısaca açıklanmıştır: DNA örnekleri 0,2 ng/μL'ye standartlaştırıldı. Okumalar Illumina'nın Miseq cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Hizalanmış dosyaların analizi IGV 2.3 yazılımı (Broad Institute) kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen konsensüs dizileri Clustal Omega kullanılarak hizalandı. Bize sağlanan dizi verilerinde adı TmDNV-TR olarak belirlenen izolatin, referans olarak MW628494 erişim numaralı densovirus genomu kullanıldı. Numunelerin doğrusal genom haritalarının oluşturulması için Benchling çevrimiçi aracı kullanıldı.

3.6. Filogenetik ve Kimura-2 parametre analizi

TmDNV-TR genom nükleotit dizileri MEGA11 kullanılarak hizalandı. Filogenetik analiz, maksimum olasılık yönteminde 1000 bootstrap ile Tamura-Nei modeli kullanılarak gerçekleştirildi. Transisyonların transversiyonlara oranını tespit etmek için Kimura-2 parametre analizi tercih edildi. Bu analiz, genellikle virüs izolatları arasındaki mesafeleri analiz etmek için kullanılır. Bu mesafeler, böcek densovirus izolatlarının tüm genom dizilerinin BioEdit programında hizalanmasından tahmin edildi ve Kimura analizi MEGA11 kullanılarak gerçekleştirildi. Nükleotid dizisi mesafelerine dayalı olarak virüs genomlarını tanımlamak için Kimura-2 parametre analizi gerçekleştirildi. Bu analiz, farklı böceklerden izole edilen virüs izolatlarının aynı izolat olması durumunda yanlış isimlendirilmesini önlemek için önemlidir. Virüs genomlarındaki nükleotid lokus mesafe değeri 0,015'ten azsa, iki izolatin aynı tür olduğu kabul edilmektedir (Wennmann, 2018) (Eroglu G. , 2022).

3.7. Amino asit polimorfizmi ve restriksiyon endonükleaz profilleri

Tespit edilen Türkiye kaynaklı densovirus izolatu ile referans genom (TmDNV) arasındaki genomik farklılıkları daha iyi tanımlamak için, amino asit polimorfizmleri ve kısıtlama profilleri incelenmiş ve karşılaştırılmıştır. Her iki izolatin protein kodlayan genlerinin amino asit dizileri Bioedit (7.1.3.0) programında ayrı ayrı hizalanmış ve farklılıklar tespit edilmiştir. İki izolatin genom dizileri, Benchling çevrimiçi aracı

kullanılarak *in silico* olarak *BsmAI*, *ApeKI* ve *BbvI* kısıtlama endonükleaz enzimleri ile kesildi ve genomlardaki farklılıklar belirlenmiştir.

3.8. Densovirüs Doz belirleme

Densovirüs doz belirleme işlemi, *ns1* geninin klonlanması ve RT-PCR işlemlerinin ardından formül kullanılarak yapılmıştır.

$$\text{Formül: Kopya/mL}^{-1} = \text{Kopya} / \text{Reaksiyon x Elüsyon hacmi (}\mu\text{L)} / \text{PCR hacmi (}\mu\text{L)} \times 1000 / \text{örnek hacmi (}\mu\text{L)}$$

Üstteki formül kullanılarak virüs konsantrasyonu kopya/mL⁻¹ cinsinde belirlenmiştir.

3.8.1. Densovirüs ns1 Geninin Klonlanması

a. Ligasyon

İlk olarak temizlenen *ns1* PCR ürünün pUC19 klonlama vektörüne ligasyonu gerçekleştirilmiştir. 15 μ L total reaksiyon için 1.5 μ L 10X tampon, 1.5 μ L T4 DNA ligaz enzimi, 1 μ L pUC19 vektörü, 6 μ L jelden temiz gen örneği ve 3 μ L dH₂O hazırlanmıştır. Bunlar birleştirilip quick yapıldı ve +4 °C buzdolabında gece boyu bekletilerek ligasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

b. Transformasyon

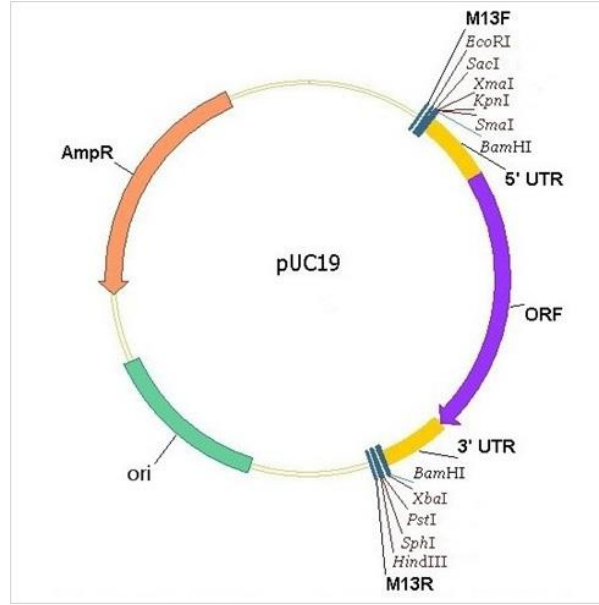
Kompetent *E.coli* DH5 α hücrelerinin buz üzerinde yaklaşık 10 dk çözünmesi beklendi. Yavaşça karıştırıldı ve tamamen çözüldükten sonra 50 μ L alınarak yine buz üzerinde yeni bir ependorfa aktarıldı. Üzerine ligasyon ürününden 5 μ L eklendi ve dikkatlice 5 kez alt üst edildi. 30 dk buz üzerinde bekletildikten sonra ısı blokta 42 °C 'de 1 dk ısıya maruz bırakıldı. Ardından tekrar iki dk buz üzerinde bekletildi. Hazırlanan steril 15'lik 500 μ L LBamp sıvı besiyeri üzerine yukarıda hazırlanan karışım eklenerek 37 °C'de 1 saat 200 rpm'de çalkalayıcılı inkübatöre bırakıldı. 5 adet LBamp agar besiyerine 100'er μ L transform olmuş hücre baget özesi kullanılarak yayma ekim yapıldı. Ekim yapılan petriler etrafı parafilm ile sarılarak 37°C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından petriler etüvden alındı ve 4°C konuldu. Yaklaşık 5-6 saat sonra petrilerden koloniler seçildi. İnkübasyonda büyüyen beyaz kolonilerin arasından 10 koloni steril pipet ucu ile seçilip, 3 μ L amfisilin içeren 5 ml LB sıvı besiyerine bırakıldı

ve 37 °C’de 200 rpm’de gece boyu sallandı. Ertesi gün plazmit izolasyon kiti ile izole edildi ve izolasyon sonucunda plazmit DNA konsatrasyon değerleri nanodropta ölçüldü. İzole edilen plazmid DNA’larının hedef geni içerip içermediğini belirlemek REN ile teyit edildi.

c. REN (Restriksiyon endonükleaz) Kesim Reaksiyonu

20 µL kesim reaksiyonu için 4 µL plazmid DNA, 1 µL EcoR1 enzimi, 2 µL tampon ve 13 µL nükleaz free su hazırlandı. Bunlar birleştirilip quick yapıldı ve 37 °C’lik etüvde 1 saat bekletildi. Daha sonra enzimlerin aktivasyonunun durdurulması adına ısı blokta 65 °C’de 5 dk bekletildi. Reaksiyon başarısını görmek için 3 µL yürütme boyası eklenerek agaroz jelde yürütüldü. Ardından %1’lik jelde elektroforez yapılarak klonun hedef DNA fragmentlerini içerdiği tespit edildi. Ardından plazmit DNA intergen firmasına gönderildi.

Real-Time PCR ile genom/kopya ölçmek için primer tasarlandı. Bu işlemde *ns1* geni için pUC19 standart oldu. Densovirus *ns1* geninin amplifikasyonu için genel primerler kullanıldı: Forward (F) 5’-TAATGACGACCACTTTTGGG-3’, Reverse (R) 5’-TGGTCCAGTGGTATCGTATC-3’; amplicon boyu 95 bp (bağlanma ıcaklığı İkisi de 56 derece). Viral kopya sayısı, gerçek zamanlı PCR ile standart eğri yöntemi kullanılarak kantitatif olarak belirlendi. Bilinen kopya sayısına sahip pUC19 plasmid standardı seri 10-kat dilüsyonlar halinde kullanılarak $Ct - \log_{10}(\text{kopya})$ doğrusal regresyon eğrisi oluşturuldu ($R^2 \geq 0.99$). Örnek Ct değerleri bu eğriye göre kopya/reaksiyon olarak hesaplandı ve ekstraksiyon ile PCR’de kullanılan hacimler dikkate alınarak orijinal örnek yoğunluğuna dönüştürüldü.



Şekil 3.2. pUC19 vektörü (pUC19 Vector, 2010)

3.9. Densovirusün *T. molitor* Laravları Üzerinde Biyotest Çalışması

Stok virüs dozunun seri seyreltilmesi ile beş farklı doz (4×10^8 , 4×10^7 , 4×10^6 , 4×10^5 ve 4×10^4 kopya/ mL^{-1}) hazırlandı. Her deney için, 30 adet 10. instar orta larva seçildi ve ayrı ayrı plastik kaplara (7,5x5x2,5 cm) yerleştirildi ve burada 16 saat aç bırakıldı. 10 mL saf ham virüs, 100 gram beyaz lahana üzerine püskürtüldü. Kontrol grubundaki larvaların yiyeceklerine, el tipi mini püskürtücü kullanılarak 10 mL dH_2O püskürtüldü. Yiyecekler kuruduktan sonra böcekler kaplara yerleştirildi. Böcekler, iklimlendirme odasında (26°C , 12:12 saat ışık: karanlık, %65 nem) Biyotest kaplarında tutuldu ve ölümler günlük olarak kontrol edildi.

