

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***CERATITIS CAPITATA* (WIEDEMANN) (DIPTERA:
TEPHRITIDAE) MÜCADELESİNDE *WOLHACHIA*
SPP.'NİN KULLANIMI**

**Hazırlayan
Tayfun KAYA**

**Danışman
Prof. Dr. Aydın TUNÇBİLEK
Doç. Dr. Ergin KARİPTAŞ**

Doktora Tezi

**Mart 2014
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***CERATITIS CAPITATA* (WIEDEMANN) (DIPTERA:
TEPHRITIDAE) MÜCADELESİNDE *WOLHACHIA*
SPP.'NİN KULLANIMI
(Doktora Tezi)**

**Hazırlayan
Tayfun KAYA**

**Danışman
Prof. Dr. Aydın TUNÇBİLEK
Doç. Dr. Ergin KARIPTAŞ**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
FBD-12-4011 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Mart 2014
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Tayfun KAYA

YÖNERGEYE UYGUNLUK

Ceratitis capitata (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) Mücadelesinde *Wolhachia spp.*'nin Kullanımı adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Danışman

Tayfun KAYA

Prof. Dr. Aydın Ş. TUNÇBİLEK

Biyoloji ABD Başkanı
Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ

Prof. Dr. Aydın TUNÇBİLEK ve Doç. Dr. Ergin KARIPTAŞ danışmanlığında **Tayfun KAYA** tarafından hazırlanan “**Akdeniz meyve sineği, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae)’nın, endosimbiyotik bakteri florasının belirlenmesi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

11 / 04 / 2014

JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Aydın Ş. TUNÇBİLEK
 Üye : Prof. Dr. Coşkun TEZ
 Üye : Doç. Dr. Abdurrahman AYVAZ
 Üye : Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK KÜP
 Üye : Yrd. Doç. Dr. Fahriye SÜMER ERCAN

ONAY :

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 13/05/2014 tarih ve 2014/22-10 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kâzım KEŞLİOĞLU

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yaptıkları katkılardan dolayı sayın hocam Prof. Dr. Aydın TUNÇBİLEK ve sayın hocam Doç. Dr. Ergin KARİPTAŞ’a teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince, zaman kavramını unuttuğum zamanlarda dahi, sabır göstererek beni daima destekleyen, çalışmalarımın kapsam ve çerçevesi anlayarak sürekli olarak beni motive eden, “İdeallerinin peşinden git!” diyerek cesaretlendiren, bu tezin ve içeriğinin şekillenmesinde en büyük katkı sahibi eşim Sevcan KAYA’ya; ihmal ettiğim dünyalar tatlısı kızım Naz KAYA’ya en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca beni bugünlere getiren annem Güley KAYA ve babam İbrahim KAYA’ya teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışma arkadaşım Araş. Gör. Sevgi BAKIR’a ve zaman zaman fikir alış-verişinde bulunduğum Araş. Gör. Dr. Kahraman İPEKDAL’a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: FBD-12-4011) ve Uluslar Arası Atom Enerjisi (IAEA) - Dünya Gıda Örgütü (FAO) (CRP), (Proje No: 17071/R0)’nün maddi destekleri ile gerçekleştirilmiştir.

Tayfun KAYA

Kayseri, Mart 2014

***Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae)**

Mücadelesinde *Wolbachia* spp.'nın Kullanımı

Tayfun KAYA

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Doktora Tezi, Mart 2014

Danışman: Prof. Dr. Aydın TUNÇBİLEK

Doç. Dr. Ergin KARİPTAŞ

KISA ÖZET

Akdeniz meyve sineği (AMS) *Ceratitis capitata* (Wiedemann) tropikal ve subtropikal alanlardaki birçok ülkede narenciye ve diğer ürünlerde zarara neden olan en önemli zararlılardan biridir. Türkiye’de ise Doğu Akdeniz’den Kuzey Ege’ye kadar olan bütün sahil şeridindeki narenciye bahçelerinde bulunmaktadır. Bu zararlı ile mücadele için çeşitli mücadele yöntemleri geliştirilmiş ancak bunlar etkisiz olmuştur. İstilacı olan bu zararlının geniş bir alanda entegre mücadelesinde çevre dostu yöntemlerden olan kısır böcek tekniği (KBT) kullanılmaktadır. Bu metodun temelinde AMS’nin kitle üretimi, bunların gamma radyasyonu kullanılarak sterilizasyonu ve elde edilen kısır bireylerin bu zararlının bulunduğu alana doğal erginlerle rekabeti için uçak veya kara araçları ile salıverilmesi bulunmaktadır. Dünyada bu yöntemin geliştirilmesi için kapsamlı çalışmalar yapılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, başlangıç olarak AMS’nin kültüre alabilmek ve üzerinde çalışma yapılabilmesi için kafes sistemleri ve insektaryum kabini yapıldı. Diğer yandan zararlılarla mücadelede kapsamında gelecek vaat eden endosimbionik bakteriler (*Wolbachia*, *Cardinium*, *Hamiltonella*, *Arshenophonus*, *Spiroplasma* ve *Rickettsia*) Türkiye’de ilk kez AMS’nde tarandı. Taramalar PCR tabanlı moleküler tekniklerle gerçekleştirildi. Buna göre; AMS’de *Wolbachia* 12 lokasyonda, *Cardinium*,

Arshenophonus, *Hamiltonella*, *Spiroplasma* ve *Rickettsia* ise İzmir-Bornova lokasyonunda incelendi. Taranan lokasyonlardaki AMS popülasyonlarında *Wolbachia*, *Hamiltonella* ve *Rickettsia* enfeksiyonu tespit edilemedi. Diğer taraftan İzmir-Bornova lokasyonunda temin edilen AMS popülasyonunda *Cardinium*'a spesifik primerlerle *Ch* ve *Clo* daha önce belirtilmeyen tarzda PCR ürünleri ve sekans verisi elde edilmiştir. Bununla birlikte aynı lokasyonda, AMS'nde ilk kez *Arshenophonus* ve *Spiroplasma* enfeksiyonuna yönelik veriler elde edildi.

Anahtar Kelimeler: *Ceratitis capitata*; Akdeniz Meyve Sineği; *Cardinium*; *Arsenophonus*; *Spiroplasma*.

**Usage *Wolbachia* spp.'s in Fighting with *Ceratitidis capitata*
(Wiedemann) (Diptera: Tephritidae)**

Tayfun KAYA

Erciyes University, Graduate School of Applied Sciences

Ph. Dr. Thesis, March 2014

Supervisor: Prof. Dr. Aydin TUNCBILEK

Doç. Dr. Ergin KARIPTAS

ABSTRACT

Mediterranean fruit fly (Medfly), *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) is a key pest of citrus and other crops in many countries throughout subtropical and tropical regions. It exists in all the costal areas from North Aegean towards East Mediterranean in citrus orchards in Turkey. Various control strategies have been developed but are ineffective for the management of these pests. Strategies for area wide integrated management of this invasive pest increasingly use the environmentally friendly approach of the sterile insect technique (SIT). This methodology is based on the mass rearing of male medfly, their sterilization using gamma radiation and their release from aircraft or ground vehicles into infested areas in order to compete with wild adults. Extensive studies are going on to develop this method throughout world.

In this study, cage rearing systems and insectariums were built in order to rear Medfly. On the other hand, endosymbiotic bacteria (*Wolbachia*, *Cardinium*, *Hamiltonella*, *Arshenophonus*, *Spiroplasma* and *Rickettsia*) are promising symbiotic organisms for pest management. These symbionts were searched for the first time in Turkey to control medfly. We searched medflies populations for precens of *Wolbachia* in Medfly from 12 locations by using molecular techniques based on PCR. was

searched. Presence of *Cardinium*, *Arshenophonus*, *Hamiltonella*, *Spiroplasma* and *Rickettsia* were searched only in Bornova-İzmir. *Wolbachia*, *Hamiltonella* and *Rickettsia* infections were not detected in the investigated locations. Unique PCR products and sequences were obtained in İzmir population for *Cardinium* by using *Cardinium* specific *Ch* and *Clo* primers. Additionally, *Arshenophonus* and *Spiroplasma* infections were detected for the first time in Medfly at the same location.

Anahtar Kelimeler: *Ceratitis capitata*; Mediterranean fruit fly; *Cardinium*; *Arsenophonus*; *Spiroplasma*

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	ii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZ	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER	xii
TABLolar LİSTESİ	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
 GİRİŞ	 1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. <i>Ceratitidis capitata</i> (Wiedemann), Akdeniz Meyve Sineği (AMS, MedFly)	4
1.1.1. Taksonomideki Yeri	4
1.1.2. Biyolojisi ve Karakteristik Özellikleri	5
1.1.3. Konukçuları ve Zararı	9
1.2. Türkiye’de AMS ve Ekonomiye Etkisi	10
1.3. AMS ile Mücadele.....	13
1.3.1. Kültürel ve Fiziksel Yöntemler.....	13
1.3.2. Kimyasal Yöntemler	14
1.3.3. Biyolojik Yöntemler.....	14
1.4. Zararlılar ile Mücadelede Kısır Böcek Tekniği	14
1.4.1. Kısır Böcek Tekniği Kapsamında Simbiyotik Bakterilerin Önemi ve Kullanımı.....	 18

1.4.2. Kısır Böcek Tekniğinde Kullanılan Sekonder Simbiyotik	
Bakteriler	19
1.4.2.1. <i>Wolbachia</i>	21
1.4.2.2. <i>Cardinium</i>	22
1.4.2.3. <i>Rickettsia</i>	23
1.4.2.4. <i>Spiroplasma</i>	23
1.4.2.5. <i>Arsenophonus</i>	24
1.4.2.6. <i>Hamiltonella</i>	24

2. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Akdeniz Meyve Sineği Kültürü için Gerekenlerin Oluşturulması.....	26
2.1.1. Yetiştirme Kabini (İnsektaryum)	26
2.1.2. Kafes.....	27
2.2. Arazi Çalışmaları	26
2.3. Akdeniz Meyve Sineği Kültürü	31
2.3.1. Vuruklu Meyvelerden Akdeniz Meyve Sineğinin Elde Edilmesi	31
2.3.2. AMS'nin Laboratuvar Kültürü.....	32
2.3.3. Larva Besi Ortamı	33
2.4. Moleküler Çalışmalar.....	34
2.4.1. Total DNA İzolasyonu	34
2.4.2. Plimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	35
2.4.3. PCR Ürünlerinin Agaroze Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi.....	40
2.5. AMS'inde Sekonder Simbiyotik Bakteri Taraması	41
2.5.1. <i>Wolbachia</i> Taraması	41
2.5.2. <i>Cardinium</i> Taraması	41
2.5.2.1. <i>Ch</i> ve <i>Clo</i> Primer Ürünlerinin Eliminasyonu için Antibiyotik Uygulaması.....	43

2.5.2.2.	<i>Ch</i> ve <i>Clo</i> Primerlerinin Bağlanma Olasılıklarının Belirlenmesi	45
2.5.3.	Akdeniz Meyve Sineği Yumurtalarının Yüzey Sterilizasyonu ve Bakteri Taraması	46
2.5.3.1.	Akdeniz Meyve Sineği Yumurtalarında <i>16S</i> <i>rDNA</i> Primeri ile Elde Edilen PCR Ürünlerinin Araştırılması.....	47
2.5.4.	<i>Arsenophonus</i> , <i>Hamiltonella</i> , <i>Rickettsia</i> ve <i>Spiroplasma</i> Taraması.....	47

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1.	Akdeniz Meyve Sineği Kültürü için İnsektaryum ve Kafes Sistemleri	49
3.2.	AMS’nde Senkonder Simbiyotik Bakteri Taraması	54
3.2.1.	<i>Wolbachia</i> Taraması	54
3.2.2.	<i>Cardinium</i> Taraması.....	55
3.2.2.1.	<i>Ch</i> ve <i>Clo</i> ile Elde Edilen Dizilerin Analizi	57
3.2.2.2.	AMS Yumurtalarından Elde Edilen <i>12S mtDNA</i> ve <i>16S rDNA</i> Dizilerinin Analizi ve Bunlarda <i>Ch</i> ve <i>Clo</i> Dizilerinin Taranması	58
3.2.3.	Akdeniz Meyve Sineği Yumurtasının Yüzey Sterilizasyonu ve Bakteri Taraması	62
3.2.4.	<i>Arsenophonus</i> , <i>Hamiltonella</i> , <i>Rickettsia</i> ve <i>Spiroplasma</i> Taraması.....	64
3.2.4.1.	<i>Arsenophonus</i> Primerleri (<i>ArsF-R2</i>) ile Elde Edilen Dizinin Analizi.....	66
3.2.4.2.	<i>Spiroplasma</i> Primerleri (<i>63F-TK55R</i>) ile Elde Edilen Dizinin Analizi.....	68

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1.	Tartışma	70
------	----------------	----

4.1. Sonuç ve Öneriler	79
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ.....	99

KISALTMALAR VE SİMGELER

<u>Sembol</u>	<u>Anlamı</u>
AMS	Akdeniz meyve sineği, <i>Ceratitis capitata</i> (Wied.)
KBT	Kısır böcek tekniği
dNTP	deoksiribo-Nükleotid Tri-Fosfat
EDTA	Etilen di-amin tetra-asetik asit
mtDNA	Mitokondriyal DNA
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TAE	Tris, Glasial Asetik Asit, EDTA
bç	Baz çifti
gr	Gram
l	Litre
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mg	Miligram
m	Metre
°C	Santigrat Derece

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	Akdeniz meyve sineğinin elde edildiği lokasyonların koordinatları, rakımları.....	30
Tablo 2.2.	Larva besi ortamı hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve oranları	33
Tablo 2.3.	DNA izolasyonu için kullanılan CTAB tamponunun bileşenleri	34
Tablo 2.4.	PCR reaksiyon bileşenleri ve miktarları.	36
Tablo 2.5.	PCR amplifikasyon koşulları	37
Tablo 2.6.	Akdeniz meyve sineğinde endosimbiyotik bakteri taramalarında kullanılan primerler.....	38
Tablo 3.1.	<i>12S mtDNA (CRF-CRR)</i> primer setinin, Spanos et al. (134) tarafından gerçekleştirilen <i>C. capitata</i> mitokondrial genomunda belirlenen bağlanma bölgeleri.....	61
Tablo 3.2.	<i>ArsF-R2</i> primer çifti ile elde edilen yaklaşık 800 bp uzunluğundaki dizi ile % 89 oranında benzerlik gösteren Wilkes et al. [135] tarafından <i>N. vitripennis</i> 'in simbiyontu <i>Arsenophonus</i> 'dan elde edilen linear DNA bölgesi.	67
Tablo 3.3.	<i>63F-TK55R</i> primer çifti ile elde edilen yaklaşık 800 bp uzunluğundaki dizi ile % 84 oranında benzerlik gösteren Weisburg et al. [136] tarafından <i>S. poulsonii</i> 'ye ait olduğu belirtilen <i>16S rRNA</i> bölgesi.....	69
Tablo 4.1.	<i>ArsF-ArsR2</i> primer çifti ile elde edilen yaklaşık 730 bp uzunluğundaki baz dizisinin GenBank veri tabanındaki BLAST analiz sonuçları	76
Tablo 4.2.	<i>63F-TK55R</i> primer çifti ile elde edilen yaklaşık 450 bp uzunluğundaki baz dizisinin GenBank veri tabanındaki BLAST analiz sonuçları	77

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Akdeniz meyve sineğinin genel görünüşü	5
Şekil 1.2.	Akdeniz meyve sineği yumurtası.....	6
Şekil 1.3.	Akdeniz meyve sineği larvası.....	6
Şekil 1.4.	Akdeniz meyve sineği pupası	7
Şekil 1.5.	Akdeniz meyve sineğinin hayat döngüsü.	8
Şekil 1.6.	Mandalinada AMS'nin yumurta bırakması ile başlayan ve devam eden zarar süreci.	10
Şekil 1.7.	Türkiye'de narenciye üretimi.....	10
Şekil 1.8.	Türkiye'de il bazında narenciye üretim oranları.....	11
Şekil 1.9.	Akdeniz meyve sineğinin Türkiye'deki yayılışı.....	13
Şekil 1.10	Kısır böcek tekniğinin uygulaması ve etkileri..	16
Şekil 1.11	Dünyada kısır böcek kitle üretim miktarları.	16
Şekil 2.1.	Akdeniz meyve sineği kültürü için denenen kafes şekilleri	29
Şekil 2.2.	Akdeniz meyve sineğinin elde edildiği lokasyonların harita üzerinde gösterimi.	30
Şekil 2.3.	Enfekteli portakal ve mandalinalardan Akdeniz meyve sineğinin elde edilmesi	32
Şekil 2.4.	AMS kültürünün gerçekleştirildiği kafes ve insektaryum	33
Şekil 2.5.	Larva besiortamının bileşenleri ve hazırlanan besiortamı..	34
Şekil 2.6.	AMS örneklerinden total DNA izolasyonu sırasında kullanılan malzeme ve tamponlar.....	35
Şekil 2.7.	PCR reaksiyon karışımlarının hazırlanması..	36
Şekil 2.8.	Akdeniz meyve sineği yumurta, larva ve erginlerine antibiyotik uygulamasında kullanılan kafes.....	44
Şekil 3.1.	Akdeniz meyve sineği kültürü için kullanılan sıcaklık, nem ve ışık kontrollü insektaryum.	50
Şekil 3.2.	Akdeniz meyve sineğinin kültürü için kullanılan kafes sistemi.ve bileşenleri.....	53
Şekil 3.3.	<i>Wolbachia</i> primerleri ile gerçekleştirilen aplifikasyon sonrasında elde edilen PRC ürünlerinin elektroforezindeki jel görüntüsü	55

Şekil 3.4.	<i>Cardinium</i> primerleri ile gerçekleştirilen amplifikasyon sonrasında elde edilen PRC ürünlerinin elektroforezindeki jel görüntüsü..	56
Şekil 3.5.a.	<i>ChF</i> ile elde edilen ~170 bp'lik baz dizisinin kromatogramı.....	57
Şekil 3.5.b.	<i>ChR</i> ile elde edilen ~170 bp'lik baz dizisinin kromatogramı..	57
Şekil 3.6.a.	<i>CloF</i> ile elde edilen ~280 bp'lik baz dizisinin kromatogramı.....	57
Şekil 3.6.b.	<i>CloR</i> ile elde edilen ~280 bp'lik baz dizisinin kromatogramı..	58
Şekil 3.7.	Akdeniz meyve sineği yumurtalarından izole edilen total DNA'ların agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü ..	59
Şekil 3.8.	Yumurta total DNA'larından <i>12S mtDNA</i> ve <i>16S rDNA</i> primerleri ile gerçekleştirilen PRC ile elde edilen ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü..	59
Şekil 3.9.	<i>16S rDNA</i> 27F ile elde edilen baz dizisinin kromatogramı ..	61
Şekil 3.10.	<i>16S rDNA</i> 1513R ile elde edilen baz dizisinin kromatogramı.....	61
Şekil 3.11.	Yumurta yüzey sterilizasyonunun kontrolü.....	62
Şekil 3.12.	Yüzey strilizasyonu gerçekleştirilmiş AMS yumurta total DNA izolatlarından <i>12S mtDNA</i> ve <i>16S rDNA</i> primerleri ile gerçekleştirilen PRC ile elde edilen ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü..	63
Şekil 3.13.	Yüzey strilizasyonu gerçekleştirilmiş AMS yumurta total DNA izolatlarından <i>Ch</i> ve <i>Clo</i> primerleri ile gerçekleştirilen PRC ile elde edilen ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.....	63
Şekil 3.14.	<i>Arsenophonus</i> (<i>ArsF-R3</i>), <i>Hamiltonella</i> (<i>HamF-R</i>) ve <i>Rickettsia</i> (<i>RbF-R</i>) primerleri ile gerçekleştirilen PRC ile elde edilen ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.....	65
Şekil 3.15.	<i>Arsenophonus</i> (<i>ArsF-R2</i>) ve <i>Spiroplasma</i> (<i>63F-TK55</i>) primerleriyle elde edilen PCR ürünlerinin elektroforezindeki jel görüntüsü..	65

GİRİŞ

Ceratitis capitata [Wiedemann, 1824 (Diptera: Tephritidae)], Akdeniz meyve sineği (AMS), geniş yayılış alanı ve polifag beslenme rejimi ile en zararlı meyve sinekleri arasındadır. AMS başta turunçgiller (limon hariç) olmak üzere şeftali, Trabzon hurması, incir, kayısı, elma ve palmye gibi birçok meyvede zarara neden olmaktadır [1-3].

AMS'nin asıl zararı larva evresinde görülmekle birlikte, zararlı tarafından enfekte edilen meyveler hasat zamanından önce dökülerek ürün kaybına neden olmaktadır. Dolayısıyla AMS'nin zararı sadece tarlada kalmaz aynı zamanda meyvelerin pazarlanmasında da devam etmektedir. Meyvelerin iç pazarda satışa sunulmadan çürümeye veya tezgâhta tercih edilmemesine neden olmaktadır. Ayrıca zarara neden olduğu meyvelerin ihracatının da önündeki en büyük engellerden biri olarak nitelendirilmektedir. AMS özellikle meyve çeşitliği ve yüksek meyve üretim potansiyeline sahip Türkiye gibi bir ülke için dikkat edilmesi gereken zararlıdır ve meyve ihracatının belirleyicisi durumundadır. Nitekim *C. capitata* karantina listelerinde yer alan bir sinektir [4,5].

C. capitata yayılışı, zararı ve ekonomik etkileri nedeniyle mücadele edilmesi gereken bir tehdittir. Mücadelesinde genel olarak fiziksel ve kimyasal kullanılmakla birlikte biyolojik yöntemlerin de etkin bir şekilde kullanılabilmesi için çalışmalar yürütülmektedir. Fiziksel ve kimyasal yöntemler kâr-zarar dengesi, etkinliği ve sürekliliği gözetildiğinde tartışmalı ancak zorunlu olarak kullanılan yöntemlerdir. Dolayısıyla çevreci ve etkili biyolojik mücadele yöntemleri önem kazanmaktadır [6-8].

Zararlılara karşı kullanılan çevre dostu bir yöntem olan biyolojik mücadele kapsamında zararlıların üremesini, gelişmesini veya yayılmasını baskılayan biyolojik

ajanlar (bakteriler, parazitoitler, predatörler) ve toksinler kullanılmaktadır. Son yıllarda üzerinde çalışmaların yoğunlaştığı zararlıların beslenmesi ve üremesi üzerine etki eden simbiyotik bakterilerin kullanılması şeklindeki biyolojik mücadele yöntemlerine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmektedir [9-15].

Her canlı farklı rollere sahip canlılara konukçuluk yapmaktadır. Simbiyont adı verilen bu canlılar, özellikle de bakteriler, konukçusunun sinir, boşaltım, sindirim ve üreme gibi farklı sistemlerinde bulunabilmekte; doğrudan veya dolaylı olarak konukçu biyolojisine etki etmektedir. Simbiyont bakterilerin bu özelliklerinin zararlı böceklerle mücadelede kullanılabileceği belirtilmektedir [7, 11, 16].

Böceklerde simbiyotik bakteriyal flora genel olarak yumurta bırakma esnasında ve/veya yumurta içeriğinde aktarılanlar olmak üzere, primer ve sekonder simbiyontlar (endosimbiyontlar) şeklinde iki gruba ayrılmaktadır. Buna göre primer simbiyontlar böceğin yaşamını sürdürebilmesi için gerekli olanlar şeklinde tanımlanırken, sekonder simbiyontlar ise böceğin yaşamı üzerinde doğrudan ilişkili olmayan ancak üreme şeklini ve/veya davranışını manipüle edenler şeklinde tanımlanmaktadır [15, 16].

Yapılan literatür araştırmalarında, AMS gibi zararlılarla mücadelede kullanma amacıyla, sekonder simbiyontların tespitine yönelik bir çok çalışma bulunmasına [14-25] karşın Türkiye’de bu yönde bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada başta narenciye olmak üzere şeftali, kayısı gibi meyvelerde büyük zarara neden olan AMS ile mücadele için etkin, sürdürülebilir, çevre dostu ve alternatif yöntemlerin geliştirilebilmesi için endosimbiyotik bakteriyal florasının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla artropodların büyük bir kısmının üreme sistemleri üzerinde etkili olan sekonder simbiyontlardan *Wolbachia* ve *Cardinium* enfeksiyonuna yönelik İzmir, Bornova’dan elde edilen doğal AMS popülasyonunda tarama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca B planı olarak AMS’nde *Hamiltonella*, *Arshenophonus*, *Spiroplasma* ve *Rickettsia* gibi endosimbiyonlar taranarak da çalışmanın desteklenmesi amaçlanmıştır. Çalışmalarda PCR tabanlı yöntemler kullanılarak, sekonder simbiyotik bakterilerin moleküler verilerle identifikasyonu ve bunların daha sonra gerçekleştirilecek AMS ile mücadele

alışmaları için veri ve zemin hazırlanması hedeflenmiştir. Diğer taraftan AMS üzerinde çalışmaların yürütülebilmesi için söz konusu zararlının laboratuvar ortamında kültüre alınması için fonksiyonel bir insektaryum ve kafes sisteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. *Ceratitidis capitata* (Wiedemann), Akdeniz Meyve Sineği (AMS, Medfly)

Gerçek meyve sineği olarak da adlandırılan *Ceratitidis capitata* (Wiedemann), ilk olarak Havai adasında 1910 yılında teşhis edilmiştir [26, 27]. AMS tropik, subtropik ve geçiş alanlarında 400'den fazla bitkiyi konakçı olarak kullanan bir sinektir ve Tephritidae familyasının en yaygın üyelerinden biridir [26, 28, 29]. 20 km uçabilen [30] AMS'nin; Afrika, Asya, Avrupa, Orta ve Güney Amerika ile Avusturalya olmak üzere 6 kıtada yaklaşık 132 ülke ve grup adalarında kaydı bulunmaktadır [27].

Birçok meyve ve sebzeyi konak olarak kullanabilmesi ve bunların ticaretinin yapıyor olması, AMS'nin küresel çapta dağılımını sağlayan en önemli faktörler arasında gösterilmektedir. Dolayısıyla AMS dünyadaki en etkili meyve zararlılarından biri olarak nitelendirilmektedir [26, 28].

1.1.1. Taksonomideki Yeri

C. capitata (Wiedemann), Akdeniz meyve sineği Tephritidae familyasında yer alan ve dünyada 4500'den daha fazla tür içeren Diptera takımının bir üyesidir [28, 29]. Türkiye'de de yayılış gösteren 118 meyve sineğinden biridir [31].

Kingdom	(Alem)	: Animalia
Phylum	(Bölüm)	: Arthropoda
Class	(Sınıf)	: Insecta
Order	(Şube)	: Diptera
Family	(Familya)	: Tephritidae
Genus	(Cins)	: <i>Ceratitis</i>
Species	(Tür)	: <i>Ceratitis capitata</i>

1.1.2. Biyolojisi ve Karakteristik Özellikleri

AMS erginleri ev sineğinden küçük, yaklaşık 2/3'si kadar, 3.5-5.0 mm boyutlarındadır. Vücudu genel olarak sarımsı kahverengi renkte olup kahve renkteki abdomen üzerinde iki açık renkli bant bulunur. Toraks siyah, sarımsı ve gümüş renkli bölgeler ile mozaik görünüme sahiptir. Kanatları geniş, tam açık durumdadır ve kahverengimsi siyah bantlara sahiptir [26, 32, 33].

Ergin erkekler anteriorün uç kısmında bulunan bir çift siyah renkli orbital seta ile kolaylıkla ayrılır (Şekil 1.1a). Dişiler karakteristik sarı desenli kanat ve scutellumun apikal kısmının yarısının tamamen siyah olmasıyla çoğu diğer türden ayrılabilir. Diğer yandan erkeklerin abdomen sonu küt iken, dişilerde ise abdomen sonunda yumurta bırakma borusu (1.2 mm), ovipozitör, (Şekil 1.1b) bulunmaktadır [32, 33]



Şekil 1.1. Akdeniz meyve sineğinin genel görünüşü (a, Erkek birey; b, Dişi birey) (Resim Tayfun KAYA).

AMS yumurtaları beyaz-krem renkli, mekik şekilli ve yaklaşık 1 mm x 0.2 mm boyutlarındadır (Şekil 1.2). Yumurtaların açılması için en düşük sıcaklık eşiği 11°C iken, optimum açılma sıcaklığı 25°C'dir. Bırakıldıktan sonra yumurtalar 1-4 gün içerisinde açılırlar [26, 34].



Şekil 1.2. Akdeniz meyve sineği yumurtası (Resim Tayfun KAYA).

AMS larvaları yumurtadan çıktığında yaklaşık 1 mm boyunda ve şeffaf bir görünüme sahip olup beslenme ile opak beyaz renk alırlar. Çıkan larvalar bulundukları konak meyvenin etli kısımları içerisinde tüneller açarak 6-10 gün burada beslenirler. AMS larvaları bacaksızdır (Şekil 1.3). 3 instar evresi geçiren larvalar meyvelerden ayrılarak pupa oluşturmak üzere toprağa atlarlar. Ancak pupa oluşturmak için larvaların toprağa ihtiyacı yoktur; meyve içerisinde ya da herhangi bir yerde de pupa oluşturabilirler [26, 33].



Şekil 1.3. Akdeniz meyve sineği larvası (Resim Tayfun KAYA).

Pupalar silindirik şekilli, fıçı tipinde olup 3.5-4.3 mm boyutlarındadır. Başlangıçta beyazımsı-krem renkli olan pupalar daha sonra kırmızımsı kahve renkli görünümü alır. Pupa evresinde optimum sıcaklık aralığı 22-30°C, minimum ve maksimum sıcaklık eşikleri ise sırasıyla 9.7-35°C'dir. Pupadan ergin çıkışı 26°C'de 6-15 günde gerçekleşir [26, 33, 34] (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Akdeniz meyve sineği pupası (Resim Tayfun KAYA).

Pupadan yeni çıkan erginler eşeyssel olgunlukta değildirler. Ovipozasyon periyodu öncesi çevresel koşullara bağlı olarak çok değişkenlik gösterir. Bu periyotta sıcaklık, besin ve cinsiyet gibi faktörler etkilidir ve preovipozasyon evresi olarak da adlandırılan bu süre minimum 2 gün olmakla birlikte ortalama 7-8 gündür. Ergin AMS dişileri çiftleşme sonrasında hem beslenmek (beslenme ovipozasyon evresi boyunca devam eder) için hem de yumurta bırakmak için meyve ararlar. Dişiler ovipozitörleri ile konakçı oldukları meyvelere delikler açarak 1-10 yumurta bırakırlar. Diğer dişilerde açılan aynı deliğe yumurta bırakabilirler. Açılan tek bir oyukta (delikte) yüz yumurta bulunabilir. Bir AMS 30-60 gün yaşar ve normal koşullar altında bir dişinin hayatı boyunca 250-1200 yumurta bırakabilir. Dişiler, sıcaklık 17°C'nin altına düştüğünde yumurta bırakmazlar [26, 27, 33]. AMS Türkiye'de Ege Bölgesinde yılda 4-5, Akdeniz Bölgesinde 7-8 döl vermektedir [35].

Yumurta, larva ve pupa aşamalarında gelişim 10°C'nin altındaki sıcaklıklarda bloke edilir veya gelişim büyük oranda düşer. Diğer yandan pupa aşaması besin azlığı ile

kuraklık ve aşırı sıcaklıklar gibi uygun olmayan koşullarda canlılığın devam ettirilmesini de sağlar [26, 33].

Meyveye bırakılan yumurtaların açılmasıyla (1-4 gün) başlayan bir AMS'nin gelişim süreci, toprakta pupa (ya da meyve içerisinde) (6-15 gün) ve ergin bireylerin yaşamsal faaliyetleri (30-60 gün) olmak üzere toplam 37-79 gün sürmektedir (Şekil 1.5). Bu şekilde her bir biyolojik evresini farklı ortamda tamamlanması nedeniyle; AMS'nin hayat döngüsü, başta sıcaklık olmak üzere meteorolojik koşullara bağlıdır. Çoğu tropikal meyve sineği türlerine göre soğuk iklim koşullarında daha toleranslı olarak nitelendirilmekle birlikte; yumurta, larva ve ergin gelişimi hava sıcaklığından etkilenir. Pupa gelişimi ise toprak sıcaklığına bağlıdır. Hem hava hem de toprak sıcaklığı bakımından minimum sıcaklık sınırları vardır. Bu sıcaklık eşiği toprakta 9.7°C, hava da ise 17°C'dir. AMS'nin optimum gelişmesi için gerekli sıcaklık aralığı ise 24-29°C'dir [26, 27].



Şekil 1.5. Akdeniz meyve sineğinin hayat döngüsü. (Resim Tayfun KAYA)

1.1.3. Konukçuları ve Zararı

AMS erginleri yumurta bırakmak için genel olarak ince kabuklu olgun meyveleri tercih etmektedir. Dünyada muz, mango ve papaya gibi 400'den fazla bitkide enfeksiyona neden olan bir zararlıdır [28]. AMS'nin konukçuları;

- 1- En çok zarar gören konukçular (limon hariç turunçgiller, Trabzon hurması vb.),
- 2- Zaman zaman zarara neden oldukları (domates, papaya, biber vb.),
- 3- Nadiren konak olarak kullandıkları (muz, patlıcan, üzüm vb.),
- 4- Laboratuvar konukçuları (kabak, hıyar, kaktüs vb.),
- 5- Önem derecesi bilinmeyen konukçular (ananas, fasulye, badem vb.) olarak sınıflandırılmaktadır [33, 36]. Ülkemizde ise tespit edilen en önemli konukçuları limon hariç olmak üzere başta turunçgiller, şeftali, incir, Trabzon hurması ve nar olmakla birlikte kayısı, elma, ayva, avokadoda da zarara neden olmaktadır [4, 36].

AMS meyvelerde direk veya dolaylı olarak 3 şekilde zarara neden olmaktadır, bunlar:

- Bitkilerin yumuşak dokuları ve meyvelerine yumurta bırakma,
- Larvaların beslenmesi,
- AMS enfeksiyonu ile birlikte veya sonrasında diğer organizmaların da dahil olduğu (sekonder enfeksiyon) bir süreç sonucu meyve dokularında çürüme, şeklinde gerçekleşmektedir [26].

Meyvede AMS'nin neden olduğu zarar, yumurta bırakma ile birlikte başlar. Bunun sonucunda ilk olarak yumurtanın bırakıldığı noktadan başlayarak yayılan ve meyvede farklı bir renk kombinasyonu ile sonuçlanan bozulmalar meydana gelir (Şekil 1.6). Daha sonra da genel olarak meyveler erken sararır ve dökülür [36].

Enfeksiyonun ilerlemesi yani meyvelere bırakılan yumurtaların açılması ile çıkan larvalar meyve içerisinde tüneller açarak meyvelerin etli kısımları ile beslenmeye başlar. Bu kısımlarda bir yumuşama, çöküntü ve çürüme gerçekleşmektedir. Dolayısıyla en önemli zarar larvaların meyvelerde beslenmesi sırasında gerçekleşir. Larvalar (6-15 gün) meyvede içerisinde beslenerek meyvenin besin, kalite ve alım değerini düşürür. Ayrıca açılan tüneller aracılığıyla meyveye diğer sinek/böcek, bakteri ve fungus girişi ile meyvede sekonder enfeksiyonlar gerçekleşir. Bu bütün bu süreç meyvenin dal ile

bağlantı noktasında doku harabiyeti meydana getirir. Gerçekleşen bu süreçler sonucunda da meyve düşer (Şekil 1.6) [26, 33].

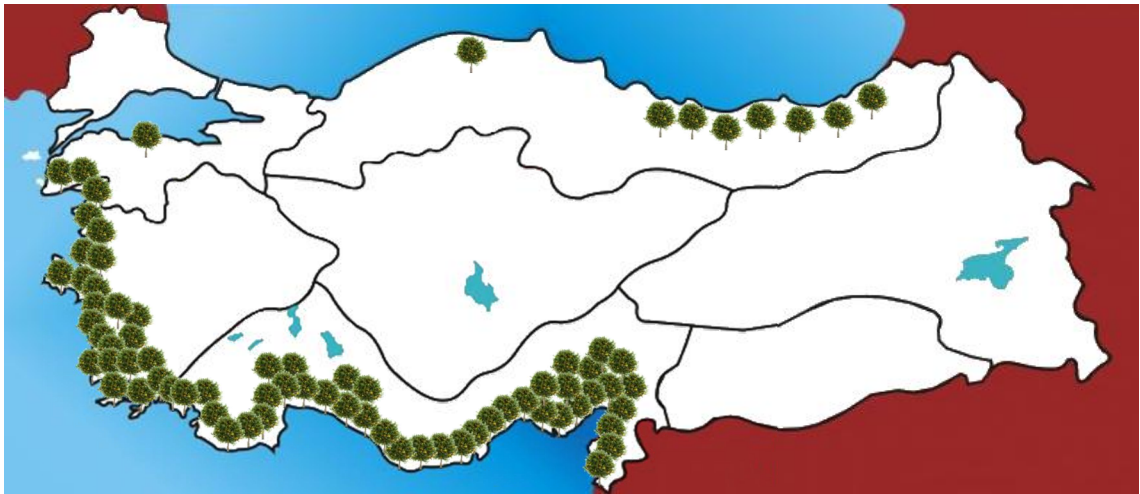


Şekil 1.6. Mandalinada AMS'nin yumurta bırakması ile başlayan ve devam eden zarar süreci (Resim Tayfun KAYA).

1.2. Türkiye’de AMS ve Ekonomiye Etkisi

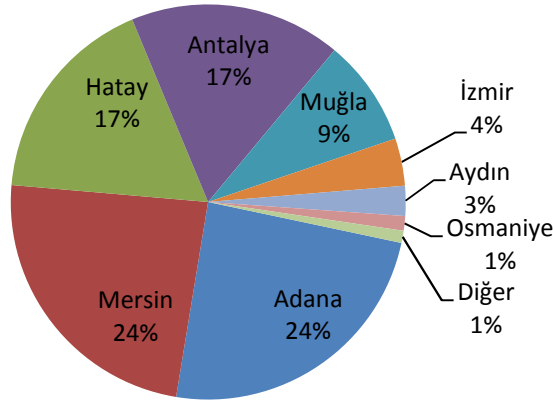
AMS, birçok meyve çeşidinin üretiminin gerçekleştirildiği, Türkiye’de en büyük tehditlerden biri olarak gösterilmektedir. Bu tarımsal ürünlerden özellikle narenciye pazar değeri bakımından Türkiye’nin en önemli tarımsal ürünlerindendir [4, 36].

Türkiye’de narenciye üretimi güney-batı kıyı şeridi boyunca ve lokal olarak da Doğu Karadeniz’de gerçekleştirilmekle birlikte asıl üretim ise Akdeniz ve Ege Bölgelerinde gerçekleştirilmektedir [4, 36, 37] (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Türkiye’de narenciye üretimi [37].

Narenciye üretim miktarları il bazında irdelendiğinde ise; ilk sırada toplam üretim içerisindeki % 24’erlik payla Adana ve Mersin vardır. Bu illeri sırasıyla Antalya, Hatay, Muğla, İzmir ve Aydın takip etmektedir (Şekil 1.8) [37].



Şekil 1.8. Türkiye’de il bazında narenciye üretim oranları [37]

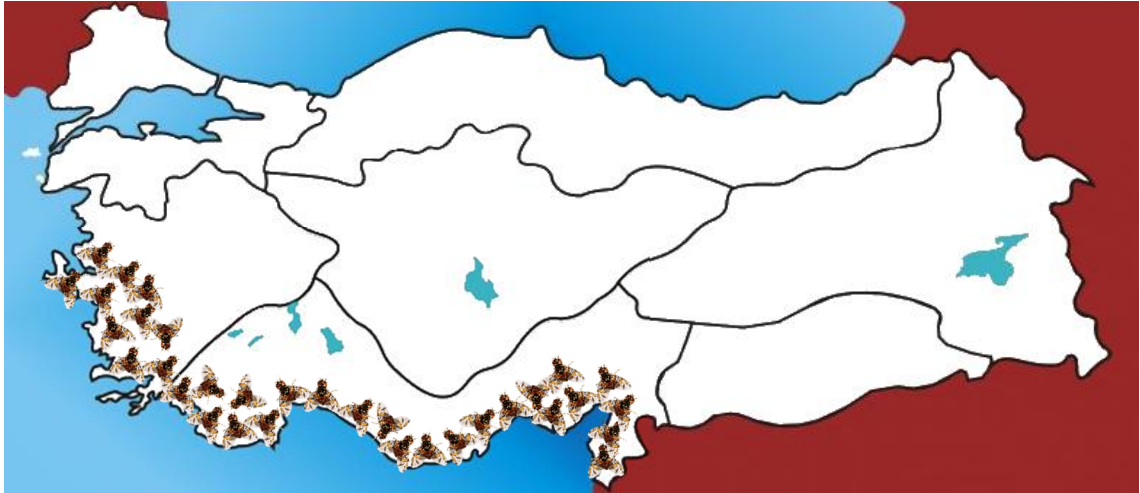
Türkiye bu narenciye üretimi ile dünyada ilk 10 içerisinde yer almaktadır. Öyle ki narenciye üretimi bakımından Türkiye, Akdeniz Havza’sında sırasıyla İspanya, İtalya ve Mısır’dan sonra 4. dünyada ise 7. sıradadır [38]. Benzer şekilde turuncgillerin ihracatında da Türkiye, Ekonomi Bakanlığı’nın sektör raporuna göre, İspanya’nın ardından 2. sıradadır [39]. 2013 yılında narenciye üretimi yaklaşık 3.7 milyon ton olarak gerçekleşmiştir [40]. Akdeniz İhracatçıları Birliği verilerine göre ise bunun yaklaşık 105 bin tonu ihraç edilmiştir. Türkiye narenciye ihracatını sırasıyla Irak (% 24), Rusya (% 22), Ukrayna (% 12), Suudi Arabistan (% 10) ve aralarında Almanya ve Japonya’nın da bulunduğu diğer ülkelere (% 32) gerçekleştirmiştir [41].

Narenciye üretim ve ihracat rakamları dikkate alındığında üretilen miktarın çok az bir kısmının ihraç edilmektedir. Bu durumun en önemli nedenlerinden biri de AMS’dir. Öyle ki AMS ihracat karantina listelerinde yer almaktadır. Diğer bir deyişle “zararlıının ihracatta toleransı ‘0’ dır ve gümrük kapılarında bulaşık bir tek meyvenin bulunması durumunda dahi meyve ihracatının durmasına neden olmaktadır” [4, 42]. Dolayısıyla da AMS Türkiye’nin narenciye üretimini ve ihracatını olumsuz yönde etkilemektedir. Nitekim en önemli narenciye pazarı durumundaki Rusya 2003 yılında ürünlerdeki AMS bulaşığı nedeniyle Türkiye’yi önce uyarmış ve narenciye ithalatını sınırlandırmış, 2005 yılında ise Türkiye’den narenciye ithalatını durdurmuştur [42, 43]. Bunun yanı sıra İran Bitki Koruma Örgütü Türkiye’den narenciye ithalatında *C. capitata* kontrolü için soğuk işlem istemiş ve belirlediği prosedür koşullarını ülkemize göndermiştir [44]. Diğer

tarafından AMS'nin narenciye üzerindeki zararı ağaçta başlamakta ve tüketilmesine kadar da devam etmektedir. Bu durum ürünlerin raf ömrünün kısalmasına ve iç piyasada tüketilememesine neden olmakta ve bunlara bağlı olarak narenciye üreticisi zarara uğramakta ve rekabet edememektedir [4, 45].

Türkiye, meyve üretimine, ihracatına ve ithalatına yön verir durumdaki, AMS'nin gelişmesi, yayılması ve zarara neden olması için uygun koşullara sahip bir ülkedir. Başta Akdeniz'e kıyısının olmasının yanı sıra uygun iklim koşulları ve yaşamını sürdürebilmesi için gerekli alternatif konukçuların bulunması bunlar arasında sayılabilir. Nitekim Carey'e [46] göre AMS'nin gelişebilmesi ve yaşamını sürdürebilmesinde iklim, coğrafik özellikler, tarımsal yapı ve demografik özelliklerin rol oynadığını belirtmiştir. Buna göre: (i) iklim, konakçıların gelişimi ve AMS'nin jenerasyon zamanı üzerinde etkilidir. Ayrıca düşük sıcaklıkların süresi ve şiddeti gibi mevsimler tarafından kontrol edilen kışlama söz konusu zararlıların hayat döngüsü üzerinde etkilidir. (ii) Coğrafik özellikler, zararlıların bulunduğu bölgedeki dağ veya çöl gibi izolasyon bariyerleri yayılımında etkilidir. (iii) Diğer ürünler için kullanılan pestisit gibi konak meyveyi etkileyebilecek faktörler tarımsal yapı olarak ifade edilir ki, bu durum AMS'nin yaşam koşullarını belirler. (iv) Diğer yandan insan merkezli olarak konakçı meyvelerin üretiminin ve/veya ticaretinin yapılması nedeniyle AMS'nin yaşamsal faaliyetleri üzerinde ve yayılmasında doğrudan etkilidir.