3.10. Formülasyon Hazırlama

Ham virüslerin termostabilitesinin uzun süre farklı sıcaklıklarda korunmasını sağlamak için formülasyon haline getirilmesi gerekmektedir (Eroglu G. B., 2022). Jelatin virüslerin uzun dönemli termal kararlılığı için önemli bir stabilizatördür (Kadji, 2022). Yüksek biyoyoumluluğa sahip olması ve biyolojik olarak parçalanabilirliği nedeniyle viral formülasyon veya aşı üretiminde tercih edilen bir stabilizatördür (Su, 2015). Ayrıca kolay bulunması, ucuz olması, gıdalarla uyumlu olması ve yenilebilmesinin güvenli kabul edilmesi nedeniyle bazı avantajlar sunmaktadır (Topuz, 2018). Bu nedenle TmDNV-TR izolatının formülasyonunda yenilebilen her türlü gıdalarda bulunan, helal yollar ile üretilmiş olan sığır jelatini kullanılmıştır. Prototip

formülasyonun hazırlanması için öncelikle deiyonize su ile %0,5'lik jelatin çözeltisi hazırlandı. Çözelti renksiz ve şeffaf görünene kadar 35°C'lik ısı blokta manyetik karıştırıcı kullanarak karıştırıldı. pH 7'ye ayarlandıktan sonra 0,22 µm'lik bir filtreden geçirilip vortekslenmiştir (Luo, 2021). Üzerine saflaştırılan ham virüs süspansiyonunda en etkili doz olan 4×10^8 kopya/mL⁻¹ eklenmiştir. Tablo 4'de kullanım amaçları ile birlikte belirtilen katkı maddeleri eklenerek hazırlanmıştır. Karışım bir manyetik karıştırıcıda homojenize edilerek, ışık almayacak bir şekilde dışı alüminyum folyo ile sarılmış cam bir şişeye konularak bir sonraki basamakta belirtilen sıcaklıklarda muhafaza edilmiştir.

3.11. Formülasyonun Farklı Sıcaklıklarda Stabilitesinin *in vivo* Şartlarda Değerlendirilmesi

Bu aşamada formülasyonun +4 (buzdolabı sıcaklığı) ve 25°C (depo/oda sıcaklığı) sıcaklıklarda muhafaza edildiğindeki 6 aylık stabilitesi belirlenmiştir. Bunun için hazırlanan formülasyon ikiye bölünerek yarısı 4°C, yarısı da 25°C'de muhafaza edilmiştir. Her iki grup ve kontrol grubu (dH₂O) ürünler taze iken (0. ay), 3 ay ve 6 ay sonra yukarıda belirtilen şekilde larvalara yedirilmiştir. Geçen süre zarfında ham virüsün ve formülasyonun stabilitesini koruyup koruyamadığı elde edilen ölüm oranları hesaplanarak belirlenmiştir.

3.12. İstatistiksel analiz

Kontrol grubundaki ölümler Abbott formülü (Abbott, 1925) kullanılarak düzeltilmiş ve ölüm oranları yüzde (%) olarak ifade edilmiştir. Doz-ölüm verileri, median ölüm dozu (LD₅₀) değerini tahmin etmek amacıyla probit regresyon analizi ile değerlendirilmiştir. Sağkalım analizi Kaplan–Meier yöntemi kullanılarak yapılmış ve gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalar log-rank ki-kare testi ile gerçekleştirilmiştir. Düzeltilmiş ölüm oranları tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile analiz edilmiş ve ortalamalar Fisher'in En Küçük Anlamlı Fark (LSD) testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Tüm istatistiksel analizler SPSS 24 (Santoso, 2017) programı ile yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Böcek Yetiştirme

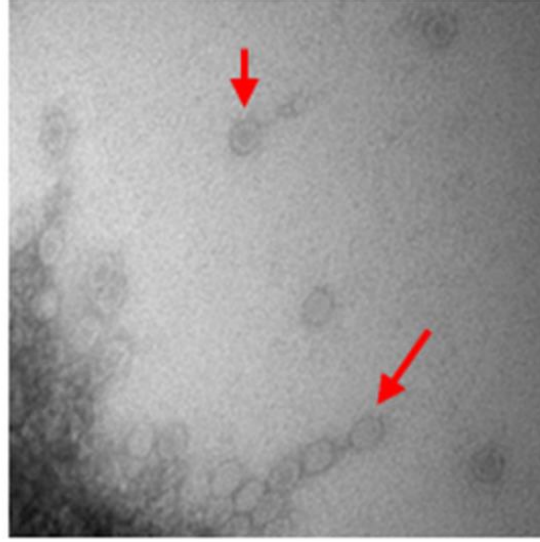
Laboratuvara getirilen larvaların hareketlerinin yavaş olduğu, oldukça hareketsiz oldukları ve birkaç gün sonra öldükleri, vücutlarının oldukça kırılgan hale geldiği gözlemlendi. Ayrıca, aynı yerel evcil hayvan dükkanından çeşitli zamanlarda toplanan farklı aşamalarındaki tüm larvaların başlangıçta yavaş hareket ettiğini ve önemli bir kısmının vücutlarının siyahlaştığını ve birkaç gün sonra öldüğü de gözlemlendi. Bu da virüsün böcekleri yetiştiren ve satan evcil hayvan dükkanının böcek kültüründe nesiller boyunca bulaştığını düşündürmektedir.



Şekil 4.1. *T. molitor* larvaları **a.** Sağlıklı larvalar, **b.** Densovirüs enfeksiyonu sonucunda ölen larvalar

4.2. *T. molitor* Larvalarından Morfolojik Densovirüs Karakterizasyonu

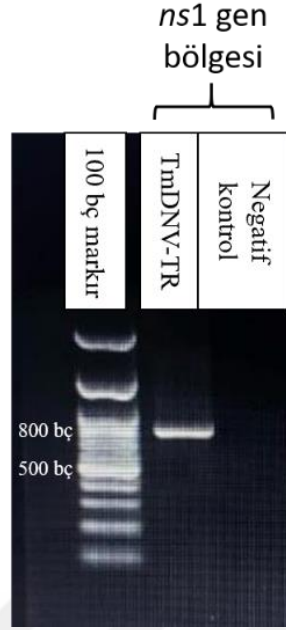
Kadavralardan virüs izolatları saflaştırıldıktan sonra, transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile incelemeleri yapıldı ve bunların dairesel inklüzyon morfolojisine sahip olduğu bulundu. TmDNV-TR izolatının boyutu 200.000x büyüklükte ölçüldü ve ortalaması alındı. TmDNV-TR'nin ortalama boyutu 28,95 nm olarak bulundu.



Şekil 4.2. TmDNV elektron mikroskopisi görüntüsü

4.3. *T. molitor* Larvalarından Viral DNA Ekstraksiyonu ve Kısmi *nsI* Geninin Amplifikasyonu

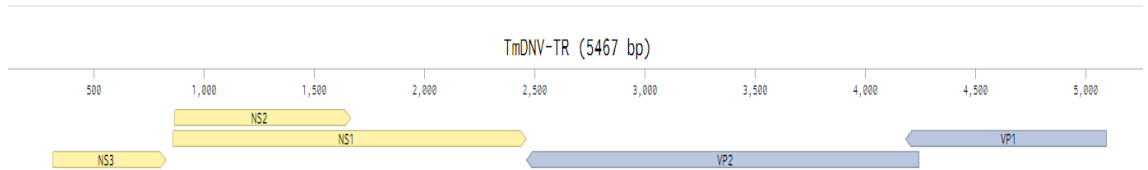
Viral DNA'ların izolasyonundan sonra, saflık ve miktar µdrop cihazı kullanılarak belirlendi. TmDNV-TR DNA'sı 1,967 olarak belirlendi. Miktarı 49,7 ng/µL bulundu. Virüsün moleküler tespiti için, yapısal olmayan *ns1* genine ait bir bölge amplifiye edildi ve beklenen boyutta (819 bp) bir bant elde edildi (Şekil 11). Blast analizi sonucunda, sekans analizi sonucunun NCBI veritabanındaki diğer densoviruslerle eşleştiği ve %99,51 benzerlik gösterdiği tespit edildi. Gen bölgesine ait diziler, PQ241037 (TmDNV-TR) erişim numarası ile veri tabanına girildi.



Şekil 4.3. Viral izolatların kısmi *ns1* gen bölgesinin amplifikasyonu jel görüntüsü

4.4. Tam Genom Analizi

TmDNV-TR için genom dizilemesi gerçekleştirildi. Bu dizileme sonucunda, 5 açık okuma zinciri olduğu ve genom boyutunun 5467 bç olduğu tespit edildi. Üç yapısal olmayan genin (*ns1*, *ns2* ve *ns3*) ileri yönde, iki yapısal genin (*vp1* ve *vp2*) ise geri yönde olduğu tespit edildi ve doğrusal bir genom haritası çizildi (Şekil 11). Tam genom dizisi, PQ325357 (TmDNV-TR) erişim numarası ile veri tabanına kaydedildi.