AMS'nin Türkiye'deki yayılışı, Rusya'nın karantina listesindeki zararlıların ifade edildiği Tarım Bakanlığı internet sitesindeki verilere göre, Adana, Aydın, Antalya, Balıkesir, Çanakkale, Hatay, İzmir, Mersin, Muğla, Osmaniye, Burdur olarak belirtilmektedir [47]. Diğer yandan Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü tarafından yayınlanan '2013 yılı Bitki Sağlığı ve Karantina Program ve Prensipleri' kitabında "Marmara Bölgesinden taze meyve ihracatının sağlanabilmesi amacıyla Akdeniz Meyve Sineğinin bu bölgede kışı geçirip geçirmediğinin belirlenmesine yönelik çalışma yapılmasına karar verilmiştir." ibaresi bulunmaktadır [48]. Bununla birlikte İleri [49] tarafından AMS'nin ana konukçusu durumundaki turuncgillerin ve diğer bazı meyvelerin yetiştirilebildiği Karadeniz bölgesindeki iklim koşulları (yağış miktarı vb) nedeniyle bu zararlıların gelişemediği belirtilmiştir. Buna göre AMS'nin Türkiye'de Akdeniz ve Ege bölgelerinde yayılış gösterdiği görülmektedir (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Akdeniz meyve sineğinin Türkiye’deki yayılımı [47].

1.3. AMS ile Mücadele

1.3.1. Kültürel ve Fiziksel Yöntemler

Kültürel yöntemlerde prensip olarak ürün güvenliğinin sağlanması amaçlanmaktadır. Bu kapsamda zararın en aza indirilmesi için AMS konağı olan meyve ağaçlarının bir araya dikilmemesi veya bu meyve bahçelerinin yakın olmaması gerekmektedir. Diğer yandan AMS konakçısı durumundaki meyveler olgunluğa ulaştıkları anda gecikmeden toplanarak söz konusu zararlının besin kaynakları azaltılabilir. Ağaçtaki vuruklu ve yere dökülmüş enfekteli meyveler toplanarak ½-1 metre çukurlara gömülerek imhası, AMS popülasyon sayısının azaltılması için önemlidir. Ayrıca kış sonu ilkbahar başında toprak işlenerek pupalardan ergin çıkışları engellenebilir. Bunların yanı sıra cezbedici besin içerikli yapışkan tuzakların hem meyve bahçelerindeki AMS oranının belirlenmesi hem de mücadelesinde kullanılmaktadır [4, 5, 36, 50]. Ayrıca pupadan çıkan erginler seksüel olgunluğa ulaşmadan önce besine ihtiyaç duyarlar. Bu durumda yarılmış meyveleri, yaprak bitlerinin ürettiği ballı maddeleri, hayvansal dışkıları (tavuk, kuş vb.), bazı bitkilerin çiçeklerindeki ve gövdelerindeki sıvıları besin kaynağı olarak kullanabileceklerinden; bunlara yönelik önlemler de alınarak popülasyon sayısı azaltılabilir [51].

1.3.2. Kimyasal Yöntemler

“Akdeniz meyve sineği ile kimyasal savaşta, erginlerin eşeysel olgunluğa erişebilmesi için doğadan bir protein kaynağı gibi ek besine ihtiyaç duymaları özelliğinden yararlanılmaktadır” [4]. Bu amaçla çeşitli insektisitlerin (malathion 25 WP gibi) cezbediciler (Ziray gibi) ile karıştırılarak elde edilen zehirli yemler kullanılmaktadır [5, 52]. AMS ile mücadelede kimyasal insektisitler ergin, yumurta ve larva evrelerinde; yemlere karıştırılarak hava ve zemine uygulanması, fumigasyon ya da toprağa direkt uygulama şeklinde gerçekleştirilmektedir [26].

1.3.3. Biyolojik Mücadele

AMS ile biyolojik mücadelede çoğunlukla doğal düşmanları ve parazitoidleri kullanarak gerçekleştirilebildiği gibi son yıllarda yapılan çalışmalarda bakterilerinde kullanılabileceği belirtilmektedir. Bu amaçla özellikle Hymenoptera takımından Braconidae, Chalcididae, Diapriidae, Eulophidae, Eupelmidae, Eurytomidae, Figitidae (Eucoilinae), Ichneumonidae, ve Pteromalidae familyalarının bazı üyeleri kullanılmaktadır. Bu parazitoidlerin hemen hemen hepsi gelişimleri için meyveler içindeki konakçıların yumurta veya larvalarını kullanırlar [53].

Biyolojik mücadele kapsamında bakterilerin özellikle de simbiyotik ve endosimbiyotik bakterilerin kullanılabileceğine yönelik çalışmalar dikkat çekicidir. AMS'nin de aralarında bulunduğu pek çok zararlı ile mücadelede bakteriler, direkt olarak kullanılabildiği gibi [12] entegre mücadele kapsamında metodun bir parçası olarak da [11] kullanılmaktadır. Zararlı böceklerle karşı kullanılan biyolojik tabanlı entegre mücadele yöntemlerinden biri de kısır böcek tekniği (KBT) (sterile insect technique, SIT) dir [7, 54].

1.4. Zararlılarla ile Mücadelede Kısır Böcek Tekniği (KBT)

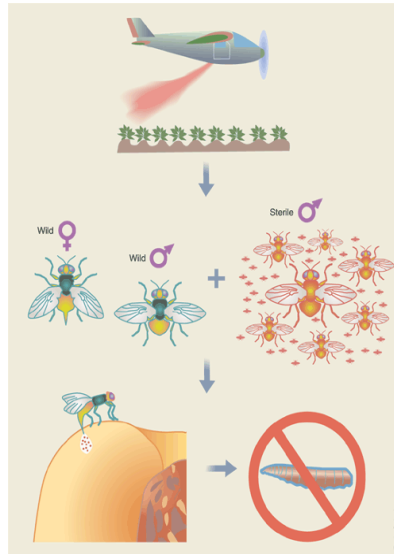
Kısır böcek tekniği (KBT) (Steril insect technique, SIT) ilk olarak Amerikalı entomolog Edward F. Knipling tarafından önerilen ve Uluslararası Atom Enerjisi Kurumu (IAEA) ile Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı (FAO) tarafından da desteklenen zirai zararlılarla mücadele teknolojisi olarak ifade edilmektedir [38, 55]. KBT genel olarak spesifik hedefli, zararlı etkileri olmayan ve biyolojik tabanlı metotlardan oluşan

multidisipliner mücadele yöntemidir [7]. KBT klasik mücadele yöntemlerine özellikle de kimyasal mücadele yöntemine alternatif çevre dostu mücadele yöntemi olarak görülmektedir. Öyle ki, araştırmacılar zararlılarla mücadelede en çok tercih edilen kimyasal mücadele yöntemlerinin çevre kirliliğine neden olduğunu, zararlıların kullanılan insektisitlere karşı zamanla direnç kazandığını ve buna bağlı olarak geliştirilen/geliştirilecek yeni kimyasal insektisitlerin fiyatlarının arttırması gibi problemlere neden olduğunu vurgulamaktadır [54].

KBT kitle halinde üretilen ve kısırlaştırılmış böceğin doğal fertil (kısır olmayan, verimli) partnerleri ile çiftleşmesini azaltmak ya da çiftleşme sonrasında yeni bireylerin çıkışını önlemek amacıyla salınması prensibine dayanmaktadır [56]. Diğer bir deyişle KBT, genetik kontrol metodu olarak adlandırılmaktadır ve ekonomik düzeyde zarara neden olan türlerin baskılanması için kullanılabilmektedir [55]. KBT'nin temelinde ise erkek bireylerin kitle halinde üretilmesi, çeşitli yöntemlerle steril edilmesi (kısırlaştırılması) ve hedeflenen alana dişilerle çiftleşmesi için salınması esasına dayanmaktadır. Dişi steril bir erkekle çiftleştiğinde döllenme gerçekleşmediğinden dişi yeni bir nesil için yumurta bırakamayacağı gibi; bıraksa dahi bu yumurtalardan çıkan larvalar gelişmez ya da yaşayamaz ve bundan dolayı salımdan sonraki zararlı sayısı azaltılmış olur [57].

KBT programı ile zararlı tamamen doğada yok edilmemektedir. Genel olarak KBT ile zararlının eşeysel sterilizasyonu gerçekleştirilmektedir. Diğer bir deyişle bireylerin gamet oluşturmalarını engelleyecek bir yaklaşım dahilinde dominant öldürücü mutasyonların transferi ile zararlının yaşam döngüsünün ilk evrelerinde (pupa aşamasında) kısır böcek elde edilmesi amaçlanmaktadır [55, 59].

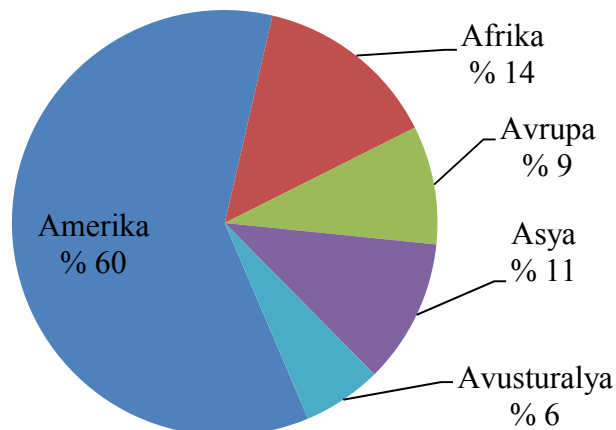
KBT diğer biyolojik tabanlı metotlardan farklı olarak bazı avantajları bulunmaktadır. Bunlar, türe özgüdür, farklı çevresel koşullarda egzotik ajanlar salınamaz ve salınan organizmalarda yarı replikasyon olmadığından popülasyonların genetik materyallerine yeni genetik materyal girişi gerçekleşmez. Diğer yandan kitle üretimi ve bunların salıverilmesi durumunda etkilidir (Şekil 1.10) ve steril erkekler spermlerinde taşıdıkları baskın öldürücü mutasyonları hedef popülasyonun dişilerinin çoğunluğuna başarıyla transfer edebilmektedirler [55, 59].



Şekil 1.10. Kısır böcek tekniğinin uygulaması ve etkileri [55].

KBT'nin geliştirilmesi için yeni stratejiler ile daha fazla ve çeşitte zararlıyla mücadelede kullanılabilmesi amaçlanmaktadır. Bunun için genetik mühendisliğindeki ilerlemelerden faydalanılmaktadır. Öyle ki AMS'nin de aralarında bulunduğu çoğu zararlıya yönelik gerçekleştirilen KBT uygulamalarda hedefteki zararlıya ilişkin bazı noktaların iyi analiz edilmesi gereklidir. Bunlar arasında salınan seril erkekler için lek (kur yapma) davranışı ve doğal dişileri cezbetme, dölleme ve erkeklerden gelen davranışsal cevabın aydınlatılması sayılabilir [55, 59].

Etkinliği, sonuçları ve çevre dostu olması gibi nedenlerden dolayı KBT'nin *C. capitata* [57, 59, 60] gibi zararlılara karşı kullanılabileceğine yönelik çalışmalar yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir. Hali hazırda dünyadaki kısır böcek kitle üretim oranları Şekil 1.11'de verilmiştir.



Şekil 1.11. Dünyada kısır böcek kitle üretim miktarları [58].

KBT'nin birçok avantajının yanı sıra uygulanacak yöntemlerin bireylerin doğadaki davranışlarına etkisinin, zararlının biyolojisine uygun yöntemlerden oluşması ve etkinliğinin artırılması gibi bazı noktalara dikkat edilmesi gereken yöntemdir. KBT kapsamında elde edilen işlem görmüş bireyler toplu halde zararlı ile mücadele edilecek alana salınırlar. Ancak kısır erkler salındıkları alanda doğal (kısır olmayan) erkeklerle, çiftleşme için toplanma-çiftleşme davranışı (lek) sırasında, rekabet edememe gibi dezavantajları vardır. Bu durumda, entegre mücadele kapsamında, KBT'nin etkinliğinin artırılmasında söz konusu böceklerin salınmadan önce protein ağırlıklı olarak beslenmesi [61, 62], juvenil hormon uygulaması [63], probiyotik besinler verilmesi [64], aromaterapi [65, 66] ve bağırsak florasındaki bakterilerin [57] kullanılabileceği belirtilmektedir.

KBT'nde en önemli noktalardan biri bireylerin kısırlaştırılması (sterilizasyonu) veya verimsizleştirilmesi için hedeflenen zararlının biyolojisine uygun yöntem(lerin) geliştirilmesi ve uygulanabilmesidir. Buna yönelik olarak radyoaktif yöntemler, sıcaklık uygulaması ve bazı antibiyotiklerin kullanılması gibi yöntemlerin kullanıldığı ya da kullanılabileceği önerilmektedir [57, 59, 60]. Bunların yanı sıra doğal olarak benzer etkiyi sergileyebilen bakteriyal endosimbiontların ya da KBT etkinliğini arttırmaya yönelik olarak AMS sindirim sistemi bağırsak bakterisinin de kullanılabileceği vurgulanmaktadır [57].

AMS'ne yönelik olarak gerçekleştirilen sıcaklığa dayalı uygulamalarda bireylerin cinsiyet belirleyen kromozomları hedef alınmaktadır. Burada klasik genetik cinsiyet ırkları (Genetic Sexing Strain, GSS) kullanılır. Sıcaklığa duyarlı öldürücü genler (temperature-sensitive lethal (*tsl*) gene) (allel) dişilerde çekinik, erkeklerde ise transfer edilen alleller Y-kromozomunda korunmuş durumdadır. Bu durumdan faydalanılarak, bireyler sıcaklığa maruz bırakıldığında dişi GSS embriyoların öldüğü, kalan erkek bireylerin kısır olduğu belirtilmektedir [59]. Ancak bu KBT yönteminin, AMS'de kullanımının ucuz ve etkili olduğu belirtilmekle beraber sürecin uzun sürmesi, verimliliği azaltma, biyolojisini olumsuz etkileme ve elde edilen kromozomların diğer bireylere transfer edilebilmesi gibi problemlerinin olduğu da belirtilmektedir [67, 68].

Diğer bir uygulama ise tetrasiklin antibiyotiği ile transgenik cinsiyet ırkları (transgenic sexing strain, TSS) kullanılmasıdır. Burada AMS'de geç baskın öldürücülük larva ve

pupa aşamasında dişiler üzerinde ortaya çıkmaktadır. Erken embriyo ölümü şeklindeki bu yaklaşımda, sadece dişilerde bulunan pro-apoptotik geni (*hid^{Ala5}*) ektopik mRNA translasyonunu engellemek için kullanılmaktadır. Bu öldürücü efektör gen erken hücre oluşum safhasında promotorlar/enhancerların kontrolü altındaki transaktivatör genini (tTA) tetrasiklin varlığında tersinir olarak baskılar. Cinsiyete özel splay (intronların çıkarılıp ekzonların birleştirilmesi) sırasında AMS’de transgenik cinsiyet sistemi erken safhada (geç larva dönemi ve pupa döneminde cinsiyet ile ilgili hücrelerde) oluşturulabilmektedir [60].

Artropodlarda simbiyotik olarak yaşamlarını sürdüren çeşitli bakterilerde KBT kapsamında kullanılabilmektedir. Primer ve sekonder simbiyotik bakteriler olarak adlandırılan bu bakteriler, simbiyontu olduğu bireyin (konakçısının) biyolojisi ve/veya üremesi üzerinde manipülasyona neden olurlar [69, 70].

1.4.1. Kısır Böcek Tekniği Kapsamında Simbiyotik Bakterilerin Önemi ve Kullanımı

Simbiyotik mikroorganizmalar konakçısı oldukları arthropodların evrimi, ekolojisi ve biyoloji üzerinde kritik rol oynar. Artropodlardaki simbiyotik bakterilerin bir kısmı primer simbiyontlar olarak gruplandırılırlar ve konakçılarına besin sağlama, doğal düşmanlarına karşı koruma, stres direncini arttırmak ve uygun bitki seçimi gibi bazı avantajlar sunmaktadır [71-73].

Artropodlarda primer simbiyontlar genel olarak sindirim sisteminde bulunurlar ve konakçının beslenmesi ve beslenme rejimi başta olmak üzere artropodun yaşamasını sürdürebilmesi için gerekli mikroorganizmalardır. Buradan hareketle aralarında AMS’nin de bulunduğu zararlılar ile mücadele ve/veya mücadele etkinliğini arttırmak amacıyla primer bakteriyal floranın belirlenmesine yönelik çalışmalar bulunmaktadır [10-12, 57, 74].

AMS’nin sindirim sistemindeki primer bakteriyal florasının belirlenmesine yönelik çalışmalar sonucunda *Pectobacterium spp.*, *Pantoea dispersa*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter spp.* gibi bakterilerin bulunduğu ifade edilmektedir. Bunlardan özellikle *Pectobacterium spp.*, *P. dispersa*, *K. oxytoca*, *C. freundii*’nin AMS’in gelişimi için ana rol oynadığı vurgulanmaktadır [57, 74].

Meyvelerdeki özellikle de turuncgillerdeki yüksek pektini (kabukta daha fazla) sindirebilecek/parçalayabilecek pektinaz enzimine sahip olmayan AMS'nin bunu sağlayabilen ya da pektinaz enzimine sahip *K. oxytoca* ve *Pectobacterium* bakterilerine ihtiyacı oldukça fazladır. Ayrıca bu bakterin metabolik faaliyetleri sonucu ortaya çıkan metabolitlerin böcek tarafından kullanımı ile de erkeklerin çiftleşme kapasitelerinin ve dolayısıyla da popülasyonun birey sayısında bir atışa neden olduğu da belirtilmektedir [74].

Artropodlarda simbiyotik olarak yaşayan sekonder simbiyontlar ise konak popülasyonda yayılarak konakçı böceğin üreme davranışını kendi lehine manipule etmektedir. Böylece konakçısının popülasyondaki birey sayısına ve/veya cinsiyet oranına etki etmektedir [73, 75].

Artropodlardaki sekonder simbiyotik bakteriler ile ilgili yapılan araştırmalar ışığında elde edilen bilgiler ve yaklaşımlardan hareketle; bu bakterilerin zararlılarla (özellikle de AMS gibi küresel çapta yayılışa sahip) mücadelede KBT kapsamında ya da KBT'nin etkinliğinin artırılması için kullanımına yönelik umut vaat eden yenilikçi çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Bu yaklaşımlarda primer simbiyontlar genelde probiyotik şeklinde kullanımı üzerinde durulurken, sekonder simbiyontların ise direkt mücadele şeklinde kullanımı amaçlanmaktadır [10, 73-77].

1.4.2. Kısır Böcek Tekniğinde Kullanılan Sekonder Simbiyotik Bakteriler

Sekonder simbiyotik bakteriler dikey (vertikal) transfer ile anneden yavrulara (larvalara) aktarılabildiği gibi, yatay (vertikal) transfer yoluyla da bireyler arasında veya farklı taksonlar arasında aktarılabilir [77, 78].

Sekonder simbiyotik bakterilerin en önemli özellikleri, konakçı üreme sistemi ve davranışı üzerindeki manipülasyonlar ile konağın cinsiyet belirleme sürecine etki etmeleridir. Bu etki sonucunda popülasyon cinsiyet oranında değişikliğe, genetik popülasyon yapısına, üreme izolasyonuna, cinsel özelliklerin gelişimine ve hatta türleşmeye neden olmaktadır [73, 79-81].

Üreme sistemi ve davranışı üzerinde etkili olan sekonder simbiyotik bakteriler özellikle popülasyon cinsiyet oranındaki etkileri nedeni ile zararlılarla mücadele için

kullanılabilmektedir. Söz konusu bakteriler konukçularının üreme davranışına temel olarak 5 şekilde etki eder. Bunlar, *i)* sitoplazmik uyumsuzluk, *ii)* feminizasyonu teşvik, *iii)* partenogenezisi teşvik, *iv)* erkek öldürücülüktür [77, 82-86].

Sitoplazmik uyumsuzluk temelde bakterilerin etkisi ile sperm ve yumurta arasındaki uyumsuzluk sonucu ortaya çıkan durum olarak tanımlanmaktadır. Bu etki bazı böcek türlerinde intrasellüler (hücre içi) simbiyont/parazit olarak bulunan bazı bakteriler nedeniyle gamet hücrelerindeki değişiklikten kaynaklanmaktadır. Sitoplazmik uyumsuzluk (bu etkiye sahip bakterilerce) enfekteli bir erkek ile enfektesiz bir dişinin çiftleşmesi durumunda ortaya çıkmaktadır. Ancak bunun tersi bir durumda, yani enfekteli erkek ile enfekteli bir dişinin çiftleşmesi durumunda sitoplazmik uyumsuzluk etkisi gerçekleşmemektedir. Aynı şekilde enfektesiz bir erkek ile enfekteli bir dişi çiftleştiğinde de bu etki görülmemektedir [75, 87-89].

Endosimbiyotik bakterilerin etkisiyle ortaya çıkan ve embriyonik dönemde cinsiyet belirlenme aşamasında genetik erkeklerin fonksiyonel fenotipik dişilere dönüşmesiyle sonuçlanan durum ise feminizasyonu teşvik olarak adlandırılır. Genelde maternal olarak (anne yoluyla) kalıtılan sekonder simbiyotik bakterilerin etkisi ile ortaya çıkan bu durum İzopod [90] ve Lepidoptera'da [91, 92] tespit edilmiştir. Temelinde ise sitoplazma yoluyla kalıtılan bu bakterilerin cinsiyet belirleme sürecine etki etmeleri ve/veya bunlar tarafından üretilen erkeklik (androgenic) hormonu üretimini engellemeleri bulunmaktadır [77, 89, 93].

Artropodlarda genel olarak dişilerin çiftleşmeden yumurta vermesi ve bu yumurtalardan çıkan bireylerin dişi olması partenogenezis olarak adlandırılır. Partenogenezis doğal ya da maternal olarak kalıtılan bakteriyel bir enfeksiyon sonucu da ortaya çıkabilir. Burada haplodiploid olarak bilinen ve normalde döllenmiş yumurtalardan diploid dişi, döllenmemiş yumurtalardan ise haploid erkek bireyler gelişir. Benzer şekilde üreme paraziti olan bir bakteri de cinsiyet belirleme sürecine etki ederek döllenmemiş yumurtalardan dişilerin gelişimini sağlar. Söz konusu durum embriyonik süreçte mayozun tamamen baskılanması ile gerçekleşebildiği gibi mayoz sonrasındaki bir etki ile de gerçekleşebilir Sitoplazma yoluyla kalıtılan ve partenogenezisi teşvik eden bakteriler Thysanoptera, Hymenoptera gibi böcek takımlarında ve akarlarda tespit edilmiştir. [77, 89, 93-95].

Maternal olarak kalıtılan bakterilerin etkisi ile genetik erkeklerin ölümü olarak adlandırılan erkek öldürücülük (male killing) ise Diptera [96], Coleoptera [97] ve Arachnida'da [98] tespit edilmiştir. Bu etkiye neden olan bakteriler konakçısına bazı avantajlar sağladığı belirtilmektedir. Örneğin sınırlı besin koşullarında bu bakterilerce enfekteli dişilerin daha fazla beslenmesi (erkek bireyler öldüğü için) sağlanır ve dolayısıyla yayılışını artırır [99, 100].

Arthropodların üreme davranışları üzerinde etki eden bakterilerden en iyi bilineni *Wolbachia* olmakla birlikte benzer etkileri *Arshenophonus Cardinium*, *Hamiltonella*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma*'da göstermektedir.

1.4.2.1. *Wolbachia*

Wolbachia ilk olarak sivrisinek (*Culex pipientis*) üreme dokularında Hertig ve Wolbach [101] tarafından tespit edilmiştir. Rickettsiaceae familyasının üyesi olan *Wolbachia*, gram negatif bir bakteridir. Kokobasil/basil şeklinde, iki membranlı bir hücre şekline sahiptir ve 0.8-1.5 µm uzunluğundadır. *Wolbachia* zorunlu hücre içi paraziti olup sitoplazmik olarak bir sonraki nesle aktarılır. Aktarımı dikey yönlü olabildiği gibi yatay olarak da farklı taksonlar arasına gerçekleşebilmektedir [77]. Genel olarak konakçılarının üreme dokularında bulunmakla birlikte beyin, kas gibi somatik dokularında da bulunmaktadır [102].

Yapılan araştırmalara göre *Wolbachia* böcek türlerinin % 20'sinden fazlasında bulunmaktadır [70]. Dolayısıyla da, konakçısı oldukları artropodların sayısı ve yayılışı göz önüne alındığında *Wolbachia* dünyadaki en yaygın bakteri olarak nitelendirilmektedir [77].

Wolbachia sitoplazmik uyumsuzluk, partenogenezisi teşvik ve genetik erkeklerin feminizasyonu gibi etkilerle konakçılarının üreme şekillerinde değişime neden olduğu belirtilmektedir. Bu durum ya konakçı popülasyonundaki birey sayısına ya da cinsiyet oranları üzerinde etkili olur ve doğada dişi birey sayısının artmasına neden olur. Konak üremesindeki bu modifikasyon ile bakteri yayılışını arttıracak şekilde kendine bir avantaj sağlamaktadır [77].

1.4.2.2. *Cardinium*

Cardinium *Encarsia* cinsi parazitoid arılarda partenogenezisi teşvik [85], *Brevipalpus phoenicis* akarında feminizasyon [84], *Encarsia pergandiella* arısında sitoplazmik uyumsuzluk [103] şeklinde konakçısının üreme davranışı üzerinde etkili olan ve cinsiyet oranı bozucu bakterilerdendir [84, 85, 104].

16S rDNA genleri ile gerçekleştirilen analizler, *Cardinium*'u *Bacteroidetes* grubuna (Cytophaga–Flexibacter–Bacteroides, CFB) yerleştirmiştir [85]. Ancak *Cardinium* CFB grubu altında yer almakla birlikte şuanda bilinen CFB'lerden filogenetik olarak farklıdır. Dolayısıyla Cytofaga benzeri organizmalar (*Cytophaga*-like organisms, CLO) olarak adlandırılmaktadır [69, 105, 106]. Diğer yandan Zchori-Fein et al. [14] tarafından 'Candidatus *Cardinium*' (*Cardinium*) cinsinde sınıflandırılabilceği önerilmiştir.

Simbiyotik yaşama adapte olan *Cardinium*, özellikle arthropod hücrelerinde intrasellular olarak bulunur, klasik mikrobiyolojik yöntemlerle kültüre alınamamaktadır. Çubuk ve dairesel şekilli olan *Cardinium* 0.3-2.1 µm boyutlarındadır. Morfolojik analizler bakterinin bir hücre duvarı ve plazma membranı olmak üzere iki katmanlı bir yapıdadır [14, 107, 108].

Cardinium hem partenogenezis gibi erkek bireylerin fonksiyonelliği üzerine etki ederek hem de feminizasyon ile dişi sayısını arttıracak şekilde konakçısının biyolojisini kendi lehine değiştirmektedir. Bu suretle bakteri aktararak kendi yayılımını sağlamaktadır [109].

Hymenoptera (Zar kanatlılar), Hemiptera (Yarım kanatlılar), Diptera (Çift kanatlılar, Sinekler) , Protura (Duyarga bacaklılar), Acari (Akarlar) ve Araneae (Örümcekler) olmak üzere arthropodların yaklaşık olarak % 6-7'si *Cardinium* ile enfektelidir. Diğer taraftan nematodlarda da bulunmaktadır [73].

Cardinium hertigii cEper1 genom sekansı hem genom büyüklüğü hem de metabolik yolları bakımından oldukça büyüktür. *Cardinium* ökaryotik hücre döngüsüne müdahale edebilen bir protein setini kodlar. Bu proteinler sitoplazmik uyumsuzluk için iyi bir gösterge olarak görülmektedir. Bunun yanı sıra, biyotin sentezini gerçekleştirebilen

bölgelere sahip olmasından dolayı konağın beslenmesinde de rol oynayabileceği düşüncesi vurgulanmaktadır [73].

1.4.2.3. *Rickettsia*

İnsanda da çeşitli hastalıklara neden olan *Rickettsia* cinsine dahil bazı türler omurgalı ve omurgasız canlılarda parazit olarak bulunan zorunlu hücre içi bakterisidir. Hatta bitkilerin ksilem ve floem gibi iletim demetlerinde de bulunmaktadır. Ancak *Rickettsia* konakçısı dışında, konakçısından bağımsız, kültüre alınamaz ve dolayısıyla tanımlanması moleküler temelli yöntemlerle gerçekleştirilir. *Rickettsia* türlerinin bazıları sadece artropodlarla ilişkilidir ve bunlar bulundukları konakçıda erkek bireylerin ölümüne neden olurlar [83, 110]. Bu özellik ilk olarak Weren et al., [111] tarafından ‘uğur böceğinde’ (ladybird beetle) *Adalia bipunctata* (Coleoptera:Coccinellidae) belirtilmiştir.

1.4.2.4. *Spiroplasma*

‘Mollicut’ olarak adlandırılan hücre duvarı olmayan, gram pozitif ve spiral şekilli bakterilerdir. Genel olarak böceklerde ve bitkilerde enfeksiyona neden olan *Spiroplasma*’nın farklı grupları (clade) bulunmaktadır. Konakçısının evrimsel sürecine etki etmesi, beslenmesine pozitif yönde katkı sağlaması ve aynı anabolik yolları kullanması *Spiroplasma*’nın bazı özelliklerindendir. Bir diğer özelliği ise artropodlarda yumurta yoluyla kalıtılması ve erken gelişim sürecinde erkek öldürücülük (male killing) şeklinde cinsiyet belirlenme sürecini değiştirebilecek şekilde hareket etmesidir [79, 83, 112, 113].

Spiroplasma enfeksiyonu sonucu erkek öldürücülük şeklinde ortaya çıkan simbiyotik yaşam şekli *Danaus chrysippus* [79], *Coleomegilla maculata* [113], *Adalia bipunctata* [114] ve *Drosophila* [115, 116] gibi artropodlarda tespit edilmiştir. Bunlardan erkek öldürücü şeklinde konakçısı olduğu artropodlarda fenotipe etki eden iki *Spiroplasma* türü bulunmaktadır; bunlar *S. ixodetis* ve *S. poulsonii*’dir [23, 83]. Diğer yandan artropodlarda erkek öldürücülük şeklinde etki eden bazı simbiyontların konakçısının direnç mekanizmasında rol oynadığı [117] ve bazı *Spiroplasma*’ların ise yine artropodlarda simbiyotik olarak bulunduğu ancak erkek öldürücü etkisinin bulunmadığı da [116] belirtilmektedir.

1.4.2.5. *Arsenophonus*

Arshenophonus ilk olarak Skinner [118] tarafından *Nasonia vitripennis* arısında tespit edildiğinden *Arshenophonus nasonia* olarak adlandırılmış ve cins olarak sistematikteki yerini almıştır [119].

Konukçusu ile arasındaki simbiyotik özellik değişkenlik göstermektedir. Başka bir deyişle her konukçuda aynı şekilde bir birliktelik söz konusu olmayıp; bu ilişki fakültatif, zorunlu, parazit ve yararlanma şeklinde değişebilmektedir. *A. nasoniae* oldukça büyük bir genoma sahip olup en önemli özelliği ise maternal, anne yoluyla, olarak kalıtılması ve erkek embriyoların ölümüne neden olarak popülasyonda cinsiyet oranına etki etmesidir [86, 120, 121].

Arshenophonus enfeksiyonunun belirlendiği çalışmada, Skinner [118] *N. vitripennis* dişilerinde *Arshenophonus* enfeksiyonunun yaklaşık % 5’inde olmasına rağmen bu dişilerin yumurtalarından çıkan erkeklerin % 80’inin öldüğünü belirtmiştir. Bundan dolayı *Arshenophonus* enfeksiyonunu, ‘oğul öldürücü’ (son killer) olarak tanımlamıştır.

Arshenophonus’un artropodlardaki yayılımı ise oldukça fazladır ki, kalıtılan simbiyolar için kullanılan bir ifade olan, büyük dördü (big four)’den biri olarak kabul edilir ve böcek türlerinin yaklaşık olarak % 5’inde bulunur. Bunlar örümceklerin (Arachnida), kenelerin (Ixodida), sineklerin (Diptera), yarım kanatlıların (Hemiptera), zar kanatlıların (Hymenoptera), sinir kanatlıların (Neuroptera) hamam böceklerinin (Blattodea) ve kın kanatlıların (Coleoptera) bazı üyeleri konakçılarıdır [86].

1.4.2.6. *Hamiltonella*

Bilinen türü *Hamiltonella defensa* olup gama-proteobakteri grubunun üyesidir. Şuana kadar yaprak bitleri, bitki pireleri ve beyazsineklerde tespit edilmiştir. Bilinen etkisi ise yaprak bitlerinde larva gelişimini bloke etmesidir. Ancak patojen ve parazitoidlere karşı ve bazı yaprak biti türlerinde ise çeşitli sıcaklık değerlerinde, konakçısının savunma mekanizmasında da rol oynamaktadır [122, 123].

H. defensa diğer endosimbiyontlardan farklı olarak laktatı piruvata ve asetatı asetil-CoA ya fermente edebilmektedir. Bu metabolik yetenekleri ile oksijenin sınırlı olduğu

koşullarda yaşayabilir. Diğer yandan aktif transport mekanizmaları için gerekli çeşitli amino asitleri, vitaminleri sentezleyebilmektedir. Bunlar bakteri açısından önemli olduğu kadar konukçusu açısından da önemlidir. Özellikle de karbon, azot ve oksijenin sınırlı olduğu durumlarda ya da bu fonksiyonlardan herhangi birine sahip olmayan konakçısı için son derece önemli görülmektedir [122].

2. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Akdeniz Meyve Sineği Kültürü için Gerekenlerin Oluşturulması

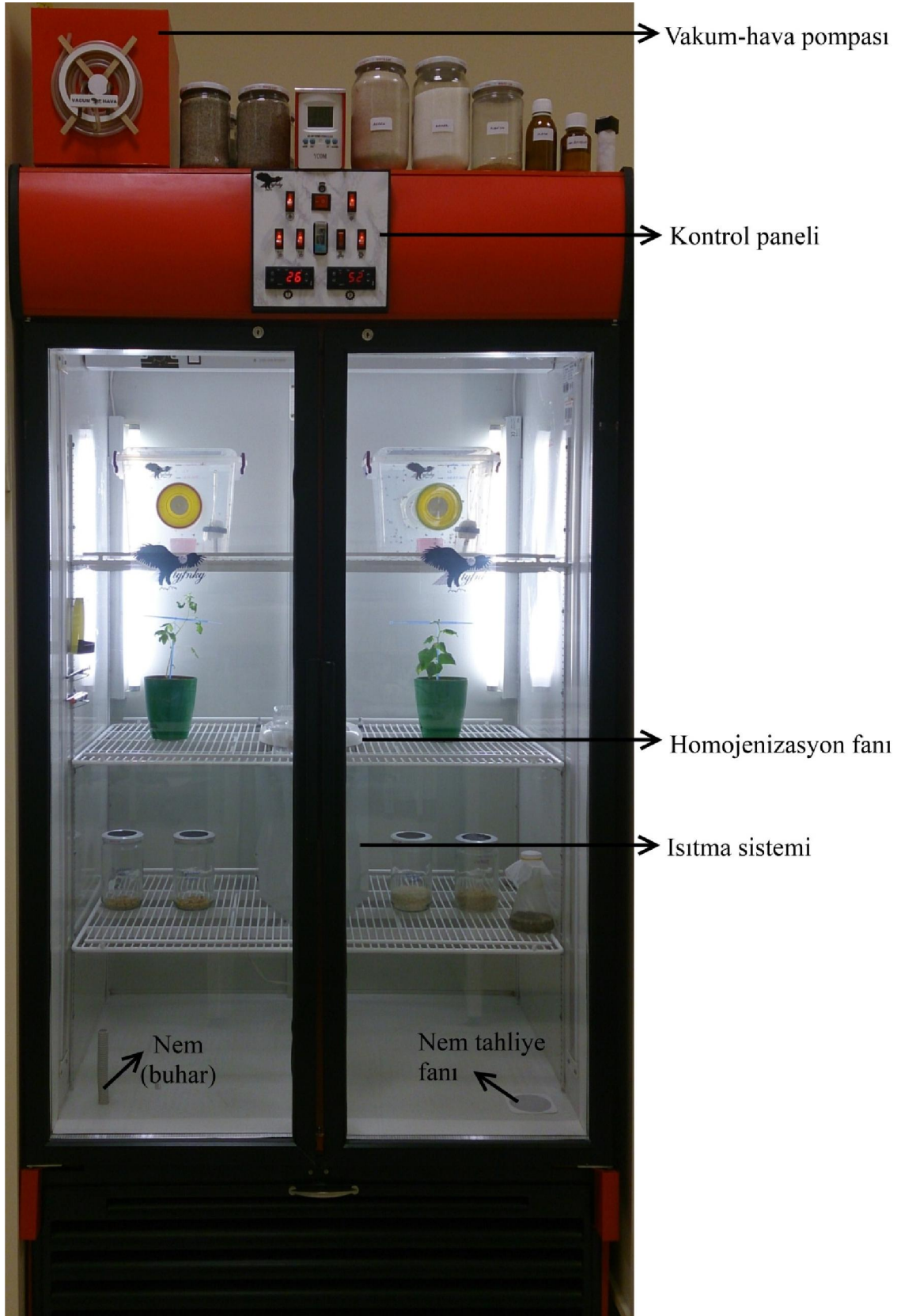
2.1.1. Yetiştirme Kabini (İnsektaryum)

AMS gelişimi tamamen sıcaklık, nem ve ışık gibi çevresel koşullar tarafından kontrol edilmektedir. Dolayısıyla AMS kültürünün oluşturulabilmesi ve sürdürülebilmesi için doğadaki yaşam koşullarına benzer kontrollü bir ortama ihtiyaç duyulmuştur. Burada AMS'nin doğadaki gelişim evreleri dikkate alınarak hareket edilmiştir. Nitekim AMS erginlerinin optimum gelişimleri için 25°C sıcaklığa, % 60 nispi neme ve gün ışığına ihtiyaç duyarken, AMS larvaları doğada meyve içerisinde geliştiğinden nispeten daha az ışıklı bir ortama ihtiyaç duymaktadır. Bu tarz bir düzeneğin izolasyonlu yetiştirme kabini (insektaryum) ile sağlanabileceğinden insektaryum tasarlanmıştır. Bunun için modifiye edilen bir buzdolabı kullanılmıştır.

Buzdolabı, ortam sıcaklığının artması ve/veya düşmesine karşı kendinden izolasyonlu bir kabin olması, sıcaklık yükselmesi durumunda soğutma sisteminin kullanılması ve maliyeti gibi faktörler dikkate alınarak seçilmiştir. Temin edilen kabinde dahili soğutma sisteminin bulunmasına karşın, soğutmanın gerektiğinde devreye girmesini sağlayacak kontrol mekanizmasının yanı sıra ısıtma, nem, fotoperiyot ve hava sirkülasyon düzenekleri bulunmadığından bu doğrultuda modifiye edilmiştir. Diğer bir değişle insektaryumlarda sıcaklık, nem ve ışık gibi parametrelerin anlık ve sürekli olarak kontrol edilebilir olması sağlanmıştır. Bunun için kabine sıcaklık regülasyonu için termostat, nem için higrostat, fotoperiyot için timer (zamanlayıcı) ve hava sirkülasyonu için bir fan ile bunların ara bileşenleri bağlanmıştır.

Soğutma sistemi için buzdolabının kendi soğutma sistemi, ısıtma için bir ısıtıcı kullanılmış ve bunların termostatlara bağlantıları sağlanmıştır. Kabin nem sağlamak için (sıcaklığı arttırmayacak şekilde) soğuk buhar oluşturmak amacıyla bir osilatör (atomizer) devresi ve su haznesi ile buhar sistemi kurulmuştur. Diğer taraftan kabinde oluşacak olan fazla nemin tahliyesi için bir fan düzeneği kurulmuştur. Ayrıca sürekli çalışan bir hava sirkülasyon fanı da takılarak, kabin içerisinde sıcaklık ve nem

dağılımının homojen bir şekilde olması sağlanmıştır. Işık miktarı, rengi (gün ışığı) ve aydınlatma bölgesi gibi parametreler göz önünde bulundurularak dolap bünyesindeki ışık sistemi kullanılmamıştır. Bunun yerine iki adet kısa (50 cm) gün ışığı (sıcak, sarı) flüoresan lamba monte edilmiş ve bunların bir zamanlayıcı ile bağlantıları yapılarak fotoperiyot sistemi oluşturulmuştur. Bütün bu bileşenlerinin (soğutma, ısıtma, nem, nem tahliyesi, homojenezasyon fanı ve foto-periyot) kontrol edebilmek ve istenilen bir özelliği devreden çıkarabilmek veya devreye sokabilmek için her birine ait anahtar bulunan bir kontrol paneli yapılarak insektaryum oluşturulmuştur. Ayrıca insektaryumdan bağımsız olarak çalışan; AMS kafeslerindeki ölü bireylerin alınması ve kafeslerin temizliği için bir buzdolabı motoru vakum-hava pompası şeklinde modifiye edilerek insektaryuma monte edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Akdeniz meyve sineği kültürü için kullanılan sıcaklık, nem ve ışık kontrollü insektaryum.

2.1.2. Kafes

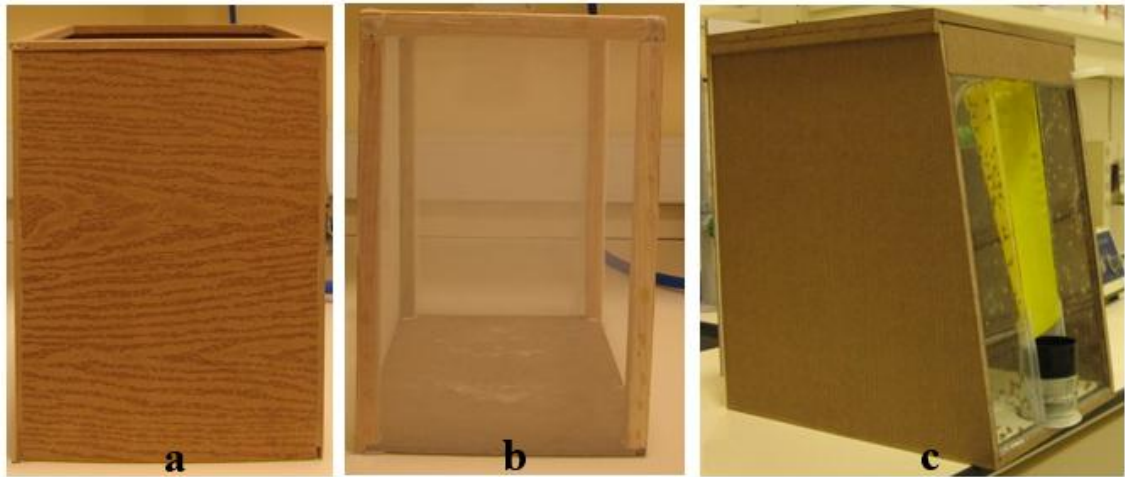
Çalışmalarda kullanmak üzere Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'na bağlı Bornova Zirai Mücadele Araştırma İstasyonu Müdürlüğü (İzmir)'den AMS pupası alınmıştır. Alınan pupalar yine Araştırma İstasyonu Müdürlüğü'nden alınan bilgiler doğrultusunda 30x30x30 cm (yükseklik x derinlik x en) ölçülerinde tabanı ve kenarları tahta, üst yüzeyi ise elek teli (gözenekleri yaklaşık 1x1 mm) gerilerek ahşap kafesler hazırlanmıştır (Şekil 2.1a). Ayrıca kafes içerisine (yumurta alabilmek için) üzerine delikler açılmış sarı renkli plastik kutular yerleştirilmiştir. Kültürün su ihtiyacı ıslak sünger ile sağlanırken, besin ihtiyacı ise kafes üzerine yerleştirilen kesme şeker ile karşılanmıştır. Temin edilen pupalar bu kafese yerleştirilerek yapılan insektaryumda kültüre alınmıştır. Ancak AMS kültürü süresince bu kafesin bazı açılardan (özellikle de bu çalışmanın bakterilerle yönelik olarak yürütüleceğinden) kullanışsız olduğu görülmüştür. Bunlar, *i)* sineklerin ışık alabildikleri üst yüzeye yöneldikleri ve dolayısıyla kafes içerisindeki ışık miktarının az olduğu; *ii)* bırakılan yumurta miktarının ve dolayısıyla da alınan yumurta miktarının az olduğu; *iii)* bırakılan yumurtaların alımı için kafese ve dolayısıyla da kültüre sürekli müdahale edilmesi gerektiği; *iv)* kültürün su ihtiyacını karşılamak için kafes içerisindeki süngerin sürekli ıslak tutulması gerektiğinden kafese ve kültüre günlük müdahale gerekmesi; *v)* ayrıca ıslak süngere sineklerin yapışarak ölmesi; *vi)* ve en önemlisi sineklerin dışkıları nedeniyle kafesin kültür süresince temizliğinin büyük zorluklar içermesi nedeniyle kafeslerde küflenme olmasıdır. Bu nedenle elde edilen AMS kültürü kullanılarak alternatif ve kullanışlı kafes modelleri denenmiştir.