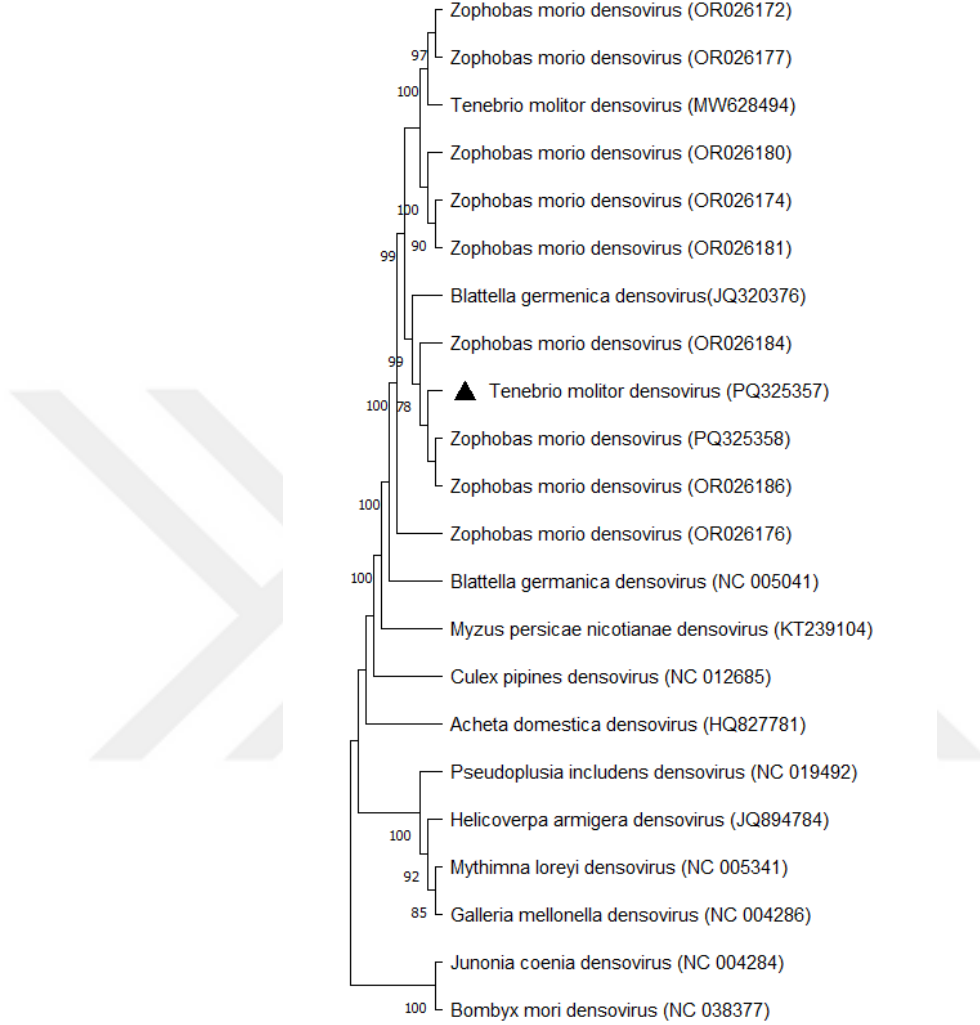


Şekil 4.4. TmDNV-TR izolatının lineer genom haritası (Aş Y, 2025)

4.5. Filogenetik ağaç analizi

TmDNV-TR, diğer Pennsylvania izolatı *Z. morio* densovirusü (OR026184) ve Çin izolatı *Blattella germanica* densovirusü (JQ320376) büyük bir küme oluşturdu. Bu sonucun ilginç yönü, referans genom *T. molitor* densovirusünün (MW628494) Türk izolatı TmDNV-TR'den uzaklaşarak Arkansas izolatı *Z. morio* densovirusleri ile kümelenmiş olmasıdır. Veritabanındaki Çin ve ABD *B. germanica* densovirus

izolatlarının bir araya kümelenmemesi ve bunlardan birinin Türk izolatlarına yakın kümelenmesi de dikkat çekici olmuştur (Şekil 4.5). Bu sonuçları desteklemek için Kimura-2 parametre analizi yapılmıştır.



Şekil 4.5. *T. molitor* densovirüsü ve tüm genom dizisine dayalı olarak yakından ilişkili densovirüslerin maksimum olasılıklı filogenetik ağacı

4.6. Kimura-2 Parametre Analizi

Türk izolatlarından ve diğer böceklerden izole edilen densovirüs genomlarının Kimura 2 parametre analizi sonucunda, TmDNV-TR ile veritabanındaki diğer TmDNV'ler arasındaki genetik uzaklık değeri 0,023 olarak belirlenmiştir. Aynı böcekten izole edilen virüsler arasındaki coğrafi farklılıklar nedeniyle meydana gelebilecek ikame değeri 0,015'ten büyük olduğundan, bu değer izolatlar arasında konakçı spektrumu veya virülans gibi önemli bir fark olduğunu göstermektedir.

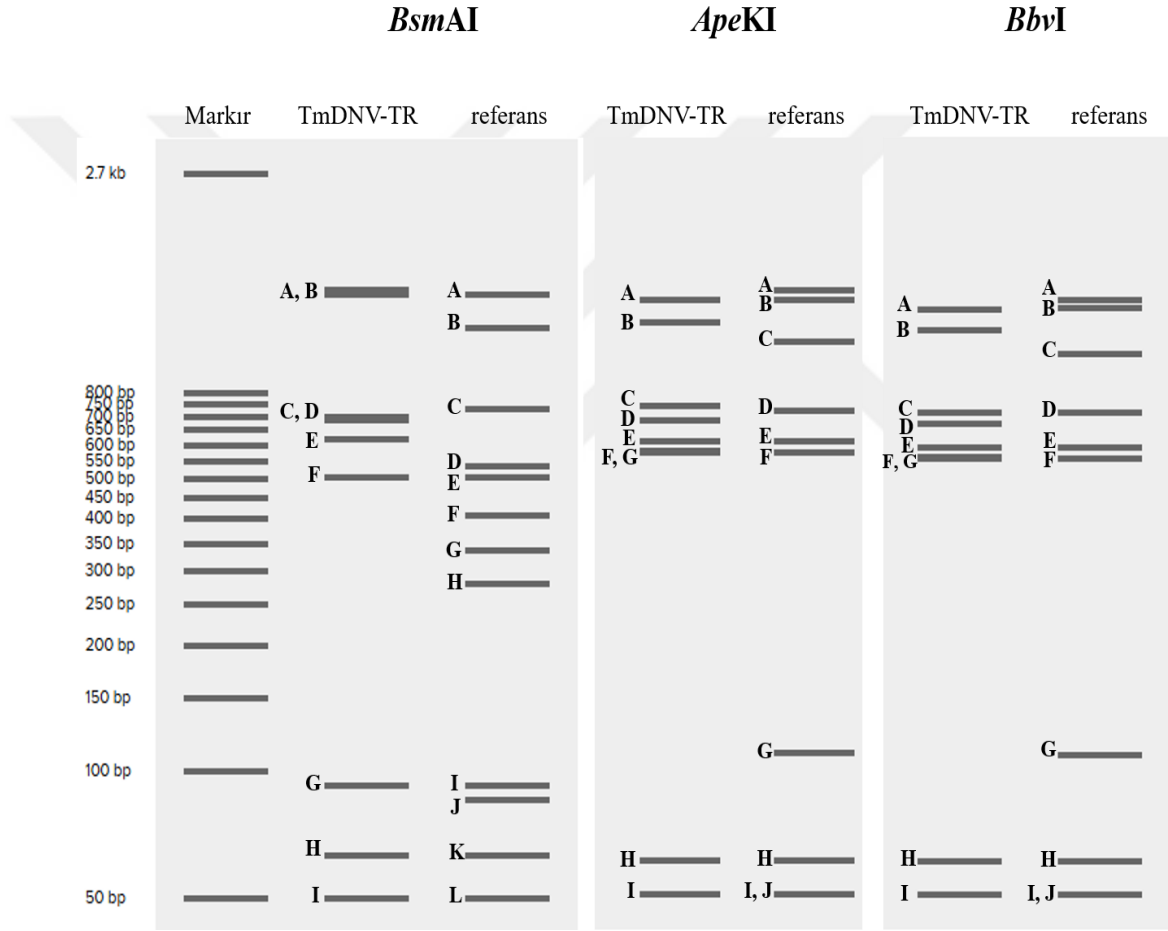
Tablo 4.1. TmDNV-TR ile diğer densovirüs genomlarının Kimura-2 parametre analiz

<i>T. molitor</i> DNV (TmDNV-TR) (PQ325357)																				
<i>T. molitor</i> DNV (MW628494)	0,023																			
<i>Z. morio</i> DNV (ZmDNV-TR) (PQ325358)	0,027	0,024																		
<i>Z. morio</i> DNV (OR026172)	0,022	0,002	0,023																	
<i>Z. morio</i> DNV (OR026176)	0,045	0,040	0,045	0,038																
<i>Z. morio</i> DNV (OR026186)	0,013	0,028	0,012	0,027	0,044															
<i>Z. morio</i> DNV (OR026184)	0,015	0,026	0,014	0,025	0,048	0,015														
<i>Z. morio</i> DNV (OR026174)	0,024	0,014	0,024	0,013	0,040	0,028	0,025													
<i>Z. morio</i> DNV (OR026177)	0,022	0,002	0,023	0,000	0,038	0,027	0,025	0,013												
<i>Z. morio</i> DNV (OR026181)	0,024	0,014	0,024	0,013	0,040	0,028	0,025	0,001	0,013											
<i>Z. morio</i> DNV (OR026180)	0,023	0,014	0,023	0,013	0,039	0,027	0,024	0,001	0,013	0,001										
<i>B. germanica</i> DNV (NC_005041)	0,635	0,636	0,635	0,634	0,632	0,636	0,638	0,637	0,633	0,638	0,636									
<i>B. germanica</i> DNV (JQ320376)	0,015	0,023	0,013	0,022	0,047	0,015	0,015	0,022	0,022	0,022	0,021	0,638								
<i>C. pipiens</i> DNV (NC_012685)	1,160	1,172	1,163	1,172	1,173	1,166	1,172	1,168	1,171	1,168	1,166	1,188	1,171							
<i>H. armigera</i> DNV (JQ894784)	1,170	1,177	1,175	1,172	1,170	1,169	1,180	1,176	1,171	1,175	1,175	1,158	1,179	0,694						
<i>M. loreyi</i> DNV (NC_005341)	1,165	1,164	1,162	1,165	1,162	1,160	1,178	1,166	1,164	1,164	1,165	1,190	1,168	0,684	0,123					
<i>G. mellonella</i> DNV (NC_004286)	1,168	1,161	1,174	1,160	1,167	1,166	1,180	1,172	1,159	1,173	1,173	1,202	1,173	0,682	0,168	0,106				
<i>P. includens</i> DNV (NC_019492)	1,173	1,168	1,177	1,166	1,165	1,174	1,189	1,171	1,168	1,169	1,170	1,224	1,182	0,708	0,198	0,180	0,196			
<i>A. domestica</i> DNV (HQ827781)	1,418	1,421	1,417	1,413	1,425	1,429	1,415	1,396	1,408	1,401	1,398	1,483	1,421	1,087	1,004	0,989	0,979	1,009		
<i>M. persicae</i> DNV (KT239104)	1,509	1,503	1,510	1,505	1,486	1,513	1,522	1,506	1,511	1,505	1,510	1,465	1,506	1,420	1,323	1,291	1,329	1,340	1,656	
<i>B. mori</i> DNV (NC_038377)	1,675	1,677	1,687	1,667	1,686	1,669	1,692	1,668	1,663	1,667	1,671	1,783	1,687	1,447	1,344	1,329	1,320	1,396	1,770	1,880
<i>J. coenia</i> DNV (NC_004284)	1,743	1,703	1,742	1,697	1,703	1,718	1,725	1,702	1,697	1,702	1,704	1,679	1,729	1,389	1,127	1,128	1,138	1,164	1,791	1,879

4.7. Aminoasit Polimorfizmi ve Restriksiyon Endonükleaz Profilleri

TmDNV-TR ve referans genom izolatları arasındaki farkları belirlemek için, tüm ORF'lerdeki aminoasit varyasyonu ayrı ayrı incelenmiştir. Analiz sonucunda, tüm gen bölgelerinde aminoasit varyasyonları olduğu tespit edilmiştir (tablo 5).