AMS kültürü için kullanılabilecek kafeslere yönelik yeterince kaynak verisine ulaşılamaması nedeniyle en azından kafeslerdeki ışık sorununun çözülmesi hedeflenmiş ve Zümreoğlu [124] tarafından AMS kültürleri için kullanılabileceği önerilen kafes yapılmıştır. Bu kafes bir öncekinden farklı olarak 30x30x30 cm (yükseklik x derinlik x en) ölçülerinde tabanı tahta, diğer yüzeyleri ise tül (gözenekleri 1x1 mm) gerilerek hazırlanmıştır (Şekil 2.1b). Kültürün su ihtiyacı aynı şekilde ıslatılan bir süngerle, beslemesi ise küp şekerlerle sağlanmıştır. Yumurtalarda aynı şekilde kafese yerleştirilen içerisinde nemli bir pamuk bulunan ve üzerine delikler açılan sarı bir kutu aracılığıyla alınmaya çalışılmıştır. Ancak kafeslerin temizliği, kafeslere müdahale, yumurta

alımında yaşanan sorunlardan ve dişi AMS bireylerinin yumurtaları tül gözeneklerinden dışarı bırakmalarından dolayı bu kafeslerinde kullanışsız olduğu görülmüştür.

Daha sonra ilk yapılan kafesler modifiye edilmiştir. Bunun için kafesin bir yüzeyi ortasında delikli ve sarı renkli bir plastik bulunan cam ile kapatılmıştır. Burada cam vasıtasıyla hem kafesin ışığı daha fazla alması ve hem de yumurtaların buradan kafese müdahale edilmeksizin alınması amaçlanmıştır. Ayrıca, sineklerin ışığa yönelmelerinden faydalanılarak, ışık girişinin sağlandığı cam bölmeye yerleştirilen delikli sarı plastiklere doğru sineklerin yönlendirilmesi ve dolayısıyla da yumurtaların buraya bırakılması hedeflenmiştir. Sonuçlar önceki kafeslere göre daha iyi olmakla birlikte yumurtaların hemen hemen dik bir açıdan alınmasında güçlükler yaşanmıştır.

Bu kafesler tekrar modifiye edilerek cam yüzeyi yaklaşık olarak 30°'lik bir açıyla içeri doğru yatırılmıştır (Şekil 2.1d). Bu kafeslerden özellikle yumurta alımı yönünden daha iyi sonuçlar alınmıştır. Ancak ışık miktarının hala düşük olması, su sisteminin tam olarak çalışmaması (sineklerin suya düşerek ölmesinden), yumurtaların bırakıldığı andan itibaren nemli ortamda kalmaması ve ahşap malzemelerin birleşme noktalarındaki sineklerin dışkılarının yıkanarak temizlenememesi gibi nedenlerden dolayı ahşap kafeslerden istenilen düzeyde yararlanılamamıştır.



Şekil 2.1. Akdeniz meyve sineği kültürü için denenen kafes şekilleri.

Kafeslerin AMS biyolojisine uygun, kültürün sürekliliği için elverişli ve kullanışlı olması gerektiğinden; kültürlerde kur yapma, çiftleşme ve yumurtlama gibi davranışlarının incelenmesi, su ihtiyaçlarının karşılanması, uygun yumurtlama alanı,

ışıktan maksimum düzeyde faydalanma, ölü bireylerin alınabilmesi ve temizlik gibi faktörler dikkate alınarak propilen plastikten kaplar kullanılarak kafesler yapılmıştır. Böylece kafeslerin maksimum düzeyde ışık alabilmesi, temizliği ise kültür devam ederken silinerek ve kültür sonunda yıkanarak gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Diğer taraftan yumurta bırakma alanı için sarı renkli plastik bardak kullanılmış ve bu bir kapak ile kapatılarak yumurta alımı kolaylaştırılmıştır. Ayrıca bu kapağa de-monte halde su tutma özelliği fazla olan sünger benzeri bir materyal takılmış ve sürekli nemli bir ortam sağlamıştır. Sineklerin beslenmesi aynı küp şekerler ile sağlanmıştır. Diğer yandan sineklerin su ihtiyacı kafes içerisine müdahale edilmeksizin dışarı ile bağlantılı olan, yaklaşık 100 ml'lik (15-20 gün yetecek) hazneye sahip bir sulukla karşılanmıştır (Şekil 3.2). Yapılan bu kafes sistemi (bütün çalışmalarda kaynak olarak kullanılan) AMS kültürlerinde kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Akdeniz meyve sineğinin kültürü için kullanılan kafes sistemi ve bileşenleri (a, besin ve hava girişi için pencere teli gerilmiş üst kapak; b, şeffaf plastik malzeme; c, bırakılan yumurtaların nemli bir ortamda kalmasını sağlayan kapak; d, AMS ovipozitörü ve ovipozisyon; e, bırakılan yumurtalar; f, yumurtaların alınması; g, pulaların kafese yerleştirilmesi; h, kültür süresince kafesten örnek almaya ve kafeslerin temizlenmesine olanak sağlayan müdahale kolluğu).

2.2. Arazi Çalışmaları

Çalışmalarda kullanmak üzere AMS örnekleme Haziran - Aralık 2012 ayları arasında, AMS vuruklu meyveler toplanarak gerçekleştirilmiştir. Arazi çalışmaları narenciye üretimi yapılan 20 farklı lokasyonda gerçekleştirilmiştir. Arazi çalışmalarının gerçekleştirildiği lokasyonların harita üzerinde gösterimi Şekil 2.2’de, bu lokasyonlara ait koordinatlar ise Tablo 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.2. Akdeniz meyve sineğinin elde edildiği lokasyonların harita üzerinde gösterimi (Google earth, 2014, Google Inc.)

Tablo 2.1. Akdeniz meyve sineğinin elde edildiği lokasyonların koordinatları, rakımları.

	Lokasyon	Koordinatlar	Rakım
1	Hatay, Antakya, Mızraklı*	36° 07' 368"K / 36° 00' 148"D	85 m
2	Hatay, Antakya, Çekmece*	36° 12 '218"K / 36° 07' 520"D	127 m
3	Hatay, İskenderun, Merkez*	36° 35' 127"K / 36° 10' 211"D	8 m
4	Hatay, Dörtöl ^x	36° 50' 749"K / 36° 13' 302"D	66 m
5	Adana, Havutlu*	36° 55' 359"K / 35° 20' 435"D	21
6	Adana, Merkez*	37° 00' 432"K / 35° 20' 333"D	33 m
7	Mersin, Tarsus*	36° 54' 588"K / 34° 54' 541"D	16 m

(☺: AMS kültüre alındı, *: Çalışmalarda kullanmak için alkole alındı, x: AMS elde edilemedi, °: Derece, ': dakika, " : Saniye, K: Kuzey, D: Doğu, m: metre).

Tablo 2.1. (Devamı) Akdeniz meyve sineğinin elde edildiği lokasyonların koordinatları, rakımları.

8	Mersin, Mezitli ^x	36° 44' 501''K / 34° 31' 394''D	17 m
9	Mersin, Alata [*]	36° 36' 432''K / 34° 19' 316''D	5 m
10	Antalya, Alanya, Oba ^x	36° 33' 126''K / 32° 03' 346''D	20 m
11	Antalya, Alanya, Kestel ^x	36° 31' 762''K / 32° 03' 323''D	3 m
12	Antalya, Manavgat [*]	36° 47' 242''K / 31° 27' 463''D	44 m
13	Antalya, Serik ^x	36° 55' 185''K / 31° 06' 458''D	39 m
14	Muğla, Köyceğiz ^x	36° 58' 165''K / 28° 41' 198''D	28 m
15	Muğla, Milas [*]	37° 19' 088''K / 27° 46' 470''D	78 m
16	Aydın, Merkez [*]	37° 48' 348''K / 28° 27' 213''D	200 m
17	Aydın, Kuşadası ^x	37° 43' 568''K / 27° 17' 230''D	62 m
18	Aydın, Nazilli ^x	37° 54' 327''K / 28° 19' 148''D	75 m
19	İzmir, Bornova ^{☺*}	38° 27' 455''K / 27° 14' 387''D	63 m
20	İzmir, Ödemiş ^x	38° 14' 449''K / 27° 58' 159''D	138 m

(☺: AMS kültüre alındı, *: Çalışmalarda kullanmak için alkole alındı, x: AMS elde edilemedi, °: Derece, ': dakika, '': Saniye, K: Kuzey, D: Doğu, m: metre).

2.3. Akdeniz Meyve Sineği Kültürü

2.3.1. Vuruklu Meyvelerden Akdeniz Meyve Sineğinin Elde Edilmesi

Arazi çalışmalarında toplanan enfekteli (vuruklu) meyvelerden AMS elde etmek için Zümreoğlu [124] tarafından belirtilen metot modifiye edilerek kullanılmıştır. Bunun için bir yüzeyi telle kapatılmış plastik kaplar içerisine hacmin 1/5 oranında yıkanmış ve steril edilmiş kum doldurularak larvaların pupa oluşturabileceği ortam hazırlanmıştır. Bu ortama enfekteli meyveler yerleştirilmiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Enfekteli portakal ve mandalinalardan Akdeniz meyve sineğinin elde edilmesi.

Meyvelerin yerleştirildiği kaplar oda sıcaklığında (en düşük 19°C, en yüksek 25°C’de) muhafaza edilerek larvaların gelişmesi ve pupa oluşturmaları sağlanmıştır. Kaplar sürekli kontrol edilmiş ve kum 7. günden itibaren günlük olarak elenerek pupalar alınmıştır.

2.3.2. AMS’nin Laboratuvar Kültürü

Pupalar AMS erginlerinin elde edilmesi ve AMS kültürlerinin devam ettirilmesi için yapılan plastik kafeslere alınmıştır. Kafesler Joachim-Bravo et al. [125] tarafından önerilen şekilde $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklığa, $\% 60 \pm 5$ nispi neme ve 10:14 (aydınlık: karanlık) fotoperiyoda sahip koşullarının oluşturulduğu insektaryuma yerleştirilmiştir (Şekil 2.4).

Kültürlerin su ve besin gereksinimleri günlük olarak kontrol edilirken, kafeslerin temizliği (varsa ölü bireylerin alınması, kafeslerin silinmesi vb.) yapılmıştır. Bırakılan yumurtalar günlük olarak fırça yardımı ile alınmış, yumurtlama alanının nemli kalması için kapaktaki sünger ıslatılmıştır.



Şekil 2.4. AMS kültürünün gerçekleştirildiği kafes ve insektaryum.

2.3.3. Larva Besi Ortamı

Kafeslerden alınan yumurtalar Tezcan ve Zümreoğlu [126] tarafından belirtilen ve bileşimi Tablo 2.2’de belirtilen şekilde modifiye edilerek hazırlanan besiortamına (mama) aktarılmıştır. Bunun için tartılan besiyeri bileşenleri saf su ile 100 ml’ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Tablo 2.2. Larva besiortamı hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve oranları.

Larva besiortamı (Mama) bileşenleri	gr/l
Kepek	230
Şeker	120
Ruşeym (buğday embriyosu, özü)	50
Maya	32
Sodyum Benzoat	2

Hazırlanan besiortamı üzeri peçete ile kapatılmış ve bunun üzerine AMS yumurtaları yayılmıştır. Besiortamı daha sonra içerisinde kum bulunan, hava giriş çıkışını sağlayacak ancak larvaların çıkışını engelleyecek, kapaklı ikinci kaba yerleştirilmiştir (Şekil 2.5). Elde edilen bu larva geliştirme kafesi $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık, $\% 60 \pm 5$ nispi nem

ve nispeten karanlık koşullara sahip bir ortamda gelişmeye bırakılmıştır. Kum 7. günden itibaren günlük olarak elenmiş ve elde edilen pupalar temiz kafeslere alınmıştır.



şekil 2.5. Larva besiortamının bileşenleri ve hazırlanan besiortamı.

2.4. Moleküler alıřmalar

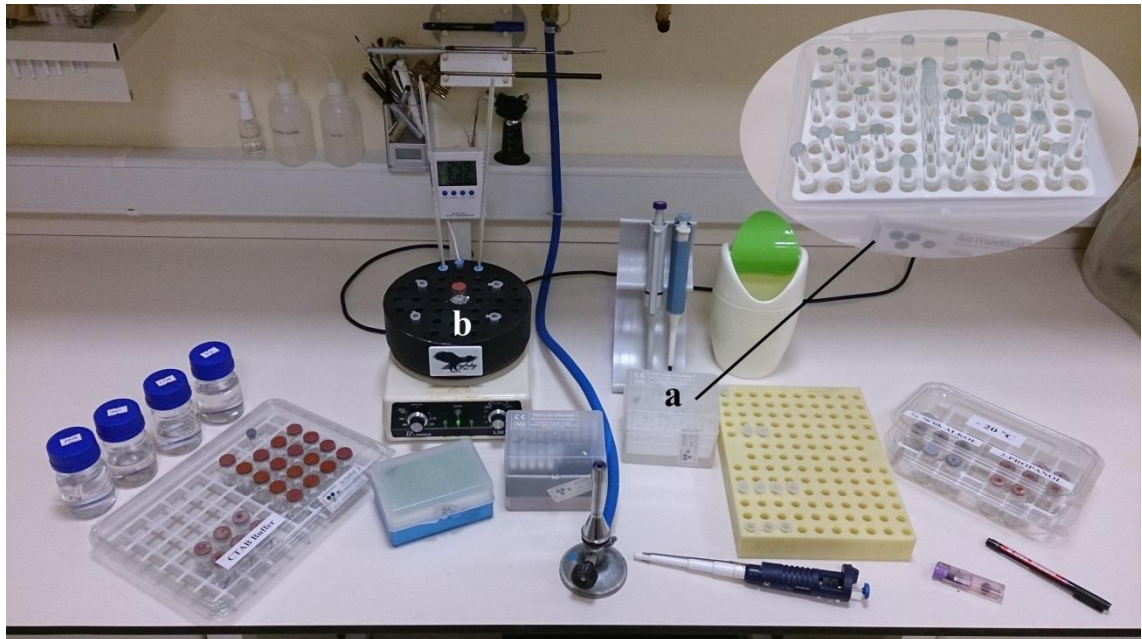
2.4.1. Total DNA İzolasyonu

AMS kültürlerden rastgele alınan ergin, pupa, larva ve yumurtalar total DNA izolasyonu için kullanılmıştır. Total DNA Doyle and Doyle [127] tarafından belirtilen CTAB (Cetil trimetil amonium bromide) metoduna göre izole edilmiştir. Bunun için bileşimi Tablo 2.3’de belirtilen şekilde hazırlanan CTAB tamponu otoklavda steril edilerek kullanılmıştır.

Tablo 2.3. DNA izolasyonu için kullanılan CTAB tamponunun bileşenleri.

5 ml’lik CTAB tamponu için	Hacim (ml)
% 5 CTAB	2
8 M Tris-HCL	0.5
8 M EDTA	0.2
8 M NaCl	1.4
Saf su	0.9

Steril CTAB tamponuna kullanım öncesinde 20 µl 2-Merkaptoetanol eklenmiş ve kuru blok ısıtıcı kullanılarak 60°C'ye ısıtılmıştır. Bu CTAB tamponundan 200 µl alınmış ve AMS örneği (ergin, pupa, larva veya yumurta) mikrosantrifüj tüpü içerisinde cam baget yardımı ile ezilmiştir. Ezme işlemi için her bir örnek için ayrı ayrı olacak şekilde önceden steril edilmiş cam bagetler kullanılmıştır (Şekil 2.6). Elde edilen homojenizat kuru blok ısıtıcıda 60°C'de 5 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüplere 200 µl kloroform:izoamilalkol (24:1) eklenmiş ve maksimum hızda 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant (üst faz) bir başka tüpe alınarak üzerine 2/3 oranında izopropanol (2-propanol) eklenmiş ve 1 gece -20°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüpler maksimum hızda 10 dk santrifüj edilmiş, süpernatant atılmış ve % 70'lik alkolle yıkanmıştır. Elde edilen pellet, önceden 200°C sıcaklıkta steril edilmiş ve soğutulmuş pastör fırınında, 35°C'de 30 dakika süreyle kurutularak 30 µl saf suda çözülmüş ve PCR çalışması için kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 2.6. AMS örneklerinden total DNA izolasyonu sırasında kullanılan malzeme ve tamponlar (a: DNA izolasyonu için kullanılan steril cam çubuklar, b: kuru blok ısıtıcı).

2.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

AMS'nden izole edilen total DNA'lar edosimbioyotik bakteri taramalarında kaynak olarak kullanılmıştır. İzole edilen total DNA'lar, önceki çalışmalarda kullanılan

endosimbiontlara spesifik primer çiftleri doğrultusunda PCR’da çoğaltılarak ilgili endosimbiontun taraması yapılmıştır.

PCR çalışmaları için reaksiyon karışımları, Tablo 2.4’de verilen bileşenlerle +4°C’de (Şekil 2.7) ve toplam hacim 20 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 2.4. PCR reaksiyon bileşenleri ve miktarları.

Reaksiyon karışımı bileşenleri	Hacim (µl)
Taq buffer (Fermentas)	2
MgCl ₂ (25 mM) (Fermentas)	1,8
dNTP (her birinden 10 mM) (Fermentas)	0,5
Primeri F (10mM) (Ella Biotech)	1,25
Primeri R (10mM) (Ella Biotech)	1,25
Taq Polimeraz (500 U) (Fermentas)	0,1
İzole edilen total DNA	1
Saf su	12,1



Şekil 2.7. PCR reaksiyon karışımlarının hazırlanması.

İzole edilen total DNA’ların amplifikasyonları için, Tablo 2.5’de belirtilen sıcaklık ve sürelerde PCR (ThermoScientific) ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.5. PCR amplifikasyon koşulları.

Koşullar		Süre	Döngü
Ön denatürasyon	95°C	3 dk	1
Denatürasyon	94°C	30 sn	35
Primer bağlanma sıcaklığı ‘Annealing’	Tablo 2.6	45 sn	
Uzama	72°C	1 dk	
Son uzama	72°C	5 dk	1

Primerlerin bağlanma sıcaklıklarının ‘annealing’ belirlenmesi için her bir primer çifti için PCR cihazında gradient (değişken sıcaklık uygulaması) (48°C – 65°C) ile elde edilerek uygulanmıştır. Diğer yandan pozitif kontrol bulunamaması nedeniyle *Wolbachia* hariç diğer endosimbiont taramalarında; her bir primer çifti için daha önceki çalışmalarda uygulanan annealing sıcaklıkları (Tablo 2.6) uygulanmıştır.

Tablo 2.6. Akdeniz meyve sineğinde endosimbiyotik bakteri taramalarında kullanılan primerler.

Primer Adı	Baz Dizisi	Hedef Bakteri ve Gen Bölgesi	Amplikon (bp)	Annealing (°C)	Referans
<i>wspecF</i>	5'- YATACCTATTCGAAGGGATAG -3'	<i>Wolbachia</i> 16S rRNA	430	53	[18]
<i>wspecR</i>	5'- AGCTTCGAGTGAAACCAATTC -3'				
<i>wspF</i>	5'- GTCCAATARSTGATGARGAAAC -3'	<i>Wolbachia</i> 16S rRNA	603	58	[128]
<i>wspR</i>	5'- CYGCACCAAYAGYRCTR TAAA -3'				
<i>Ch-F</i>	5'- TACTGTAAGAATAAGCACCGGC -3'	<i>Cardinium</i> 16S rRNA	400	58	[76]
<i>Ch-R</i>	5'- GTGGATCACTTAACGCTTTTCG -3'				
<i>Clo-F</i>	5'- GCGGTGTAAAATGAGCGTG -3'	<i>Cardinium</i> 16S rRNA	466	54	[20]
<i>Clo-R</i>	5'- ACCTMTTCTTA ACTCAAGCCT -3'				
<i>Rb-F</i>	5'- GCTCAGAACGAACGCTATC -3'	<i>Rickettsia</i> 16S rRNA	900	58	[21]
<i>Rb-R</i>	5'- GAAGGAAAGCATCTCTGC -3'				
<i>63F</i>	5'- GCCTAATACATGCAAGTCGAAC -3'	<i>Spiroplasma</i> 16S rRNA	450	55	[17, 22]
<i>TK55</i>	5'- TAGCCGTGGCTTTCTGGTAA -3'				
<i>ArsF</i>	5'- GGGTTGTAAAGTACTTTTCAGTCGT -3'	<i>Arsenophonus</i> 16S rRNA	800	52	[23]
<i>ArsR2</i>	5'- GTAGCCCTRCTCGTAAGGGCC -3'				
<i>ArsR3</i>	5'- CCTYTATCTCTAAAGGTTTCGCTGGATG -3'		600	52	
<i>HamF</i>	5'- TGAGTAAAGTCTGGAATCTGG -3'	<i>Hamintonella</i> 16S rRNA	730	54	[19]
<i>HamR</i>	5'- AGTTCAAGACCGCAACCTC -3'				

Tablo 2.6. (Devamı) Akdeniz meyve sineğinde endosimbiyotik bakteri taramalarında kullanılan primerler.

Primer Adı	Baz Dizisi	Hedef Bakteri ve Gen Bölgesi	Amplikon (bp)	Annealing	Referans
27-F	5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3'	Üniversal bakteri primeri 16S rRNA	1,500	54°C	[129]
1513 R	5'- ACGGYTACCTTGTTACGACTT -3'				
12S CR R	5'- AAACCAGGATTAGATACCCTATTAT -3'	Mitokondrial 12S rRNA	380	54°C	[130]
12S CF R	5'- GAGAGTGACGGGCGATATGT -3'				

2.4.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi

Örneklerden total DNA izolasyonunun gerçekleştirilip gerçekleştirilemediğinin belirlenmesi ve PCR ürünlerini değerlendirebilmek için agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır. Elektroforez tamponu olarak 50X TAE (Tris, Glacial Asetik Asit, EDTA) (Fermentas) kullanılmıştır. 50X TAE her bir elektroforez çalışması sırasında 1X olacak şekilde seyreltilerek kullanılmıştır. PCR ürünleri için % 1'lik (w/v), total DNA için ise %1.5'lik (w/v) agaroz (Serva) konsantrasyonunda 100 ml'lik jel 1X TAE çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. Karışım mikrodalga fırında tamamen çözününceye kadar (1.5-2 dakika) ısıtılmış ve sıcaklığının 50-55°C'ye düşünceye kadar sürekli manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Hazırlanan agaroz çözeltisine nükleik asit boyası GelRed (Biotium) 3 µl eklenerek bir süre daha karıştırılmış ve önceden tarakların yerleştirildiği jel kasetine dökülmüştür. Jel katılaşıncaya kadar bekletilmiş ve kasetten taraklar çıkarılarak içerisinde 1X TAE bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Total DNA veya PCR ürünlerinden 10 µl alınarak 2 µl 6X yükleme boyası (Loading Dye) (10 mM Tris-HCl (pH 7.6), % 0.03 bromophenol blue % 0.03 xylene cyanol FF, % 60 glycerol, 60 mM EDTA) ile karıştırılmış ve jele yüklenmiştir. Ayrıca yürütme sonrasında bantların değerlendirilebilmesi için DNA ladder (GeneRuler 100 bp Plus) (ThermoScientific) da jele yüklenmiştir. Yükleme tamamlandıktan sonra tanka 80 V, 500 mA akım 60 dk (Consult 368) süreyle uygulanmış ve jel transilüminatör (ThermoScientific) ile görüntülenmiştir.