İki genomun kısıtlama endonükleaz profilleri de *BsmAI*, *ApeKI* ve *BbvI* enzimleri kullanılarak *in silico* olarak karşılaştırılmıştır. Üç enzim için de referans genomda TmDNV-TR'ye kıyasla fazla bant olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.6. *In silico* kısıtlama endonükleaz profili (Benchling programı ile yapılmıştır)

Tablo 2.2. *BsmAI*, *ApeKI* ve *BbvI* enzimlerine göre TmDNV-TR ve referans genomun (TmDNV) kısıtlama endonükleaz profili

Fragment	<i>BsmAI</i>		<i>ApeKI</i>		<i>BbvI</i>	
	TmDNV-TR	Referans genom (TmDNV)	TmDNV-TR	Referans genom (TmDNV)	TmDNV-TR	Referans genom (TmDNV)
A	1399	1372	1251	1326	1238	1313
B	1372	1136	1112	1258	1112	1258
C	697	734	705	1001	705	976
D	688	534	653	690	666	703
E	620	501	582	582	582	582
F	501	408	553	548	553	548
G	93	338	548	108	548	108
H	63	280	60	60	60	60
I	34	93	3	3	3	28
J		86		3		3
K		63				
L		34				
Toplam	5467 kb	5579 kb	5467 kb	5579 kb	5467 kb	5579 kb

Tablo 4.3. TmDNV-TR ve referans genomun (TmDNV) amino asit değişikliklerine neden olan varyasyon bölgeleri

Gene	Amino asid bç	TmDNV-TR	Referans genom (TmDNV)	Yüzde
<i>ns3</i>	48	R	L	%97.65
	55	S	P	
	95	E	G	
	160	I	M	
<i>ns2</i>	42	S	N	%98.49
	73	T	I	
	110	S	L	
	122	I	M	

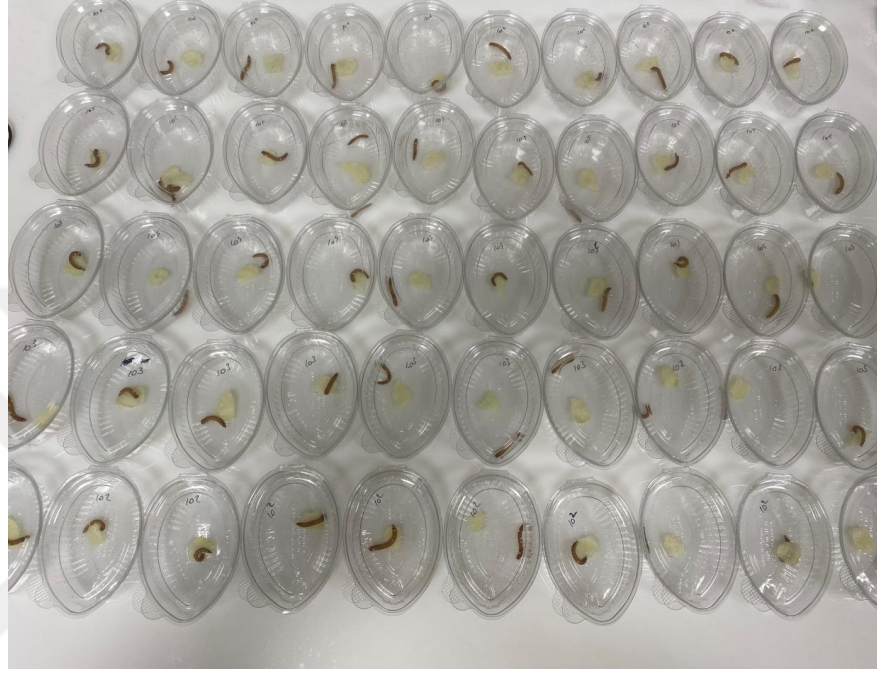
Tablo 4.3. (devamı) TmDNV-TR ve referans genomun (TmDNV) amino asit değişikliklerine neden olan varyasyon bölgeleri

ns1	125	I	V	%97
	137	S	A	
	212	V	I	
	229	N	H	
	230	N	H	
	244	G	S	
	294	P	R	
	325	V	I	
	332	S	N	
	341	N	S	
	342	V	I	
	361	K	R	
	385	N	S	
	414	I	L	
vp2	13	D	E	%97.81
	51	L	V	
	93	N	D	
	108	P	S	
	130	G	N	
	132	G	S	
	166	T	A	
	250	I	V	
	335	A	P	
	417	N	S	
	438	A	V	
	448	A	P	
	464	H	N	
vp1	33	S	T	%98.35
	162	K	N	
	247	A	T	
	284	G	R	
	297	I	S	

4.8. Densovirüs Doz belirleme

Materyal-Metot kısmında anlatılan yöntemlerin sonucunda saflaştırdığımız TmDNV-TR izolatının konsantrasyonu 4×10^8 kopya/ mL⁻¹ olarak bulunmuştur.

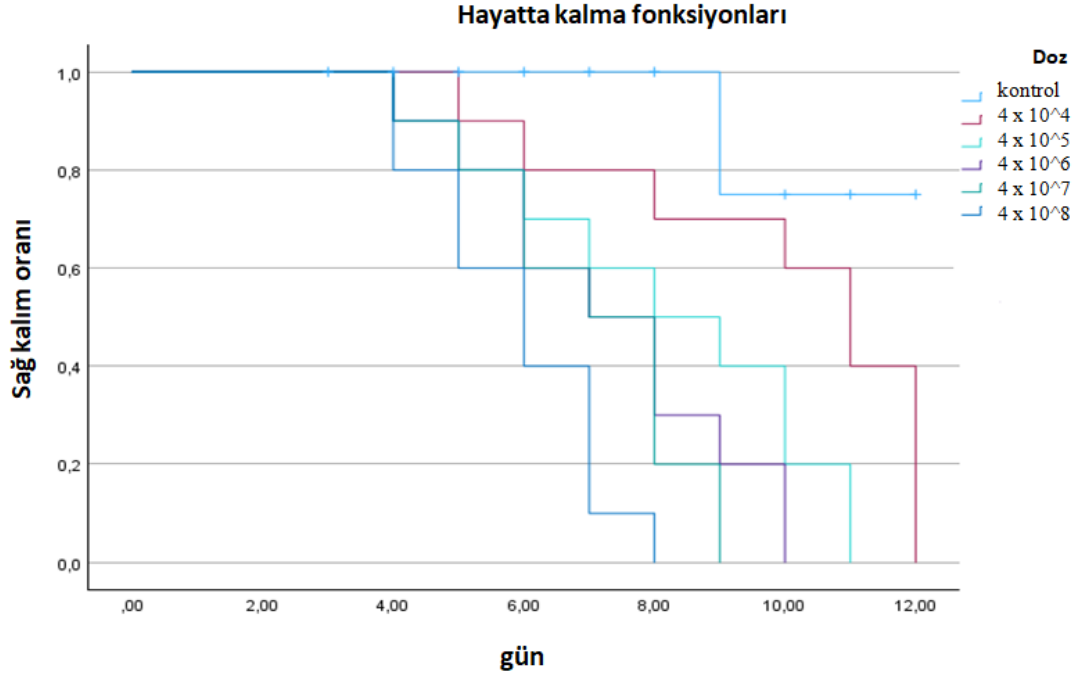
4.9. Densovirüsün *T. molitor* Larvaları Üzerinde Biyotest Çalışması



Şekil 4.7. Larvaların biyotest çalışma görüntüsü

4.9.1. Ham Virüsün Doz-Yanıt Testi

Ham virüs doz-yanıtının bir sonucu olarak, larvalar densovirüs semptomları göstermiştir (vücutları siyahlaştı) (Şekil 15). Laboratuvarında, Kaplan-Meier sağ kalım grafiğinde gösterildiği gibi, beş doz ham TmDNV, *T. molitor* larvaları için patojenik olmuş ve bu eğriler düşük ve birbirinden minimum düzeyde farklı olarak bulunmuştur ($X^2= 33,37$, log-rank, $df=5$, $p<0,001$) (Şekil 18). İstatistiksel veri analizi, 8. günün sonunda LD₅₀: $1,091 \times 10^5$ kopya/mL⁻¹, LT₅₀: 5 gün, LD₉₅: $8,94 \times 10^7$ kopya/mL⁻¹ ve LT₉₅: 7 gün olduğunu ortaya koymuştur (tablo 6).



Şekil 4.8. 8. günün sonunda, ham densovirusün (TmDNV-TR) beş farklı dozuna ($4 \times 10^4 - 4 \times 10^8$ kopya/ mL^{-1}) maruz bırakılan 10. evre *Tenebrio molitor* larvalarına ait Kaplan–Meier sağ kalım grafiği

Tablo 4.4. *Tenebrio molitor* larvaları üzerinde TmDNV-TR izolatının bulaşıcılığı için probit analizi ile tahmin edilen doz-ölüm oranı

Virüs izolatı	LD ₅₀ (kopya/ mL^{-1}) (%95 FL)	LT ₅₀ (gün)	LD ₉₅ (kopya/ mL^{-1}) (%95 FL)	LT ₉₅ (gün)	Eğim $\pm$ SE	χ^2	P değeri
TmDNV-TR	1.091×10^5 ($1.2 \times 10^4 - 1.0 \times 10^6$)	5 gün	8.94×10^7 ($2.7 \times 10^6 - 2.9 \times 10^8$)	7 gün	0.565 ± 0.05 54	4.16	<0.05



Şekil 4.9. Biyotest çalışmasında ölen larvalar

4.10. Formülasyon Hazırlama

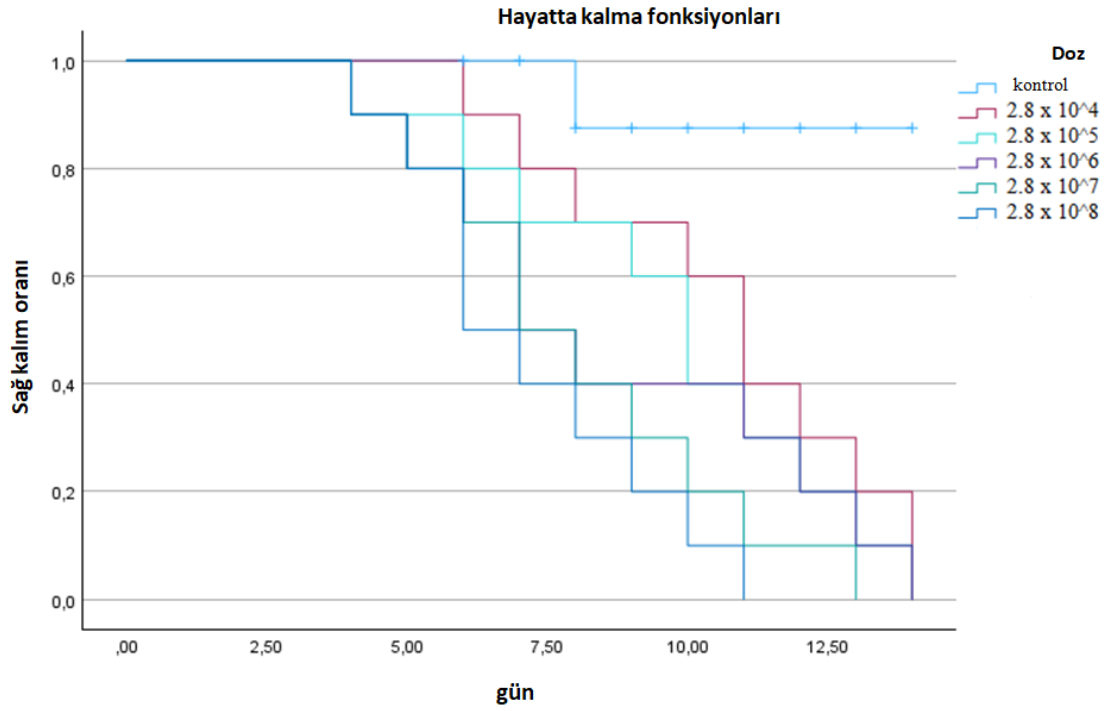
Formülasyon içinde seyrelen virüsün son konsantrasyonu $2,8 \times 10^8$ kopya/mL⁻¹ 'dir.

Tablo 4.5. Formülasyon içeriği

Kullanım amacı	İçerik	Miktar
Öldürücülük	Saf densovirus (TmDNV-TR)	%70
Termostabilite	Sığır jelatini	%0,5
Sümfaktan	Tween-80	%2
Beslenme uyarıcı	Gliserin	%6
Tatlandırıcı	Sorbitol	%1
Hacim tamamlayıcı	dH ₂ O	%20

4.11. Formülasyonun Doz Yanıt Testi

Laboratuvarı, Kaplan-Meier sağ kalım grafiğinde gösterildiği gibi, beş doz formülasyon *T. molitor* larvaları için patojenik olmuştur ve bu eğriler düşük ve birbirinden minimum düzeyde farklı bulunmuştur ($X^2= 22,038$, log-rank, $df=5$, $p<0,001$) (Şekil 4.10). LD₅₀, LT₅₀, LD₉₅, LT₉₅, eğim ve p değerleri 9. günün sonunda Tablo 4.6'da gösterilmektedir.

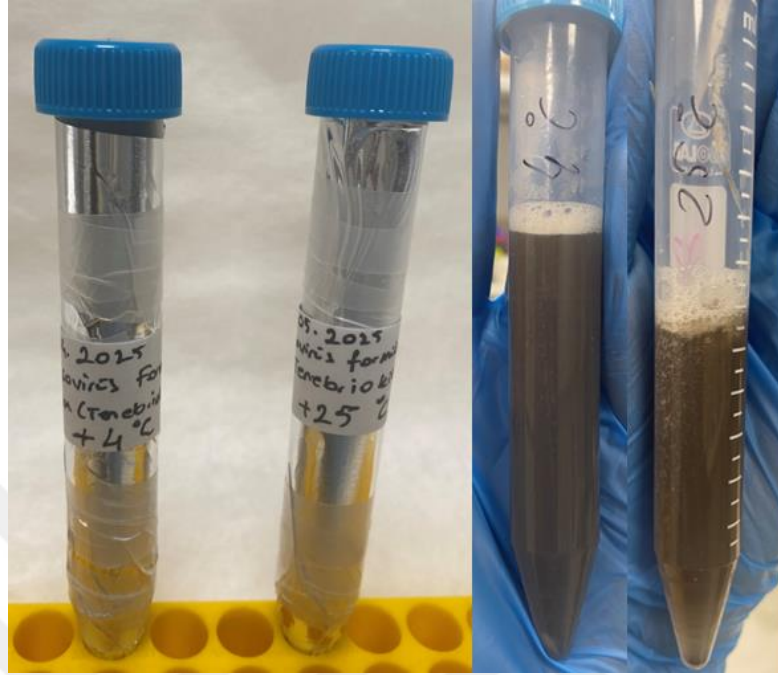


Şekil 4.10. 9. günün sonunda, formülasyonun beş farklı dozuna ($2.8 \times 10^4 - 2.8 \times 10^8$ kopya/mL⁻¹) maruz bırakılan 10. evre *Tenebrio molitor* larvalarına ait Kaplan–Meier sağ kalım grafiği

Tablo 4.6. *Tenebrio molitor* larvaları üzerinde formülasyonun bulaşıcılığı için probit analizi ile tahmin edilen doz-ölüm oranı

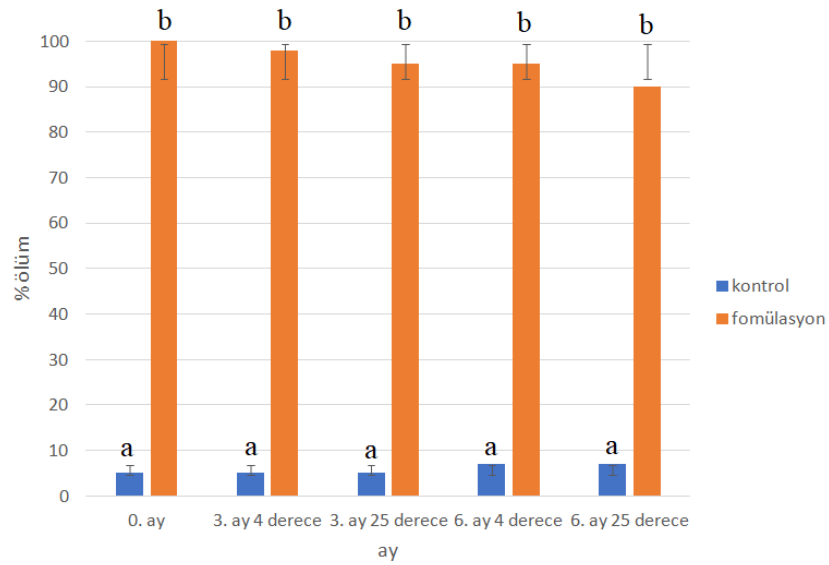
Formülasyon	LD ₅₀ (kopya/ mL ⁻¹) (FL %95)	LT ₅₀ (gün)	LD ₉₅ (kopya/ mL ⁻¹) (FL %95)	LT ₉₅ (gün)	Eğim ± SE	X ²	P Değer
Tenebriokiller	1.14 x10 ⁵ (4.06 x 10 ⁴ - 0.08 x 10 ⁶)	6 gün	1.33 x10 ⁸ (3.98 x 10 ⁷ - 3.26 x 10 ⁸)	9 gün	0.536±0.053	4.06	< 0.05

4.12. Formülasyonun Farklı Sıcaklıklarda Stabilitésinin *in vivo* Şartlarda Değerlendirilmesi



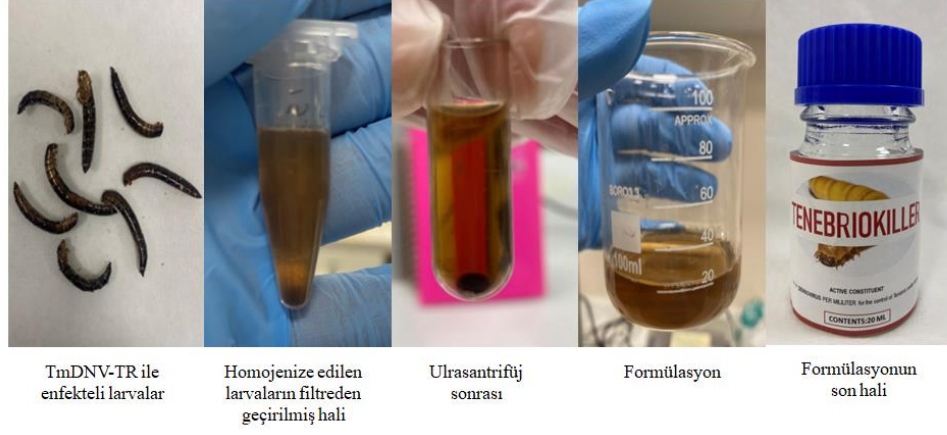
Şekil 4.11. Formülasyonun stabilite testi öncesi iki falkona ayrılmış görüntüsü

14. günün sonunda taze formülasyonun (0 ay) ölüm oranı %100 iken, 4°C'de 3 ve 6 ayın sonunda ölüm oranı %100, 25°C'de ise 3 ve 6 ayın sonunda ölüm oranı sırasıyla %98 ve %95'tir (Şekil 20).