Elde edilen ve elektroforez ile görüntülenen PCR ürünlerinin dizi analizi RefGen (ODTÜ Teknopark/Ankara) Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji laboratuvarında ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) cihazında çift yönlü olarak (ileri ve geri) ham DNA dizi verileri elde edilmiştir. Bu veriler sekans düzenleme (alignment) programı BioEdit (7.0.5.3v) ile düzenlenerek GenBank (National Center for Biotechnology Information (NCBI), US) veri tabanında BLAST (biyolojik sekans verileri arasındaki benzerlik) analizi yapılmıştır.

2.5. Sekonder Simbiyotik Bakterilere Yönelik Taramalar

AMS'nde endosimbiyontlara yönelik taramalar PCR ile gerçekleştirilmiştir. Taramalar spesifik primerler doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bu primerler çalışmalardan elde

edilen sonuçlar doğrultusunda temin edilmiştir. Diğer bir deyişle endosimbiyontlara yönelik taramalara aynı zamanda başlanmamıştır. Buna göre AMS’nde endosimbiyontlara yönelik tarama çalışmalarına ilk olarak *Wolbachia* bakterisi ile başlanmış *Cardinium* ile devam edilmiş olup, daha sonra sırasıyla *Rickettsia*, *Hamiltonella*, *Arsenophonus* ve *Spiroplasma*’ya yönelik taramalarla çalışmanın kapsamı genişletilmiştir.

2.5.1. *Wolbachia* Taraması

Wolbachia taramaları Hatay ve Mersin’den 3, Adana’dan 2 ve Antalya, Muğla, Aydın, İzmir’den 1’er olmak üzere toplam 12 lokasyondan (Tablo 2.1 ve Şekil 2.2) elde edilen AMS örnekleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak Patras Üniversitesi (Yunanistan) öğretim üyesi Dr. Georgios TSIAMIS’ten temin edilen *Wolbachia* enfekteli *Drosophila* pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. *Drosophila* örneklerinden yukarıda belirtilen metoda göre total DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol olarak ise saf su kullanılmıştır.

Wolbachia tarama çalışmalarında Tablo 2.6’da belirtilen *WpsecF-WspecR* (16S rDNA) ve *wspF-wspR* (*Wolbachia* yüzey proteini, *Wolbachia* surface protein) primerleri kullanılmıştır. Bunun için, İzmir-Bornova’dan 25 AMS örneğinden, diğer lokasyonlardan ise elde edilen bireylerin tamamından izole edilen total DNA izole edilmiştir. Bu total DNA’lar üzerinden 3’er paralelli olarak *wsp* ve *Wpsec* primerleri PCR tabanlı olarak taramalar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforez yöntemi ile görüntülenmiştir (Şekil 3.3).

2.5.2. *Cardinium* Taraması

Cardinium’a yönelik taramalar, sadece İzmir-Bornova’dan temin edilen ve kültüre alınan AMS örnekleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için spesifik *16S rDNA* primerleri, *Ch* ve *Clo* (Tablo 2.6) kullanılmıştır. *Cardinium* enfekteli bir arthropod temin edilemediği için bu çalışmalarda pozitif kontrol kullanılmamıştır. Negatif kontrol olarak ise saf su kullanılmıştır.

Başlangıçta AMS kültüründen alınan 25 ergin bireyden total izolasyonu gerçekleştirilerek *Ch* (EllaBiotech) ve *Clo* (EllaBiotech) primerleri ile PCR yapılmıştır. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Agaroz jeli transilüminatörde görüntülendiğinde, *Cardinium* bakterisine yönelik taramalarda oldukça spesifik olduğu belirtilen *Ch* ve *Clo* primerleri ile, literatür verilerine göre sırasıyla 400 bp ve 466 bp'lik (Tablo 2.6) fragmentler (PCR ürünleri) verirken, AMS total DNA'ları ile gerçekleştirilen bu çalışmalarda sırasıyla ~320 bp ve ~200 bp'lik bantlar elde edilmiştir (Şekil 3.4). Bunun üzerine AMS kültüründen alınan farklı biyolojik evre örneklerinden (yumurta, larva, pupa ve ergin) her birinden 10'ar paralelli olarak total DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve çalışmalar tekrarlanmıştır.

AMS'nden izole edilen toplam 65 total DNA'nın *Ch* ve *Clo* primerleri gerçekleştirilen PCR'ları sonucunda bunların tamamında başlangıçta elde edilen sırasıyla ~320 bp ve ~200 bp'lik bantlar elde edilmiştir.

Elde edilen bantların, literatür verilerine uymaması nedeniyle ve spesifik olmayan bir bağlanmanın sonucundan kaynaklandığı düşüncesiyle PCR çalışmaları; reaksiyon şartları ($MgCl_2$, primer ve Taq polimeraz miktarının azaltılması gibi) ve koşulları (annealing sıcaklığının arttırılması) zorlanmıştır. Ancak söz konusu fragmentlerin amplifikasyonu literatür sınırları dahilinde denenen her durumda gerçekleşmiştir.

Elde edilen sonuçlar üzerine hem *Ch* hem de *Clo* primeri ile elde edilen PCR ürünlerinin dizi analizi (sekans) yaptırılmıştır. İleri (Forward) ve geri (Reverse) yönlü sekans sonuçları BioEdit programı kullanılarak düzenlenmiştir. Her iki primer çiftinin baz dizileri bir birleriyle hizalanmasına (alignment) karşın, elde edilen diziler GenBank (NCBI) veri tabanında herhangi bir organizma ile eşleşmiştir.

Ayrıca her iki primer çifti farklı firmadan (Fermentas) temin edilerek de diziler kontrol edilmiştir. Ancak primerler firma farkı gözetmeksizin istikrarlı bir şekilde aynı PCR ürünlerini vermiştir.

Sonuçlar doğrultusunda, çalışmalar bu durumun aydınlatılması üzerine yoğunlaştırılmıştır.

2.5.2.1. *Ch* ve *Clo* Primer Ürünlerinin Eliminasyonu için Antibiyotik Uygulaması

Ch ve *Clo* primerleri ile elde edilen sonuçlar ve çalışmalarda kullanılabilecek *Cardinium* enfekteli bir pozitif kontrol bulunamaması nedeniyle; söz konusu bantların kaybedilmesi için AMS bireylerine antibiyotik uygulaması gerçekleştirilmiştir. Diğer bir deyişle antibiyotik kullanılarak *Ch* ve *Clo* primer çiftleri ile elde edilen bantlarının kaybedilmesi ve dolaylı olarak bu bantların *Cardinium*'a ait olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla *Cardinium* enfeksiyonlarına karşı kullanılabileceği belirtilen penisilin G (Ulugay) [69, 131], amfisilin (Sigma) [131] ile genellikle *Wolbachia* için kullanılan tetrasiklin (Bio Basic) [69, 131] antibiyotikleri kullanılmıştır [132].

Antibiyotikler larva besi ortamına ve ergin bireylere sırası ile % 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 1.5 ve 2 (gr/l) oranlarında uygulanmıştır. Uygulamalar AMS'nin biyolojik evreleri (yumurta, larva ve ergin) ve antibiyotiklerin etkin doz eşiği gibi farklı parametreler dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Bunlar;

- Yumurtaların antibiyotik içeren larva besi ortamına alınması,
- 1 gün yaşındaki larvalara antibiyotik verilmesi,
- 2. instar (6 gün yaşındaki larva) aşamasındaki larvalara antibiyotik verilmesi,
- 1 gün yaşındaki larvalara 12'şer saat arayla antibiyotik uygulanması,
- 1 gün yaşındaki larvalara 24'er saat arayla antibiyotik uygulanması,
- Antibiyotikli ortamdan elde edilen pupalardan çıkan erginlere aynı dozda antibiyotik içeren şekerli su (% 10'luk sükröz) verilmesi,
- Antibiyotikli ortamdan elde edilen pupalardan çıkan erginlere aynı dozda antibiyotik içeren protein hidrolizat verilmesi,
- Sadece erginlere antibiyotik uygulaması, olmak üzere 8 farklı şekilde denenmiştir.

Antibiyotik uygulaması yapılan AMS bireyleri ayrı ayrı deneme kafeslerine (Şekil 2.8) alınmış ve bu kafeslerde kültürler 2 nesil devam ettirilmiştir. Bütün denemeler 3'er paralelli olarak kurulmuştur. Antibiyotik denemelerinde amacın söz konusu bantların kaybedilip kaybedilemediğinin belirlenmesi olduğu için antibiyotiklerin AMS biyolojisine ne şekilde (ömür uzunluğu, yumurta verimliliği, yumurtadan ve pupadan çıkış oranları vb.) etki ettiği araştırılmamıştır.



Şekil 2.8. Akdeniz meyve sineği yumurta, larva ve erginlerine antibiyotik uygulamasında kullanılan kafes.

Eğer *Cardinium* enfeksiyonu varsa ve bunun eliminasyonunun gerçekleştirilip gerçekleştirilemediğinin belirlenmesi amacıyla antibiyotik uygulanan kültürlerden rastgele alınan 10 bireyden total DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen total DNA'lar *Ch* ve *Clo* primeri ile amplifiye edilerek elektroforez çalışmaları tekrarlanmıştır. Jellerde sırasıyla 200 bç ve 320 bç'lik bantların giderilip giderilemediği kontrol edilmiştir. Çalışmalarda pozitif kontrol olarak antibiyotik uygulanmamış kültürden alınan bireyler kullanılırken negatif kontrol olarak DNA yerine saf su kullanılmıştır. Ayrıca antibiyotik uygulanan AMS kültürleri 2 nesil süresince takip edilerek DNA izolasyonu ve PCR çalışmaları tekrarlanarak söz konusu primerlerin bantları kontrol edilmiştir.

2.5.2.2. *Ch* ve *Clo* Primerlerinin Bağlanma Olasılıklarının Belirlenmesi

Ch ve *Clo* ile elde edilen sonuçlara ilave olarak antibiyotik denemelerinde de bu bantların kaybedilememiş olması spesifik olmayan bir bağlanmayı ve bu doğrultudaki

bir amplifikasyonun ürünü olarak düşünülmüştür. Ancak, çalışmalarda söz konusu primerlerin ve ampikonlarının kararlı bir şekilde elde ediliyor olması ve sekans verilerinin açıklanamaması iki noktanın sorgulanmasına neden olmuştur. Bunlar, söz konusu primerlerin bağlanması spesifik mi/değil mi. Ancak her iki sorunun da cevabı AMS genetik materyalinde olabileceği gibi mikrooflorasında da olabilir. Diğer bir değişle bu primerlerin spesifik olarak ya da olmayarak bağlanması ve amplifikasyonu, AMS genomunun bir bölgesinde olabileceği gibi mikroflorasındaki bir organizma genomun bir bölgesinde de olabilir.

Bu soruları ve olasılıkları açıklamak için; *Ch* ve *Clo* bantlarının bir sonraki nesilde de çıkmasından hareketle ve bu primerlerin bağlanma olasılığının bulunduğu (AMS ve/veya bakteri) DNA bölgelerini mikro düzeyde elde etmek için AMS yumurtasından izole edilen total DNA kaynak olarak kullanılmıştır. Bunun için *16S rDNA* universal bakteri primer çifti (27 F, 1513 R) ile *12S* mitokondrial *rDNA* (*mtDNA*) (*CFR-CRR*) primer çifti (Tablo 2.6) temin edilmiştir. Burada hem *16S rDNA* primerleri ile yumurtada bir bakteri bulunup bulunmadığı, hem de *12S mtDNA* primerinin PCR ürünlerinden elde edilecek sekans verisinde *Ch* ve *Clo* primerlerinin olası spesifik olmayan bir bağlanma durumlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bunun için AMS kültüründen steril mikrosanrifüj tüplerine ayrı ayrı yumurta (her birinde en az 100'er yumurta olacak şekilde) alınmıştır. Her bir tüpteki yumurtaların yüzey sterilizasyonu Quesada-Moraga et al. [133] tarafından belirtilen % 1 NaOCl çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen yumurtalar cam baget ile ezilerek DNA izolasyon işlemine tabii tutulmuştur. Yumurtalardan total DNA elde edilip edilmediğini anlamak için elektroforez yöntemi kullanılarak yürütülmüştür (Şekil 3.7). DNA izolasyonu gerçekleştirilen yumurta örneklerinden *16S rDNA* ve *12S mtDNA* primer çiftleri ile PCR yapılmıştır. *16S rDNA* primeri için pozitif kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) bakterisinden izole edilen total DNA kullanılmıştır. *16S rDNA* ve *12S mtDNA* primer çiftleri ile elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir (Şekil 3.8). *16S rDNA* ve *12S mtDNA* primer çiftleri ile elde edilen

fagmentlerden (her bir primer için) 2'şer örnek dizi analizine gönderilmiştir. Sekans analizi ile elde edilen veriler BioEdit programı kullanılarak alignment yapılmıştır.

2.5.3. Akdeniz Meyve Sineği Yumurtalarının Yüzey Sterilizasyonu ve Bakteri Taraması

16S rDNA ile ~ 1500' bç'lik bantların sekansı ile elde edilen baz diziliminin son derece karışık olduğu (2 ya da daha fazla DNA'ya ait baz dizilimini içerdiği) belirlenmiştir. Bu durumun olası nedenlerinden biri, DNA izolasyonunun gerçekleştirildiği yumurtaların (100 adet) sayısı olarak düşünülmüştür. Diğer neden olarak da kullanılan yumurtaların açılmaya yakın olmasından ve/veya yüzey sterilizasyonu sırasında lizis olan (parçalanan) bakterilerin genetik materyalinden kaynaklı bir kontaminasyon nedeniyle olabileceği düşünülmüştür. Bir diğer neden ise bu durumlardan kaynaklı olmayan, gerçekten yumurta içerisinde var olan bakteri(ler) nedeniyle sekans sonuçlarının karışık çıktığı düşünülmüştür.

Bunun için AMS kültüründen yaklaşık 1 saatlik ve bir tüpte maksimum 10 adet olacak şekilde yumurta alınmıştır. Bunların yüzey sterilizasyonları aynı şekilde NaOCl çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ancak NaOCl konsantrasyonu % 5 olarak modifiye edilmiştir.

Yumurtaların yüzey sterilizasyonunun gerçekleştirilip gerçekleştirilemediğinin belirlenmesi için yıkama suyundan (her bir tüpten) ayrı ayrı iki Nutrient broth besiyeri içeren tüplere inokülasyon yapılmıştır. Tüplerden biri aerobik koşullarda diğeri ise anaerocult (Merck) ve anaerobik jar kullanılarak anaerobik koşullarda 72 saat süreyle 28°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince broth besiyerlerinde üreme olup olmadığı her gün kontrol edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir tüpten (aerobik, anaerobik tüplerden) Nutrient agar besiyerlerine inokülasyon yapılmış, aynı şekilde aerobik ve anaerobik koşullarda 72 saat 28°C'de inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.11). DNA izolasyonları sağlanmıştır. Bu çalışmalar, yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiş yumurta içeren 10 farklı tüpten (10 tekerrürlü) ve bunların her birinden 3'er paralelli olarak yapılmıştır. Ayrıca kontrol olarak kullanmak için;

- Yüzey sterilizasyon işlemlerinden ve DNA izolasyon aşamalarından geçirilmiş 3 steril mikrosantrifüj tüpü (SK)
- Sadece DNA izolasyon aşamalarından geçirilmiş 3 mikrosantrifüj tüpü (İK)
- DNA sulandırma suyundan (sulandırma suyundan kontrol, SSK) 3 kontrol örneği
- Diğer PCR çalışmalarında da kullanılan PCR reaksiyon karışımını hazırlamada kullanılan su (master mix negatif kontrol, NK), olmak üzere 4 farklı aşama kontrol edilmiştir.

2.5.3.1. Akdeniz Meyve Sineği Yumurtalarından *16S rDNA* Primeri ile Elde Edilen PCR Ürünlerinin Araştırılması

Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen yumurtalardan DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen total DNA'lar *Ch*, *Clo*, *16S rDNA* ve *12S mtDNA* primer çiftleri ile amplifiye edilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforez ile görüntülenmiş ve dört primer çiftinin de fragmentler verdiği görülmüştür (Şekil 3.12 ve Şekil 3.13). *16S rDNA* primeri ile elde edilen fragmentlerden 2'şer örnek tekrar dizi analizine gönderilmiştir. Sekans analizi ile elde edilen verileri BioEdit programı kullanılarak düzenlenmiştir.

Dört farklı aşaması kontrol edilen, yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen (sayısı azaltılmış yaklaşık 1 saatlik) yumurtalardan izole edilen DNA'larla gerçekleştirilen ikinci çalışmada da, *16S rDNA* universal primeri ile ~1500 bp'lık PCR ürünlerinin sekansı da ilk çalışmadan elde edilen sekans verisi ile aynı şekilde oldukça karışık (2 ya da daha fazla DNA'ya ait baz dizilimini içerdiği) baz dizilimi elde edilmiştir.

2.5.4.1. *Arsenophonus*, *Hamiltonella*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* Taraması

16 rDNA primer çifti ile AMS yumurtalarında bakteri olduğu görülmüş, ancak literatür verilerinde AMS'de bu şekilde yumurta yoluyla kalıtılan bir veya birkaç bakterinin bulunduğu ilişkin veri bulunamamıştır. Buna göre, *16S rDNA* ile elde edilen fragmentler hangi bakteriye (ya da bakterilere) ait, sorusuna cevap aranmıştır.

Ortaya çıkan bu durumu açıklayabilmek için artropodlarda yumurta yoluyla kalıtıldığı belirtilen diğer endosimbiyontlar; *Arsenophonus*, *Hamiltonella*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* için kullanılan spesifik primerler (EllaBiotech) (Tablo 2.4) temin edilmiştir.

Bu çalışma için AMS kültüründen rastgele seçilen farklı evrelerdeki (ergin, pupa, larva ve yumurta) yaklaşık 35 örnekten total DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen total DNA'lar spesifik primerler ile çoğaltılmıştır. PCR ürünleri elektroforezde görüntülenmiştir (Şekil 3.14 ve Şekil 3.15). Elde edilen PCR örneklerinden 3'er örnek dizi analizine gönderilmiştir. Sekans analizi ile elde edilen veriler BioEdit programı kullanılarak alignment yapılmıştır.

3. BÖLÜM

BULGULAR

Bu tez çalışması birbiri ile bağlantılı olarak 2 aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada AMS kültürü için gerekenler oluşturulmuş, ikinci aşamada ise tez çalışmasının esas konusu olan AMS’de endosimbiyotik bakterilere yönelik taramalar yapılmıştır. Bu aşamalarda gerçekleştirilen her bir çalışma ise bir önceki çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda ortaya çıkan soru(ları) cevaplamaya yönelik olarak ilerletilmiş ve elde edilen sonuçlara göre bir sonraki çalışmanın planlaması yapılmıştır.

3.1. Akdeniz Meyve Sineği Kültürü için İnsektaryum ve Kafes Sistemleri

Bu çalışmada AMS’nin kültüre alınması için; biyolojisine uygun koşullara sahip insektaryum yapıldı. Bu, bir buzdolabının modifiye edilmesiyle sağlandı. İnsektaryum ısıtma, soğutma, nem sağlama ve tahliye sistemi ile fotoperiyot düzenekleri sayesinde benzer çalışmaları da yürütebilecek şekilde tasarlandı. Öyle ki yapılan insektaryum 675 lt net kullanılabilir hacmi sayesinde 30 x 30 x 30 (en x boy x derinlik) ölçülerindeki kafeslerden 22 tanesi aynı anda kültüre alınabilmektedir (Şekil 3.1). Şuana kadar insektaryumda başta AMS olmak üzere aralarında *Sitophilus granarius*, *Sitophilus oryzae*, *Drosophilla* spp. *Bacterocera olea* gibi farklı türler kültüre alındı.

AMS için uygun gelişme koşullarının sağlanmasından sonra, AMS kültürünün sürdürülebilirliğinin ve denemelerin sağlıklı bir şekilde gerçekleştirilebilmesini sağlayacak şekilde farklı özelliklere sahip kafesler denendi. Yapılan literatür taramalarında bu konuya ilişkin çok az bilgi verildiği görülmüştür. Elde edilebilen literatür taramalarından elde edilen kısmi veriler ve hali hazırda AMS kültüründe stres, ışık girişi vb. gibi olumsuz etkisi olmayacak, kültürden maksimum verim (yumurta ve ömür uzunluğu gibi) alınmasını sağlayacak, temizliği ve dayanıklılığı gibi faktörler bakımından kullanışlı bir kafesin yapımı için çalışmalar yapıldı. Bu çalışmalar deneme yanılma yoluyla en uygun ve kullanışlı olan kafesi oluşturuncaya dek sürdürüldü. Bu denemeler sonucunda ahşap bazlı kafeslerin başta ışık girişi ve temizlik gibi nedenlerle kültürün devamlılığı açısından dezavantajlı olduğu görüldü. Dolayısıyla ahşap malzeme yerine plastik bazlı kafeslerin daha kullanışlı ve AMS kültürü açısından daha verimli olduğu görüldü.

Bu tez çalışmasının direk konusu olmaması nedeniyle; denenen kafes tipleri arasında detaylı bir inceleme yapılmadı. Ancak sadece gözlemlere ve bir takım ölçümlere dayanarak; AMS kültürü için en avantajlı kafesin oluşturulması amaçlanmış ve bazı kriterler belirlenmiştir. Bunlar;

- Kafes bakımlarının kolay olması, (besin ve su ihtiyacının karşılanması, yıkanarak temizlenebilmesi gibi)
- Şeffaf bir yapıda olması (kültürde leg davranışı, çiftleşme, yumurta bırakma gibi faaliyetlerin takip edilebilmesi ve ışıktan maksimum düzeyde yararlanma gibi)
- Verimliliğinin yüksek olması (kafeslerin en az 100 birey kapasiteli olması, bireylerin minimum 55 günlük yaşaması, kültürden maksimum sayıda yumurta alınması ve alınan yumurtaların yüksek açılma oranı gibi),
- Kültürde strese neden olmayacak şekilde kafese müdahalenin en aza indirilmesidir.