Şekil 4.12. Formülasyonun stabilite testi. Uygulamadan sonraki 10. gün sonunda 10. evre *Tenebrio molitor* larvalarında gözlenen ölüm oranları

Formülasyonun stabilitesi açısından LSD çoklu karşılaştırma testine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmemiştir ($p = 0.960 - 0.987$, $p > 0.05$) (Şekil 20).



Şekil 4.13. Densovirusün izolasyonu ve formülasyon aşamaları

5. TARTIŞMA

Dünya nüfusunun artmasıyla birlikte, gıda üretimi ve korunması da çok önemli hale gelmiştir (Pöllinger-Zierler, 2023). Depo zararlıları, insanlar tarafından sıklıkla tüketilen unlu gıdalarda (makarna, pirinç, un, nişasta) hızla çoğalır ve ev/depodaki tüm ürünlere yayılabilir (Kavallieratos, 2019). Güçlü çeneleri sayesinde paketlenmiş gıdaları kırarak ekonomik kayıplara neden olurlar. Ayrıca, böcek dışkıları, larva ve pupa derileri ile pupa kalıntıları ürünlerin kirlenmesine neden olur (Sousa, 2017).

Densovirus ilk olarak 1969 yılında elektron mikroskobu ile *T. molitor*'da tanımlanmıştır (Huger, 1969). *T. molitor* larvalarını kabuklu bir hayvan olan *Penaeus merguensis*'in densovirusü ile enfekte etmiş ve larvaların %20'sinin bu virüsü çoğalttığını bildirmiştir. Böcek modellerinin kabukluların viral hastalıkları için yararlı olabileceğini bildirmişlerdir (Szelei, 2011). *T. molitor* larvalarını incelerken yağ dokusu gibi çeşitli dokularda renk değişikliği ve sitopatik değişiklikler gözlemlemiştir. Ayrıca, *T. molitor*'un yetiştirildiği bölgede densovirus ile enfekte *Acheta domesticus*'un varlığı, böcek türleri arasında densovirusün yatay bulaşma olasılığını düşündürmektedir.

T. molitor'dan izole edilen densoviruslerin ayrıntılı çalışmaları dünya çapında hala çok yenidir. *T. molitor* densovirusünün tam genomu geçen yıl yapılan bir çalışmada ilk kez yayınlanmıştır. Ayrıca tam genom analizi gerçekleştirmişler ve genom boyutunun 5579 bp olduğunu bildirmişlerdir (Armién, 2023).

Bu tez çalışmasında, Türkiye'de ilk kez densovirus izole edilmiştir. İzole edilen virüsün (TmDNV-TR) genom boyutu 28,95 nm olarak bulunmuştur. Densoviruslerin boyutu 18 nm ile 28 nm arasında değişir (Cotmore, 2019). Sinnuengnong ve ark. *Penaeus stylirostris*'ten izole ettikleri densovirusün (PstDNV) boyutunun 20 nm olduğunu bildirmişlerdir, bu da literatürdeki diğer PstDNV izolatlarıyla tutarlıdır (Hou, 2009).

İki DNA virüsü, yani densovirus ve iridovirus (Huger, 1969); (Kelly, 1979); (Black, 1981); (Armién, 2023); (Aş Y, 2025) ve beş RNA virüsü *T. molitor*'da tanımlanmıştır (Hernandez-Pelegri ve ark., 2025). RNA virüslerinin böcek ölüm oranları üzerindeki etkileri literatürde değerlendirilmemiştir. Ancak, iki DNA virüsünün ölüm oranları üzerindeki etkilerinin analizleri önemli farklılıklar ortaya koymuştur. Bu farklılıklardan ilki, Densoviruslerin hızlı oral bulaşıcılık özelliğine sahip olduğu

bilinirken (Kittayapong P. B., 2001), iridovirüslerin oral bulaşıcılık özelliğinin oldukça düşük olmasıdır. Bu nedenle, iridovirüsler böceklerle enjeksiyon yoluyla uygulanır (Williams T. B.-S., 2005). İridovirüsler, akrep zehiri geni eklenerek oral bulaşıcılıklarını artırmak için rekombine edilebilir (Ozgen, 2014), ancak birçok ülkede biyopestisit olarak rekombinant ürünlerin kullanımı yasak olduğundan, bu çalışmalar laboratuvar ölçeğinde saf bilim olarak kalmaktadır. İridovirüsler ile densovirusler arasındaki bir diğer fark, densoviruslerin zarfsız, iridovirüslerin ise zarflı olmasıdır.

Zarflı virüslere kıyasla zarfsız virüslerin daha yüksek termal stabilitesi, formüle edilmiş virüslerin raf ömrü ve depolanması açısından önemlidir (Kadji, 2022). Densoviruslerin, konakçı böceklerin ölümünden sonra 18 aydan fazla bir süre boyunca aktif olarak bulaşıcı olduğu bildirilmiştir (Tokarev Y. M., 2020). Bu nedenle densovirusler ideal bir biyolojik mücadele ajanı olarak kabul edilebilir. Diğer bir fark ise, virüsleri *in vitro* olarak üretme yeteneğidir. Densoviruslerin genomu (4-6 kb) (Cotmore SF A.-M. M.-H., ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: Parvoviridae, 2019) iridovirüslerin genomuna (212 kb) (Jakob, 2001) kıyasla oldukça küçük olduğundan, bakteriyel vektör kullanılarak *in vitro* olarak çok hızlı ve büyük miktarlarda üretilebilirler (Guo, 2000). Ancak, iridovirüslerin *in vitro* üretimi, böcek hücre kültürüne bağlıdır (Gencer, 2020), bu da büyük ölçekli üretimin maliyetini önemli ölçüde artırır.

Ham virüslerin farklı sıcaklıklarda zaman içinde termal stabilitesini korumak için, bunların formüle edilmesi gerekir (Eroglu G. B., 2022). Jelatin, virüslerin uzun vadeli termal stabilitesi için önemli bir stabilizatördür (Kadji, 2022). Yüksek biyoyumumluluğu ve biyolojik olarak parçalanabilirliği nedeniyle virüs formülasyonunda veya aşı üretiminde tercih edilen bir stabilizatördür (Su, 2015). Ayrıca, bulunması kolay, ucuz, gıda ile uyumlu ve beslenmede güvenli kabul edilmesi gibi bazı avantajlar da sunar (Topuz, 2018). Bu nedenle, tüm yenilebilir gıdalarda bulunan sığır jelatini, TmDNV-TR izolatının formülasyonunda kullanılmıştır. Formülasyona stabiliteyi korumak için %0,5 sığır jelatini eklenmesinin nedeni, bu miktarın literatürdeki diğer virüs çalışmalarında optimal olmasıdır (Kadji, 2022). Bunun nedeni, daha fazla jelatin eklenmesinin sıvı formülasyonun katılaşmasına neden olmasıdır. Yüzey aktif maddeler, yüzey gerilimini azaltan maddelerdir. Formülasyonun uygulandığı alana yayılmasına yardımcı olmak için gereklidirler. Bu formülasyonda, %2 Tween-80 tercih edilen yüzey aktif maddeydi. Literatürde, viral formülasyonlara genellikle %5'e kadar Tween-80

eklenir (Burges, 1998) (Bayramoglu, 2023). Gliserol genellikle viral formülasyonlarda beslenme uyarıcısı olarak kullanılır. Mevcut literatürde, viral formülasyonlara eklenen gliserol miktarının %2 ile %10 arasında olduğu gözlemlenmiştir (Eroglu G. B., 2022). Bu nedenle, bu çalışmada literatürde bildirilen değerler arasında bir değer tercih edilmiş ve %6 gliserol ilave edilmiştir. Formülasyonu böcekler için çekici hale getirmek amacıyla tatlandırıcı olarak %1 sorbitol kullanılmıştır. Benzer şekilde, literatürdeki viral formülasyonlara da aynı miktarda sorbitol ilave edilmiştir (Bayramoglu, 2023).

Laboratuvara getirilen birçok larvanın kendiliğinden ölmesi, virüsün patojenitesinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, densovirüs izolatlarının depolama zararlılarının biyolojik mücadelesinde önemli bir yerel viral patojen kaynağı olması beklenmektedir. Tez çalışmasında, aynı yerel evcil hayvan dükkanından çeşitli zamanlarda toplanan farklı aşamalarındaki tüm larvaların başlangıçta yavaş hareket ettiğini ve önemli bir kısmının birkaç gün sonra vücutlarının siyahlaştığı ve öldüğü gözlemlenmiştir, bu da virüsün böcekleri yetiştiren ve satan evcil hayvan dükkanının böcek kültüründe nesiller boyunca bulaştığını düşündürmektedir. Bu çalışma, *in vivo* veya *in vitro* olarak densovirüslerin büyük ölçekli üretimi ve formülasyonu üzerine çalışmaların önünü açmaktadır.

Hazırladığımız böcek ilacı, endüstriyel sektörde çok etkili olacak bir etki spektrumuna sahiptir. Bunun nedeni, depolarda saklanan makarna, arpa ve buğdayın *T. molitor* tarafından ciddi şekilde zarar görmesidir. Bu böcek, ürünlerin dış ambalajına zarar verdiği ve ürünün içeriğinde kalıntılar bıraktığı için büyük ürün kaybı yaşanmaktadır. Bu kayıp, bize finansal, iş gücü ve hammadde kayıplarına neden olmaktadır. Ayrıca, bu böcek tarafından kontamine olmuş ürünlerin satışı, insan sağlığı üzerinde birçok olumsuz etkiye sahiptir (Stoops J. C., 2016). Nitekim, son zamanlarda yapılan birçok çalışma, *T. molitor* larvalarının çeşitli insan patojenik bakteriler (*Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Erwinia* spp., *Pantoea* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. ve *Clostridium* spp. (Stoops J. C., 2016) (Garofalo, 2019) (Pöllinger-Zierler, *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758): Microbiological screening of feed for a safe food choice, 2023). Bu durum, depolanan ürünlerin hijyeninin bozulmasına yol açar ve bunları tüketenlerin sağlığını tehlikeye atar. Şu anda prototip olarak geliştirmekte olduğumuz bu ürün büyük ölçekte üretilirse, bu böcek ilacı püskürtülen depolarda bu böcek kontrol altına alınacak ve yukarıda

bahsedilen kayıplar  nlenecek, endüstriyel üretim fabrikalarında birçok kayıp  nlenecek ve ülkemiz ekonomisi ve sağlığı açısından önemli bir adım atılmış olacaktır.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuçlar

Günümüz dünyasında, mahsul baskısı ve pestisitlerin dikkatsiz kullanımı ekosistemlerin sürdürülebilirliğini tehdit ederken, yenilikçi biyolojik alternatiflerin keşfi acil bir ihtiyaç haline gelmiştir. Parvoviridae familyasına ait densovirusler, zararlı böceklerle mücadelede benzersiz etki mekanizmaları ve olumlu çevre profilleriyle umut verici bir çözüm olarak öne çıkmaktadır. Bu viruslerin biyolojik mücadelede kullanılması, zararlı popülasyonlarının seçici olarak hedef alınmasını sağlamakla kalmaz, aynı zamanda kimyasallara daha az bağımlı ve daha sürdürülebilir bir mücadele yöntemi sunarak biyolojik çeşitliliğin korunmasına da katkıda bulunur. Densoviruslerin DNA virusleri olması ve DNA onarım mekanizmasına sahip olması, viruslerin konakçı spesifikliğini değiştirecek mutasyonlara uğramasını önler (Parry, 2019). Bu özellik, kullanım kolaylığı sağlar ve ekosistem üzerinde herhangi bir olumsuz etkiyi önler. Ayrıca, tüm densoviruslerin konakçı spektrumu çok dardır, bu da onları biyolojik mücadelede güvenli hale getirir. Densoviruslerin omurgasızlara özgü olması, oral enfeksiyonla çoğalabilmesi, stabil olması ve konakçada belirgin morfolojik semptomlar göstermesi gibi birçok avantajı vardır (Pigeyre, 2019). Tüm bu nedenlerle, densoviruslerin biyolojik kontrol ajanları olarak kullanımı mevcut literatürdeki birçok çalışmada yer almaktadır ve gelecekte etkili bir biyolojik ajan olarak kullanımı öngörülmektedir.

Bu tez çalışmasında başarıyla sonuçlanan prototip formülasyon, büyük ölçekli hale getirilirse üretim sektörü başta olmak üzere birçok sektör için ülkemizin sanayi alanında mevcut durumu iyileşebilir ve hem insan sağlığı hem de çevremiz açısından daha iyi sonuçlar doğurabilir.

Aynı zamanda bu tez çalışması, Türkiye'nin 12. Kalkınma Planı 497.3. sayılı maddesine destek sağlamaktadır. Bu formülasyonun patent başvurusu yapılmış olup, ruhsatlandırılıp patentinin alınması durumunda, depo zararlıları ile biyolojik mücadele kapsamında kullanılmak üzere kimyasal ilaçlara alternatif yerli, etkili, insana ve doğaya herhangi bir zararı olmayan yeni bir ilaç piyasaya sürülmesi öngörülmektedir.

Öneriler

1. Bu tez çalışmasında hazırlanan, *T. molitor* zararlısının mücadelesinde kullanılmak üzere densovirus tabanlı prototip formülasyon, büyük ölçekli halinin hazırlanmasına öncü bir çalışma olmuştur.

2. Büyük ölçekli bir formülasyonun hazırlanması halinde; tez çalışmasındaki laboratuvar biyotestlerinin yanı sıra depo uygulaması ile saha çalışmaları yapılabilmesi, üretilen bu ürünün uygun pazar ve seri üretimine imkan tanıyabileceği düşünülmüştür.

3. Tez çalışmasında hazırlanan bu formülasyon makarna, buğday gibi ürünlerin paketlerine sıkılarak formülasyonun farklı ortamda öldürücülük değerlendirilmesi yapılabilir.

4. Bu çalışmanın daha önemli zararlılara karşı (*Tribolium* spp., *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus* spp, *Oryzaephilus* spp. vb) benzer nitelikli biyoinsektisitlerin geliştirilmesine ışık tutabileceği değerlendirilmiştir.

5. Bu çalışma bir yüksek lisans tezi olduğundan dolayı formülasyon stabilite testleri 6 ay yapılmıştır. Bu süre 2 sene olarak uzatılabilir.

6. Biokiller adlı Çin’de üretilen *T. molitor* zararlısının mücadelesinde kullanılan ürün ile bu tez çalışmasındaki ürün raf ömrü, stabilite deneyleri ve öldürücülük olarak karşılaştırılabilir ve Tenebriokiller adlı formülasyon Biokiller ile pozitif kontrol olarak kıyaslanabilir.

KAYNAKÇA

- Afanasiev, B. &. (2000). Densovirinae as gene transfer vehicles. *Contributions to microbiology*, 33-58.
- Ahmad, R. H. (2021). Stored grain pests and current advances for their management.
- Armién, A. G. (2023). Outbreak of densovirus with high mortality in a commercial mealworm (*Tenebrio molitor*) farm: a molecular, bright-field, and electron microscopic characterization. *Veterinary pathology* (s. 60(5), 689-703.). içinde
- Aş Y, S. Z. (2025). Two novel densoviruses from storage pests insects (*Zophobas morio* and *Tenebrio molitor*) in Türkiye: Genomic and ultrastructural comparison. *Journal of Stored Products Research*, 111;102549.
- Aş. Y, E. G. (2025). Densovirinae: An Eco-Friendly Alternative in Biological Control. *Eurasian Journal of Molecular and Biochemical Sciences*, 45-55.
- BA, F. (1985). Viral pathogens of mosquito larvae. *Bull Am Mosq Control Assoc.*, 6;62–74.
- Balcı, H. &. (2020). Bitki koruma ürünü olarak biyopestisitler: tanımları, sınıflandırılmaları, mevzuat ve pazarları üzerine bir değerlendirme. . *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi* 11(2), 261-274.
- Batool K, X. J. (2022). Densovirus oil suspension significantly improves the efficacy and duration of larvicidal activity against *Aedes albopictus*. *Viruses*, 14(3);475.
- Bayramoglu, Z. G. (2023). Development of novel betabaculovirus (HycuGV-Hc1) as a biopesticide (HycuGV-TR61) and its efficacy on the fall webworm, *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Erebidæ) larvae. *Egyptian Journal of Biological Pest Contro*, 33(1), 21.
- Becnel, J. J. (2007). Mosquito pathogenic viruses—the last 20 years. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 36-49.
- Black, P. N. (1981). Biochemistry and ultrastructure of iridescent virus type 29. *Journal of Invertebrate Pathology*, 38(1), 12-21.
- Burges, H. D. (1998). Formulation of bacteria, viruses and protozoa to control insects. *Dordrecht: Springer Netherlands*. (s. 33-127). içinde
- Caparros Megido, R. S. (2014). Edible insects acceptance by Belgian consumers: promising attitude for entomophagy development. *Journal of Sensory Studies*, 14-20.

- Cotmore SF, A.-M. M.-H. (2019). ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: Parvoviridae. *Journal of General Virology*, 100(3);367-368.
- Cotmore SF, A.-M. M.-H. (2019). ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: Parvoviridae. *Journal of General Virology*, 67-368 .
- Cotmore SF, T. P. (2007). Parvoviral host range and cell entry mechanisms. *Advances in virus research*, 183-232.
- Cotmore SF, T. P. (2014). Parvoviruses: small does not mean simple. *Annual review of virology*, 1(1);517-537.
- Cotmore, S. F.-M.-H. (2019). ICTV Report Consortium. *Journal of General Virology*, 367-368.
- Çanakçı, S. &. (2019). Türkiyede depolanmış ürün zararlıları ve mücadele yöntemleri. *Tarım Bilimleri Dergisi* , 145152.
- De Beeck AO, C.-F. P. (1997). Viruses and the cell cycle. *Progress in cell cycle research*, 1-19.
- Demis, E. S. (2022). Review on major storage insect pests of cereals and pulses. *Asian Journal of Advances in Research*, 5(1), 41-56.
- Deshwal, R. V. (2020). Stored grain insect pests and their management: An overview. *J Entomol Zool Stud*, 8(5), 969-974.
- Eberle KE, W. J. (2012). Basic techniques in insect virology. In: Lacey, L.A. (ed.) *Manual of techniques in invertebrate pathology*, 2nd edition. Academic Press, San Diego, CA, USA., 15-74.
- El-Far M, L. Y.-E. (2004). Lack of infection of vertebrate cells by the densovirus from the maize worm *Mythimna loreyi* (MIDNV). *Virus research*, 99(1); 17-24.
- El-Far M, L. Y.-E. (2004). Lack of infection of vertebrate cells by the densovirus from the maize worm *Mythimna loreyi* (MIDNV). *Virus research*, 99(1); 17-24.
- El-Far M, S. J. (2012). Organization of the ambisense genome of the *Helicoverpa armigera* densovirus. *J Virol*, 86.
- Eroglu, G. (2022). Phylogeographic relationship of honey bee dicistroviruses. *Bee World*, 99 (3), 99–102.
- Eroglu, G. B. (2022). n environmentally safe and tolerant microbial insecticide utilizing *Helicoverpa armigera* single nucleopolyhedrovirus (HearNPV-TR). . *Egyptian Journal of Biological Pest Control*., 32(1), 53.
- Eroglu, G. B. (2022). Pest insects and their biological control. In *Cotton*.