Bu noktada belirtilmesi gereken bir gözlem de; kafesten yararlanabilmek için diğer bir değişle AMS kültürünü devam ettirebilmek için elzem olan kafes parçasının, belki de en önemlisinin, yumurtlama bölümünün olduğu görüldü. Burada AMS ovipozitörünün uzunluğu nedeniyle kullanılacak malzemenin et kalınlığının, malzemenin kolay işlenebilmesinin ve statik elektriklenme gibi birçok faktörün önem arz ettiği belirlendi. Öyle ki huni haline getirilerek kullanılan plastik sarı renkli spiral kitap kapaklarına statik elektriklenmeden dolayı olduğu düşünülen nedenle AMS'nin yumurtlaması bir yana üzerine bile konmadığı gözlemlendi.

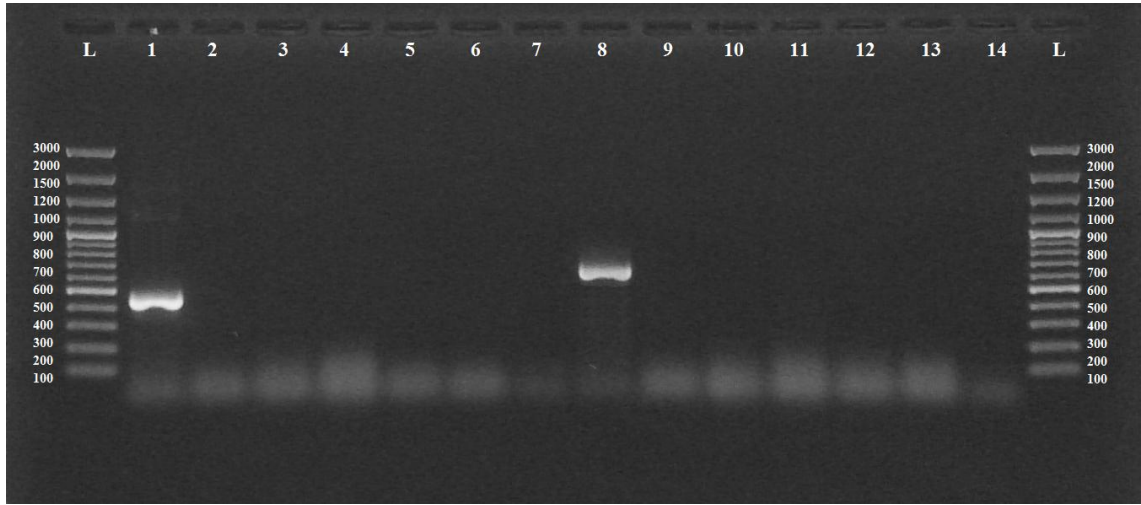
3.2. AMS'nde Endosimbiyotik (Sekonder Simbiyot) Bakteri Taraması

Bu bölümde, tarama çalışmalarına ilk olarak *Wolbachia* bakterisi ile başlanmıştır ve elde edilen veriler doğrultusunda çalışmaların kapsamı genişletildi. Dolayısıyla konu bütünlüğünün bozulmaması için elde edilen bulgular çalışma sırasına göre verildi.

3.2.1. *Wolbachia* Taraması

Wolbachia'ya yönelik tarama çalışmaları için kullanılan AMS örneklemi Tablo 1'de belirtilen lokasyonlardan, temin edilebilen, AMS örnekleri üzerinde gerçekleştirildi. *Wolbachia* taraması Hatay-Antakya (Çekmece, Mızraklı), Hatay-İskenderun, Adana

(Merkez, Havutlu), Mersin (Tarsus, Mezitli, Alata), Antalya-Manavgat, Muğla-Milas, Aydın, İzmir-Bornova olmak üzere toplam 12 lokasyonda gerçekleştirildi. PCR tabanlı olarak yapılan taramalar sonucu elde edilen jel resmi **Şekil X'dedir.** (Elektroforez çalışmasında 16'lı tarak kullanılmasından ve primerlere ilişkin sonuçların bir arada verilmesinden dolayı, jel resminde Aydın hariç diğer lokasyonlardan birer örnek görünmektedir.)



Şekil 3.3. *Wolbachia* primerleri ile gerçekleştirilen amplifikasyon sonrasında elde edilen PRC ürünlerinin elektroforezindeki jel görüntüsü. [L, Ladder; 1. – 7. sütunlar *Wspec* primeri ile (1, Hatay; 2, Adana; 3, Mersin; 4, Antalya; 5, Muğla; 6, İzmir; 7, Negatif kontrol); 8. – 14. sütunlar *wsp* primeri ile (8, Hatay; 9, Adana; 10, Mersin; 11, Antalya; 12, Muğla; 13, İzmir; 14, Negatif kontrol)]

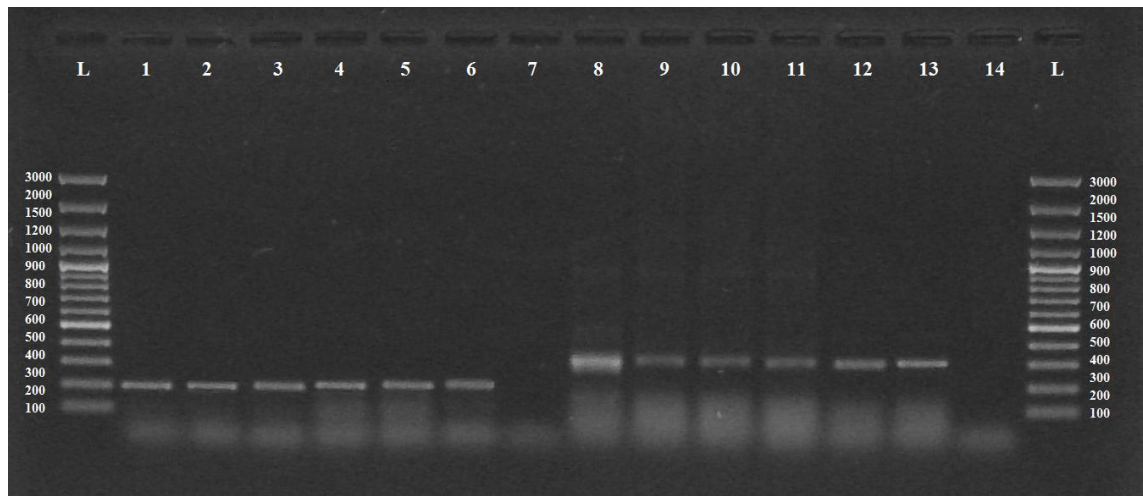
Şekilde de görüldüğü gibi pozitif kontrolde *Wspec* ve *wsp* primerleri ile gerçekleştirilen PCR sonucu sırasıyla ~400 bp ve ~500 bp'lık bantlar elde edildi. Diğer yandan Hatay'dan İzmir'e kadar olan sahil şeridinde yer alan 12 lokasyondan elde edilen AMS bireylerinde ise bu bantlar tespit edilmedi. Dolayısıyla bu sonuca göre belirtilen lokasyonlar itibarıyla Türkiye'deki AMS popülasyonlarında *Wolbachia* enfeksiyonu yoktur.

3.2.2. *Cardinium* Taraması

Cardinium bakterisine yönelik taramalarda bu bakteri için spesifik *ChF-ChR* (16S rDNA) ve *CloF-CloR* (16S rDNA) primerleri kullanıldı. Ancak arazi çalışmaları sırasında İzmir-Bornova dışındaki lokasyonlardan sınırlı sayıda elde edilen AMS örnekleri *Wolbachia* taramaları için kullanıldığından, bu ve bundan sonraki çalışma

bulguları kültüre alınan İzmir-Bornova temin edilen AMS kültüründen elde edilen verilerdir.

Ch ve *Clo* primerleri (Tablo 2.5) ile gerçekleştirilen *Cardinium* bu tarama çalışmalarında, enfekteli bir örnek temin edilemediği için pozitif kontrol olmadan yapıldı. PCR tabanlı olarak yapılan taramalar sonucu elde edilen jel resmi Şekil 3.4'dedir.



Şekil 3.4. *Cardinium* primerleri ile gerçekleştirilen amplifikasyon sonrasında elde edilen PRC ürünlerinin elektroforezindeki jel görüntüsü. [1. – 7 sütunlar *Ch* primeri ile (1, ED1; 2, ED2; 3, ED3; 4, EE1; 5, EE2; 6, EE3; 7, Negatif kontrol), 8. – 14. sütunlar *Clo* primeri ile (8, ED1; 9, ED2; 10, ED3; 11, EE1; 12, EE2; 13, EE3; 14, Negatif kontrol). L, Ladder; ED, Ergin dişi; EE, Ergin erkek.]

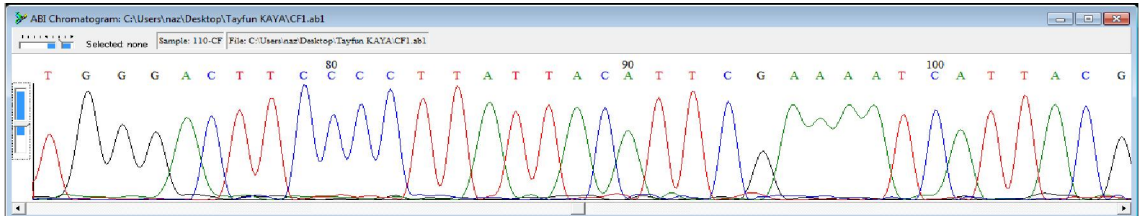
Cardinium için spesifik olan *Ch* ve *Clo* primerleri literatür verilerine göre sırasıyla 400 bp ve 450'lik bantlar vermesi gerekirken, PCR çalışmaları sonucunda sırasıyla ~200 bp ve ~320 bp'lik bantlar elde edildi. Bu çalışmalar AMS kültüründen rastgele seçilen yaklaşık 65 birey ile tekrarlanmış ve istikrarlı bir şekilde *Ch* ve *Clo* primerlerinin ~200 bp ve ~320 bp'lik bantlar verdiği görüldü.

Diğer yandan her iki primerin baz dizisinin kontrolü için ayrı bir firmadan (Fermentas, Thermo, Almanya) temin edilen primerler kullanıldı. Ayrıca çalışma ortamının ve PCR cihazının kontrolü için çalışmalar tamamen yeni PCR seti ile Ahi Evran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi bünyesindeki başka bir PCR (Cleaver Scientific) ile tekrarlandı. Farklı firma primerleriyle ve farklı PCR cihazıyla ile gerçekleştirilen çalışmalarda da *Ch* ile ~200 bp ve *Clo* ile ~320 bp'lik bantlar elde edildi.

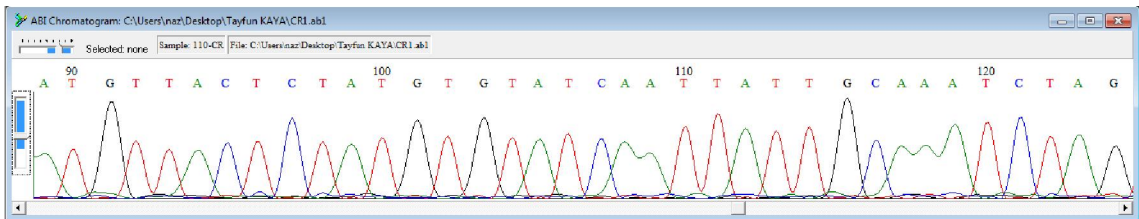
Ayrıca söz konusu primerler ile elde edilen primerlerin gerçekten *Cardinium*'a ait olup olmadığının dolaylı olarak belirlenmesi için AMS örneklerine penisilin G, amfisilin ve tetrasiklin antibiyotikleri kullanıldı. Antibiyotikler AMS'nin farklı biyolojik evrelerine çok yönlü olarak uygulandı. Ancak söz konusu PCR ürünlerinin antibiyotik uygulamalarına rağmen giderilemediği görüldü.

3.2.2.1. *Ch* ve *Clo* Primerleri ile Elde Edilen Dizlerin Analizi

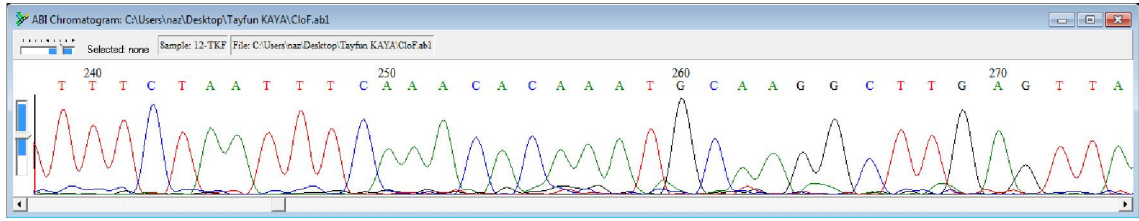
Ch ve *Clo* primerleri ile elde edilen PCR fragmentlerinden DNA dizi analizi yaptırıldı. Fragmentlerin sekansı sonucunda *Ch* primerlerinin ileri ve geri yönlü (*ChF* ve *ChR* için) sırasıyla 172 bç'lik ve 168 bç'lik baz dizisine sahip olduğu; *Clo* primerlerinin ise (*CloF* ve *CloR* için) sırasıyla 283 bç'lik ve 279 bç'lik baz dizisine sahip olduğu görüldü. Oldukça temiz olduğu görülen (Şekil 3.5.a ve Şekil 3.5.b) bu ileri ve geri yönlü baz dizileri arasında ise birebir eşleşmenin (sequence alignment) olduğu görüldü. Bu dizilerin her birinin BLAST analizi GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI) veri tabanında yapıldı. BLAST analizi sonucunda ise elde edilen diziler herhangi bir organizmaya ait olmadığı görüldü.



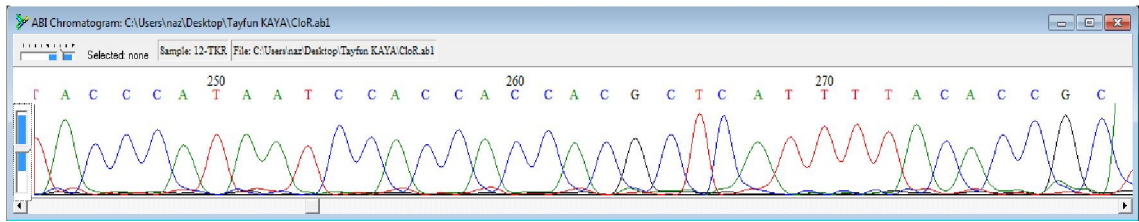
Şekil 3.5.a. *ChF* ile elde edilen ~170 bç'lik baz dizisinin kromatogramı (bazların flüoresan pikleri) (BioEdit sequence alignment editor).



Şekil 3.5.b. *ChR* ile elde edilen ~170 bç'lik baz dizisinin kromatogramı (bazların flüoresan pikleri) (ters çevrilmemiş) (BioEdit sequence alignment editor).



Şekil 3.6.a. *CloF* ile elde edilen ~280 bç'lik baz dizisinin kromatogramı (BioEdit sequence alignment editor).



Şekil 3.6.b. *CloR* ile elde edilen ~280 bç'lik baz dizisinin kromatogramı (ters çevrilmemiş) (BioEdit sequence alignment editor).

3.2.2.2. AMS Yumurtalarından Elde Edilen *12S mtDNA* ve *16S rDNA* Dizilerinin Analizi ve Bunlar İçerinde *Ch* ve *Clo* Dizilerinin Taranması

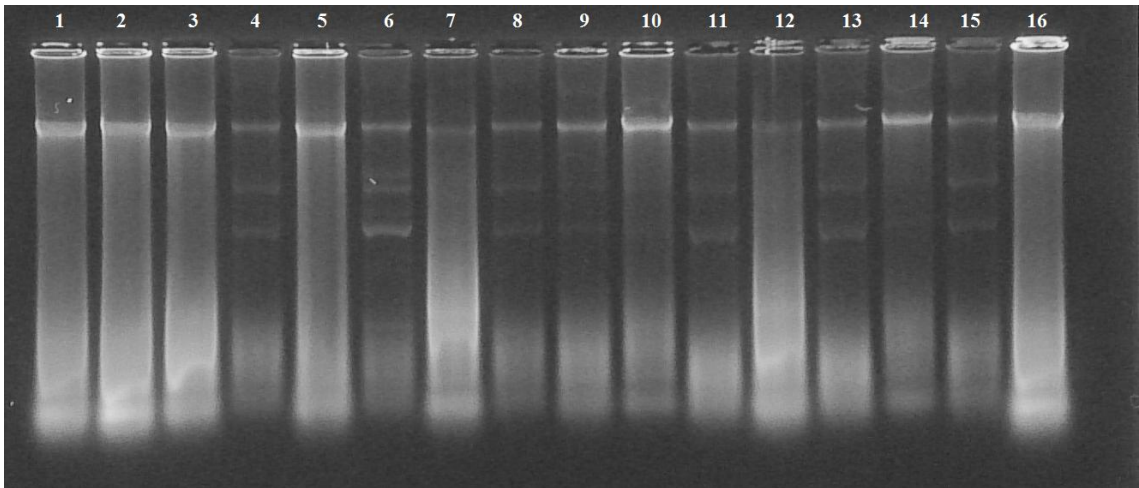
Ch ve *Clo* primerleri kullanılarak gerçekleştirilen daha önceki çalışmalarda çok spesifik olarak nitelendirilmesine karşın, sırasıyla 170 bç ve 280 bç'lik bantlara veya benzeri spesifik olmayan bir literatür verisine ulaşamadı. Ancak her iki primer çifti ile elde edilen fragment dizilerinin kendi içerisinde (ileri ve geri yönlü) birbirleriyle örtüşmesi ve bunlarla GenBank veri tabanında bir sonuç alınamaması nedeniyle;

- *Ch* ve *Clo* primerleri ile elde edilen PCR ürünleri spesifik bir bağlanmanın ürünü mü, yoksa spesifik olmayan bir bağlanmanın ürünü mü,
- Her iki durum için de geçerli olmak üzere; bu bağlanma bakteri genetik materyaline mi, AMS genetik materyaline mi, (diğer bir deyişle, bu baz dizisinin kalıbı hangi organizmaya ait,)
- Spesifik bir bağlanma ve bu bağlanma AMS genetik materyaline ise bu durum lateral gen transferinden mi kaynaklanıyor,
- Primerler spesifik olmayan bir şekilde bağlanıyorsa bile, sekans sonucu elde edilen baz dizisi nedir, sorularına cevap arandı.

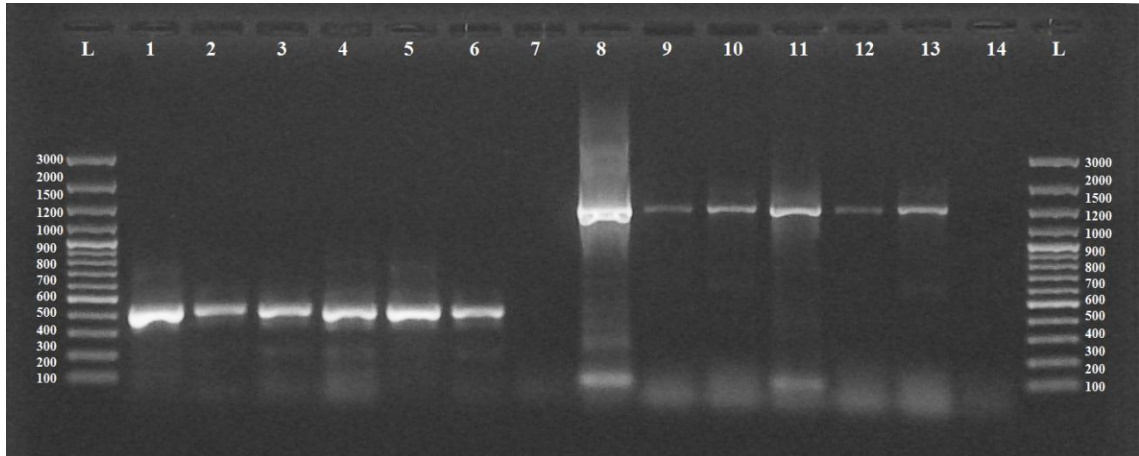
Bu durum ve soruları cevaplamak için arthropodlarda kullanılan mitokondrial DNA primeri (*12S mtDNA*, *CFR-CRR*) ile universal bakteri primeri (*16S rDNA*, *27F-1513R*)

(Tablo 2.5) kullanıldı. Ayrıca hem *12S mtDNA* ve *16S rDNA* primerlerinin hareket alanı daraltmak hem de söz konusu PCR ürünlerinin her nesilde tespit edilmesi nedeniyle AMS yumurtaları kullanıldı. Burada *16S rDNA* primeri ile kalıtılan bakterinin bulunup bulunmadığının belirlenmesi amaçlandı. Ayrıca *12S mtDNA* primer ürününün baz dizisi ile *Cardinium* primerleri ve bunların ürünleri arasında herhangi bir benzerlik olup olmadığının belirlenmesi amaçlandı.

Bunun için % 1'lik NaOCl ile yüzey sterilizasyonundan geçirilmiş yaklaşık 100'er yumurtadan izole edilen total DNA'lar (Şekil 3.7) *12S mtDNA* ve *16S rDNA* ile çoğaltıldı. PCR ürünlerinin elektroforezi sonucunda *12S mtDNA* primeri ile 400 bç'lik, *16S rDNA* primeri ile 1500 bç'lik fragmentler elde edildi (Şekil 3.8).



Şekil 3.7. Akdeniz meyve sineği yumurtalarından izole edilen total DNA'ların agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.



Şekil 3.8. Yumurta total DNA'larından *12S mtDNA* ve *16S rDNA* primerleri ile gerçekleştirilen PRC ile elde edilen ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü. [1. – 7. sütunlar *12S mtDNA* primeri ile (1, Y1; 2, Y2; 3 Y3; 4, Y4; 5, Y5; 6, Y6; 7 Negatif kontrol), 8. – 14. sütunlar *16S rDNA* primeri ile (7 PK; 8, Y1; 9 Y2; 10, Y3; 11, Y4; 12, Y5; 13, Y6; 14, Negatif kontrol). L, Ladder; Y, Yumurta total DNA izolatları].

12S mtDNA primer çiftinin PCR ürünlerinin dizi analizleri BioEdit programı kullanılarak düzenlendi. Bu dizilerin her birinin BLAST analizi GenBank veri tabanında yapıldı. BLAST analizi sonucunda *12S mtDNA* primeri ile elde edilen baz dizisi Spanos et al. [134] tarafından gerçekleştirilen AMS mitokondrial genomunun belirlendiği çalışmadaki sekans verisi (15980 bç) (GenBank: AJ242872.1) ile % 99 benzerlik görüldü. *12S mtDNA* primerleri CFR ve CRR'nın, bu 15980 bç'lik AMS mitokondrial DNA baz dizisinin sırasıyla 14248-14268 ve 14625-14650 bölgelerine bağlandığı görüldü (Tablo 3.1).