- Freye, H. B. (1996). Anaphylaxis to the Ingestion and Inhalation of *Tenebrio Molitor* (Mealworm) and *Zophobas Morio* (Superworm). In *Allergy and Asthma Proceedings* , 215.
- Garofalo, C. M. (2019). Current knowledge on the microbiota of edible insects intended for human consumption: A state-of-the-art review.
- Gencer, D. Y. (2020). Insecticidal activities of wild type and recombinant invertebrate iridescent viruses on five common pests. *Turkish Journal of Entomology*, 44(3), 365-373.
- Grenet ASG, S. F. (2015). Les densovirus: une massive attaque chez les arthropodes. *Virologie*, 19(1);19-31.
- Guo, H. Z. (2000). Complete nucleotide sequence and genomic organization of *Periplaneta fuliginosa* densovirus. *Chinese Science Bulletin*, 45(19), 1782-1786.
- Hagstrum, D. W. (2009). A review of stored-product entomology information sources. *American Entomologist*, 174-183.
- Harish S, M. M. (2021). Elango K. Entomopathogenic viruses. *Microbial approaches for insect pest management*, 1-57.
- Harish, S. M. (2022). Entomopathogenic viruses. In *Microbial approaches for insect pest management* , 1-57.
- Hou, L. W. (2009). Expression and self-assembly of virus-like particles of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in *Escherichia coli*. *Archives of virology*, 154(4), 547-553.
- Huger, A. M. (1969). Virose bei Larven des Mehlkäfers: *Tenebrio molitor*. *Naturwissenschaften*, 56(9), 466-467.
- iStock. (tarih yok). iStock: <https://www.istockphoto.com/tr/foto%C4%9Fraflar/tenebrio-molitor-adresinden-alınmıştır>
- J., H. (1998). *Insect viruses and pest management*. New York, Chichester: John Wiley & Sons, Inc.
- Jakob, N. J. (2001). Analysis of the first complete DNA sequence of an invertebrate iridovirus: coding strategy of the genome of *Chilo* iridescent virus. *Virology*, 286(1), 182-196.
- Jehle, J. A. (2006). On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Archives of virology*, 1257-1266.

- Jiang H, Z. J. (2007). Genetic engineering of *Periplaneta fuliginosa* densovirus as an improved biopesticide. *Archives of Virology*, 152;383-394.
- Johnson RM, R. J. (2018). Densonucleosis viruses ('densoviruses') for mosquito and pathogen control. *Current opinion in insect science.*, 28;90-97.
- Johnson RM, R. J. (2018). *Densonucleosis viruses ('densoviruses') for mosquito and pathogen control.*
- Jose, N. R. (2024). Microencapsulation and nanoencapsulation of fungicidal and insecticidal agents for grain packaging and storage. *Journal of Stored Products Research*, 109.
- Kadji, F. M. (2022). Stability of enveloped and nonenveloped viruses in hydrolyzed gelatin liquid formulation. *Virology Journal*, 19(1), 94.
- Kapelinskaya TV, M. E. (2011). Expression strategy of densonucleosis virus from the German cockroach, *Blattella germanica*. *Journal of virology*, (22);11855-11870.
- Kavallieratos, N. G. (2019). Efficacy of pirimiphos-methyl, deltamethrin, spinosad and silicoSec against adults and larvae of *Tenebrio molitor* L. on wheat, barley and maize. *Journal of Stored Products Research*, 161-167.
- Kawase, S. &. (2017). Parvoviridae of invertebrates: densonucleosis viruses. *In Virus of Invertebrates*, 315-344.
- Kelly, D. C. (1979). A small iridescent virus (type 29) isolated from *Tenebrio molitor*: a comparison of its proteins and antigens with six other iridescent viruses. *Journal of General Virology*, 42(1), 95-105.
- Kim, E. K. (2024). Crisis in South Korean cricket farms: Occurrence of *Gryllus bimaculatus* densovirus and its spread. *Journal of Insects as Food and Feed*, 1-12.
- Kittayapong, P. B. (2001). A mosquito densovirus infecting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Thailand. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 61(4), 612-7.
- Kittayapong, P. B. (2001). A mosquito densovirus infecting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Thailand. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 61(4), 612-7.
- Krieg, A. &. (1969). New ultracytological findings in insect nuclear polyhedroses. *Journal of Invertebrate Pathology*, 13(2), 272-279.
- Kumar, D. &. (2017). Reducing postharvest losses during storage of grain crops to strengthen food security in developing countries. *Foods*, 6(1), 8.

- La Fauce, K. A. (2008). The use of insects as a bioassay for *Penaeus merguensis* densovirus (PmergDNV). *ournal of Invertebrate Pathology*, 98(1), 1-6.
- Lacey, L. A.-I. (2015). nsect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of invertebrate pathology*, 1-41.
- Luo, M. Z. (2021). Preparation and performance of insect virus microcapsules. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 104.
- Mazid, S. K. (2011). A review on the use of biopesticides in insect pest management. *Int J Sci Adv Technol*, 169-178.
- Megido, R. C. (2015). Risks and valorization of insects in a food and feed context.
- Mietzsch M, P. J.-M. (2019). Twenty-five years of structural parvovirology. *Viruses*, 11(4);362.
- Morales-Ramos, J. A.-I. (2015). Morphometric analysis of instar variation in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 146-159.
- Moruzzo, R. R. (2021). Mealworm (*Tenebrio molitor*): Potential and challenges to their use in circular production systems. *Animals*, 256.
- Muñoz-Seijas, N. e. (2024). Characterization of all life stages of *Tenebrio molitor*. *Insects*, 145.
- Murphy, G. &. (tarih yok).
- Ozgen, A. M. (2014). Construction and characterization of a recombinant invertebrate iridovirus. *Virus Research*, 189, 286-292.
- Parry R, B. C. (2019). Density-dependent enhanced replication of a densovirus in *Wolbachia*-infected *Aedes* cells is associated with production of piRNAs and higher virus-derived siRNAs. *Virology*, 528;89-100.
- Parry, R. B. (2019). Density-dependent enhanced replication of a densovirus in *Wolbachia*-infected *Aedes* cells is associated with production of piRNAs and higher virus-derived siRNAs. *Virology* (s. 528, 89-100). içinde
- Payne, C. C. (1986). Insect pathogenic viruses as pest control agents. *Fortschritte der Zoologie*, 32.
- Penzes JJ, S.-V. M.-H. (2020). Reorganizing the family Parvoviridae: a revised taxonomy independent of the canonical approach based on host association. *Archives of Virology*, 165;2133-2146.
- Pesticides. (2025). EPA: <https://www.epa.gov/pesticides> adresinden alınmıştır

- Pigeyre, L. S. (2019). Interaction of a densovirus with glycans of the peritrophic matrix mediates oral infection of the lepidopteran pest *Spodoptera frugiperda*. *Viruses*, 870.
- Pöllinger-Zierler, B. L. (2023). *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758): Microbiological screening of feed for a safe food choice. *Foods* (s. 12(11), 2139). içinde
- Pöllinger-Zierler, B. L. (2023). *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758): Microbiological screening of feed for a safe food choice. *Foods*, 12(11), 2139.
- pUC19* Vector. (2010). SinoBiological: <https://www.sinobiological.com/category/vector-puc19> adresinden alınmıştır
- Rajendran, S. (2020). Insect pest management in stored products. *Outlooks on Pest Management*, 31(1), 24-35.
- Reuter G, B. A. (2014). Novel circular single-stranded DNA virus from turkey faeces. *Archives of virology*, 59;2161-2164.
- Ribeiro, N. M. (2018). review of the scientific literature for optimal conditions for mass rearing *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Entomological Science*, 53 (4): 434-454.
- Said, S. M. (2022). Effect of different diets on some larval body characteristics and food utilization efficiency of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Menoufia Journal of Plant Protection*, 9-17.
- Sousa, A. I. (2017). Blue carbon'and nutrient stocks of salt marshes at a temperate coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). *Scientific reports*, 7(1), 41225.
- Srivastava, C. &. (2016). Storage insect pests and their damage symptoms: an overview. *Indian Journal of Entomology*, 53-58.
- Stoops, J. C. (2016). Microbial community assessment of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) and grasshoppers (*Locusta migratoria migratorioides*) sold for human consumption. *Food Microbiology* (s. 122-127). içinde
- Stoops, J. C. (2016). Microbial community assessment of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) and grasshoppers (*Locusta migratoria migratorioides*) sold for human consumption. *Food Microbiology* (s. 53, 122-127). içinde
- Su, K. &. (2015). Recent advances in the use of gelatin in biomedical research. *Biotechnology letters*, 37(11), 2139-2145.
- Sun, Y. D. (2019). Development of large-scale mosquito densovirus production by in vivo methods. *Parasites & Vectors*, 12(1), 255.

- Szelei, J. W. (2011). Susceptibility of North-American and European crickets to *Acheta domesticus* densovirus (AdDNV) and associated epizootics. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106(3), 394-399.
- Talukder, F. (2009). Pesticide resistance in stored-product insects and alternative biorational management: a brief review. *Journal of Agricultural and Marine Sciences*, 9-15.
- Tanada, Y. &. (2012). Insect pathology. *Academic press*.
- Tokarev, Y. M. (2020). Molecular identification of a densovirus in healthy and diseased *Zophobas morio* (Coleoptera, Tenebrionidae). *Intervirology*, 62, 222–226.
- Tokarev, Y. S. (2020). Molecular identification of a densovirus in healthy and diseased *Zophobas morio* (Coleoptera, Tenebrionidae). *Intervirology*, 222-226.
- Topuz, F. C. (2018). Jelatin bazlı yenilebilir film ve kaplamalar. *Akademik Gıda*, 16(3), 332-339.
- Toviho, O. A. (2022). Nutrient composition and growth of yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) at different ages and stages of the life cycle. *Agriculture*, 12(11).
- Vikipedi. (2025, 8 21). Vikipedi Özgür Ansiklopedi: https://tr.wikipedia.org/wiki/Un_kurdu adresinden alınmıştır
- Wang Dong, W. D. (2012). Review of environmental-friendly public health insecticides.
- Wang Y, G. G. (2013). Densovirus crosses the insect midgut by transcytosis and disturbs the epithelial barrier function. *Journal of virology*, 87(22);12380-12391.
- Wennmann, J. K. (2018). Baculovirus Kimura two-parameter species demarcation criterion is confirmed by the distances of 38 core gene nucleotide sequences. *J. Gen. Virol*, 99 (9), 1307–1320.
- Williams, T. B.-S. (2005). A decade of advances in iridovirus research. *Advances in virus research*, 65, 173-248.
- Williams, T. B.-S. (2005). A decade of advances in iridovirus research. *Advances in virus research*, 65, 173-248.

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR

1. Makaleler

Güler, Y. A., & Eroğlu, G. B. (2025). Development of densovirus-based bioinsecticide (Tenebriokiller) for use in the control of mealworm, *Tenebrio molitor* L., 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae). *Turkish Journal of Entomology*, 49(3), 231-244