Hem *12S mtDNA* primeri ile elde edilen baz dizisinde hem de 15980 bç'lik mitokondrial DNA baz dizisinde, *Ch* ve *Clo* primerlerinin bağlanma olasılığı bulunan bir bölge olup olmadığı tarandı. Her iki baz dizisinde de *Cardinium* primerleri için bağlanma olasılığına sahip bölge tespit edilemedi.

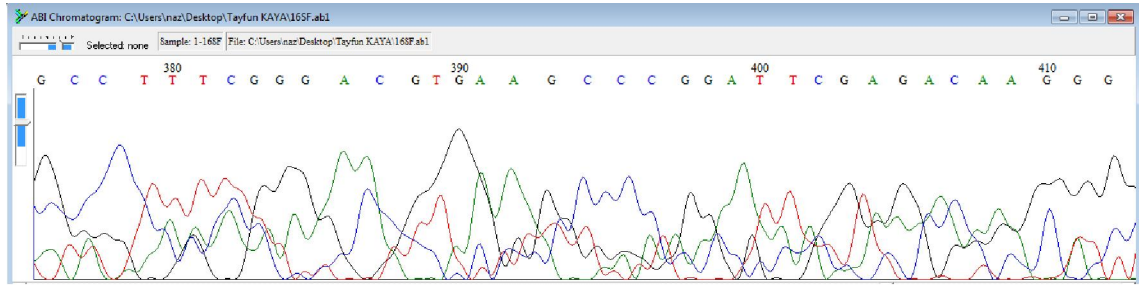
16S rDNA primer çiftinin PCR ürünlerinin dizi analizleri de BioEdit programı kullanılarak düzenlendi. *16S rDNA* primer çiftinin ileri ve geri yönlü dizilerinin oldukça karışık bir dizilime sahip oldukları belirlendi. Ayrıca her iki primerin de sekans piklerinde (kromatogramında) bazların üst üste geldiği, diğer bir deyişle iki farklı DNA sekansına benzer sonuçlar olduğu görüldü (Şekil 3.9 ve Şekil 3.10). Dolayısıyla da primer çiftleri arasında bir düzenleme gerçekleştirilemedi.

Tablo 3.1. *12S mtDNA (CRF-CRR)* primer setinin, Spanos et al. [134] tarafından gerçekleştirilen *C. capitata* mitokondrial genomunda belirlenen bağlanma bölgeleri. (GenBank, AJ242872.1'den alınmıştır)

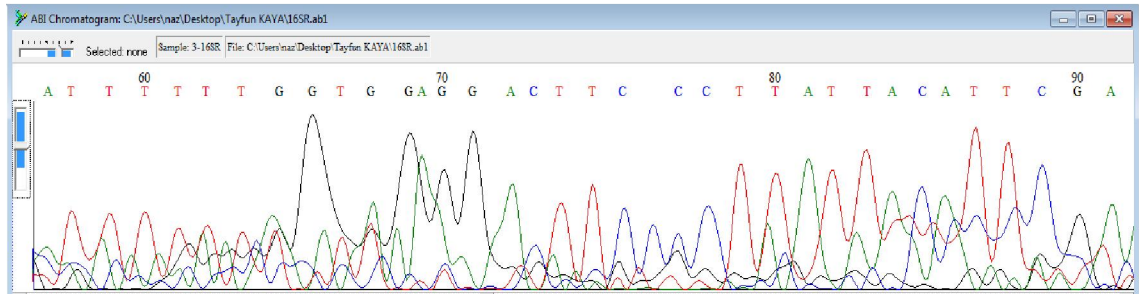
<i>12S</i>	<i>CFR</i>	5'- G GAGAGTGACGGGCGAT A TGT-3'
<i>mtDNA</i>	<i>CRR</i>	5'-AAACCAGGATTAGATACCCTATTAT-3' // 3'-ATAATAGGGTATCTAATCCTGGTTT-5'

Baz dizisi (5' → 3')

14221	ATGTTACGAC	TTATCTTACC	TTAATAGT AA	GAGTGACGGG	CGAT G TGTGC	ATATTTTAGA
14281	GCTAAAATCA	AAACTATAAT	CTTTTAATTT	TTACTATCAA	ATCCACCTTC	ATTAAAATAT
14341	TTAAAAATTA	AATCCGTTTA	AATAAATTTA	TTGTAACCCA	TCTCTTCTTA	AATATAAGCT
14401	ACACCTTGAT	CTGATATAAA	TTATAAACTA	AATTATTGAA	AATTATTATT	CTAATAAAAT
14461	ATTCTGATAA	CGACGGTATA	TAAACTGAAA	AACAAATTTA	AGTGAGGTAC	ATCGTGGATT
14521	ATCAATTATA	GGACAGGTTC	CTCTGAATAG	ACTAAAATAC	CGCCAAATTT	TTTAAGTTTC
14581	AAGAACATAA	CTAATACTAC	CTAAGTGCTT	ATTTTACAT	TTTAA ATAAT	AGGGTATCTA
14641	ATCCTAGTTT	TTAATTAAAA	TTTACAAGCT	TCACTAATTC	AATTATAAAA	ATTAATAAAT



Şekil 3.9. *16S rDNA* 27F ile elde edilen baz dizisinin kromatogramı (BioEdit sequence alignment editor).

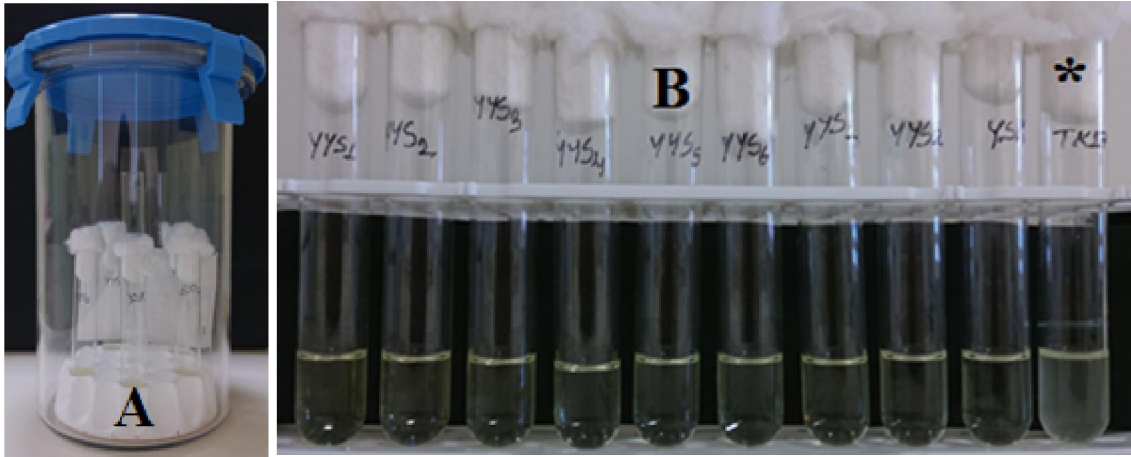


Şekil 3.10. *16S rDNA* 1573R ile elde edilen baz dizisinin kromatogramı (BioEdit sequence alignment editor).

3.2.3. Akdeniz Meyve Sineği Yumurtasının Yüzey Sterilizasyonu ve Bakteri Taraması

Yumurtaların yüzey sterilizasyon süreci, yumurtadan DNA izolasyon süreci ve PCR süreçleri ayrı ayrı kontrol edilerek herhangi bir kontaminasyonun olmadığı bilinen yumurta total DNA'sında birden fazla bakterinin genetik materyali nasıl bulunur, sorusuna cevap arandı.

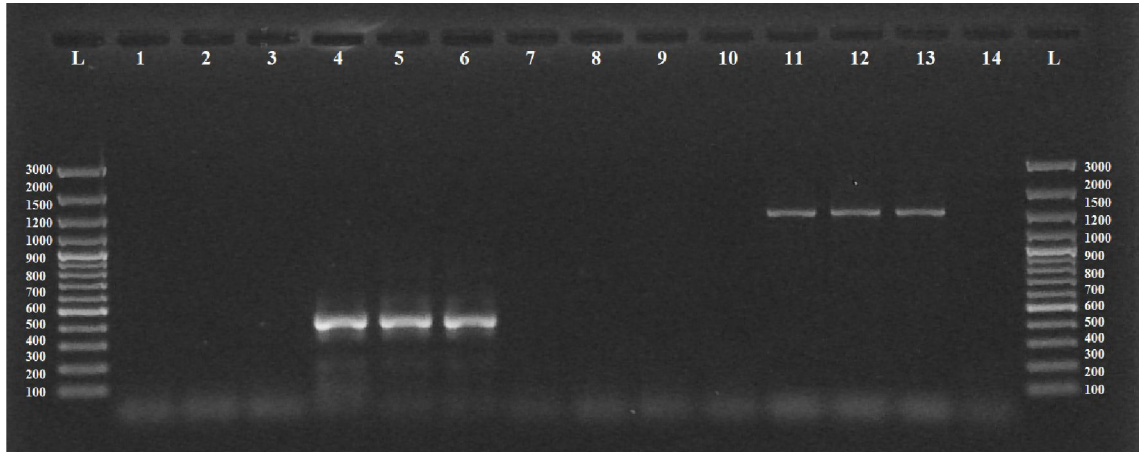
Olası kontaminasyonları önlemek ve belirlemek için; (yaklaşık 1 saatlik ve en fazla 10 tane) AMS yumurtalarının yüzey sterilizasyonu % 5'lik NaOCl ile gerçekleştirildi. Yüzey sterilizasyonunun gerçekleştirilip gerçekleştirilemediği, yıkama suyundan genel besiyeri olan nutrient broth besiyerine ekim yapılarak, hem anaerobik hem de anerobik ortamda inkübe edilerek kontrol edildi (Şekil 3.11).



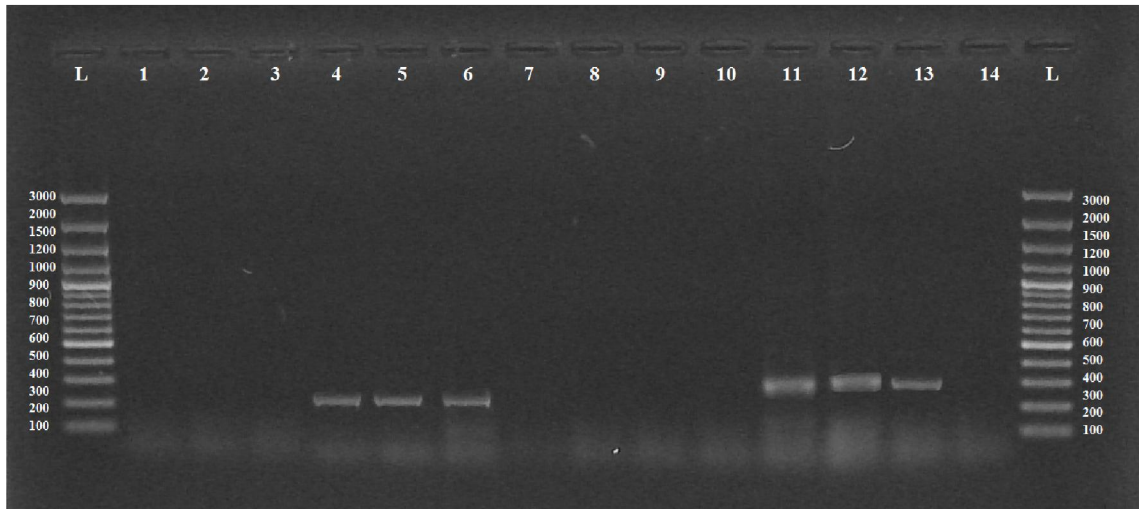
Şekil 3.11. Yumurta yüzey sterilizasyonunun kontrolü (A, Anaerobik koşullarda inkübasyon; B, Aerobik koşullarda inkübasyon; *, Pozitif kontrol, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)).

Ayrıca yumurtalardan DNA izolasyonu sırasında; sterilizasyon sürecinin kontrolü için (SK), kullanılan tüplerin ve DNA izolasyon sürecinin kontrolü için (İK), DNA sulandırma suyu (SSK) ve bütün çalışmalarda kullanılan PCR karışımının hazırlandığı su (MK) bu çalışmaların her bir aşamasının kontrolü için kullanıldı.

Bu aşamalar sonrasında yüzeyinde bakteri bulunmayan yumurtalardan total DNA izolasyonu gerçekleştirilerek *12S mtDNA*, *16S rDNA*, *Ch* ve *Clo* primer çiftleriyle çoğaltıldı (Şekil 3.12 ve Şekil 3.13).



Şekil 3.12. Yüzey strilizasyonu gerçekleştirilmiş AMS yumurta total DNA izolatlarından *12S mtDNA* ve *16S rDNA* primerleri ile gerçekleştirilen PRC ile elde edilen ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü. [1. – 7. sütunlar *12S mtDNA* primeri ile (1 SK; 2, İK; 3 SSK; 4, YYS1; 5, YYS2; 6, YYS3; 7, Negatif kontrol), 9. – 15. sütunlar *16S rDNA* primeri ile (8 SK; 9, İK; 10 SSK; 11, YYS1; 12, YYS2; 13, YYS3; 14, Negatif kontrol). L, Ladder; SK, Yüzey sterilizasyon sürecinin kontrolü; İK, DNA izolasyon sürecinin kontrolü; SSK, DNA sulandırma suyu kontrol; YYS, Yumurta yüzey sterilizasyonu yapılmış örnekler].



Şekil 3.13. Yüzey strilizasyonu gerçekleştirilmiş AMS yumurta total DNA izolatlarından *Ch* ve *Clo* primerleri ile gerçekleştirilen PRC ile elde edilen ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü. [1. – 7. sütunlar *Ch* primeri ile (1 SK; 2, İK; 3 SSK; 4, YYS1; 5, YYS2; 6, YYS3; 7, Negatif kontrol), 9. – 15. sütunlar *Clo* primeri ile (8 SK; 9, İK; 10 SSK; 11, YYS1; 12, YYS2; 13, YYS3; 14, Negatif kontrol). L, Ladder; SK, Yüzey sterilizasyon sürecinin kontrolü; İK, DNA izolasyon sürecinin kontrolü; SSK, DNA sulandırma suyu kontrol; YYS, Yumurta yüzey sterilizasyonu yapılmış örnekler].

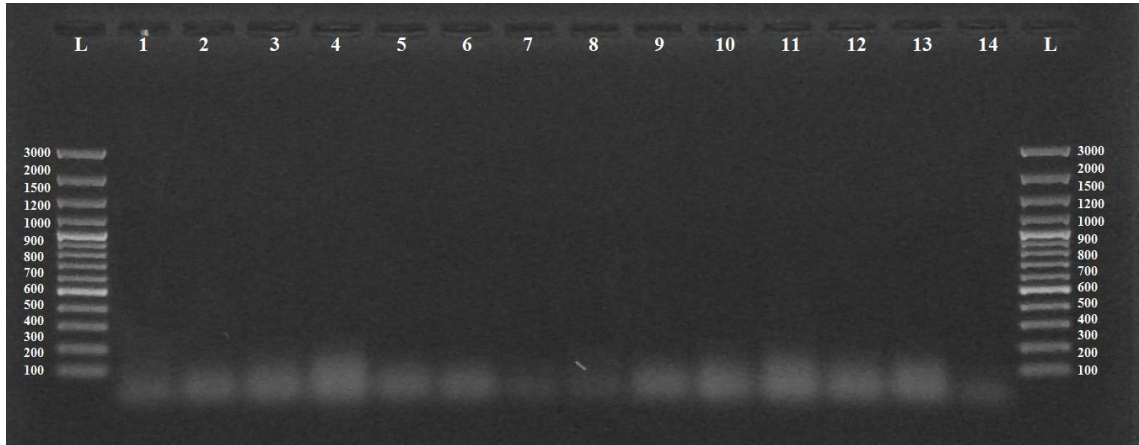
16S rDNA primer çiftinin PCR ürünlerinin dizi analizleri tekrarlandı. Ancak aynı şekilde her iki primerin de sekans kromatogramında birden fazla DNA'ya ait bazların

olduğu görüldü. Dolayısıyla yine primer çiftleri arasında düzenleme yapılamadığı gibi; *Ch* ve *Clo* primerleri ile elde edilen PCR ürünlerini açıklayabilecek bir *16S rDNA* verisi de elde edilememiştir.

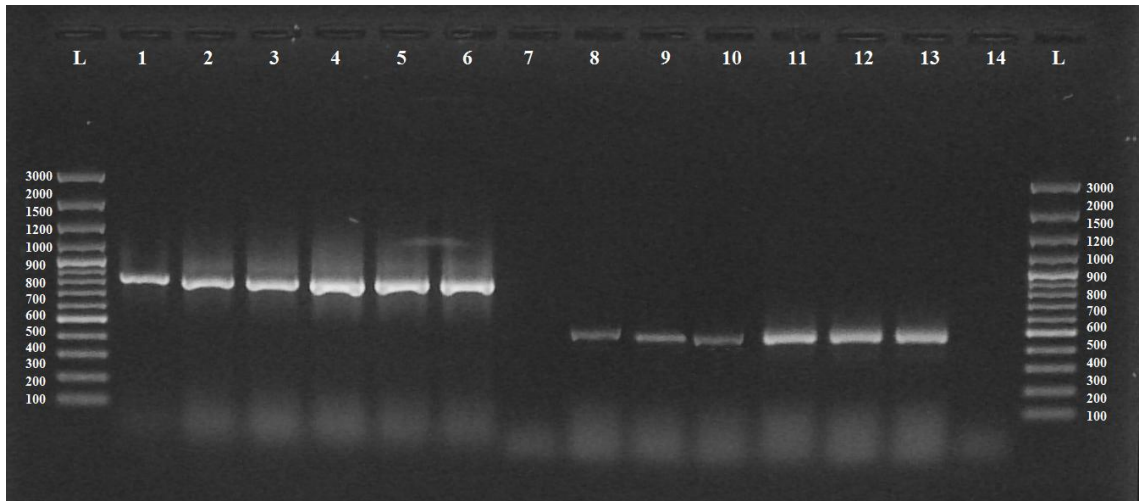
3.2.4. *Arsenophonus*, *Hamiltonella*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* Taraması

Yumurtaların; yüzey sterilizasyon, DNA izolasyon ile PCR süreçleri ayrı ayrı kontrol edilerek herhangi bir kontaminasyonun olmadığı bilinen yumurta total DNA'sında bakteri(leri)n bulunmakta ancak bu durum literatür verilerine göre AMS'de daha önce belirtilmemektedir.

16S primeri ile elde edilen bu sonucu açıklamak için yine artropodlarda endosimbiyont olarak bulunan *Arsenophonus*, *Hamiltonella*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* bakterileri için spesifik primerler (sırasıyla *ArsF-R2* ve *R3*, *HamF-R*, *RbF-RbR*, *63F-TK55*) (Tablo 2.5) kullanıldı. Bu çalışmalar toplam 35 AMS total DNA'sı [20'si ergin birey (10♂/10♀), 5'i larva, 5'i pupa ve 5 yüzey sterilizasyonu yapılmış (her birinde 10'ar) yumurta] kullanılarak gerçekleştirildi. *Arsenophonus* (*ArsF-R3*), *Hamiltonella* (*HamF-R*) ve *Rickettsia* (*RbF-R*) primerleri ile herhangi bir PCR ürünü elde edilemedi. Diğer yandan *Arsenophonus* (*ArsF-R2*) primeri ile ~800 bp'lik ve *Spiroplasma* (*63F-TK55*) primeriyle ise ~500 bp'lik PCR ürünler elde edildi (Şekil 3.14 ve Şekil 3.15). Bu sonuçlar AMS kültüründen rasgele seçilen ergin (dişi, erkek), larva ve pupa aşamaları olmak üzere 25'er birey üzerinden 3 nesilde (F30-F33) ayrıca gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.14. *Arsenophonus* (*ArsF-R3*), *Hamiltonella* (*HamF-R*) ve *Rickettsia* (*RbF-R*) primerleri ile gerçekleştirilen PRC ile elde edilen ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü. [1. – 4. sütunlar *ArsF-R3* primeri ile (1 P; 2, EE; 3 ED, 4, Negatif kontrol), 5. – 9. sütunlar *HamF-R* primeri ile (5, P; 6, EE; 7, ED; 8, ED; 9, Negatif kontrol), 10. – 15. sütunlar *RbF-R* primeri ile (10 P; 11, EE; 12 ED; 13, ED; 14, Negatif kontrol). L, Ladder; P, Pupa; EE, Ergin erkek; ED, Ergin dişi].



Şekil 3.15. *Arsenophonus* (*ArsF-R2*) ve *Spiroplasma* (*63F-TK55*) primerleriyle elde edilen PCR ürünlerinin elektroforezindeki jel görüntüsü. [1. – 7. sütunlar *ArsF-R2* primeri ile (1, YYS; 2, L; 3, P; 4, EE; 5, ED1; 6, ED2; 7, Negatif kontrol), 8. – 15. sütunlar *63F-TK55* primeri ile (8, YYS; 9, L; 10 P; 11, EE; 12, ED1; 13, ED2; 14, Negatif kontrol). L, Ladder; YYS, Yüzey sterilizasyonu yapılmış yumurta; L, Larva; P, Pupa; EE, Ergin erkek; ED, Ergin dişi].

Ortaya çıkan bu durum yüzey **steilizasyonu** gerçekleştirilen yumurtada 16S rDNA primerinin çalışmasını açıklamakla birlikte bunun sonucunda elde edilen sekans verisindeki baz çakışmasını da (sekans verilerinin iki ayrı DNA varlığından dolayı karışık olması durumunu) açıklamaktadır. Ancak bu durum, şuana kadar ki literatür verilerinde rastlanmayan şekilde AMS’de *Arsenophonus* ve *Spiroplasma* enfeksiyonunu göstermektedir.

3.2.4.1. *Arsenophonus* Primerleri (*ArsF-R2*) ile Elde Edilen Dizinin Analizi

ArsF-R2 ile elde edilen PCR ürünlerine ait diziler BioEdit programı ile düzenlendi. PCR ürünün yaklaşık 800 bp uzunluğunda olduğu belirlendi ve bu dizilerin her birinin BLAST analizi GenBank veri tabanında yapıldı. BLAST analizi sonucunda % 87 - % 89 arasında değişen oranlarda *Arsenophonus* ile benzerlik göstermiştir (sırasıyla GenBank no; M90801.1, AY264674.1, JN204470.1, NR042811.1, FN545282.1). Bunlardan % 89 oranında benzerlik gösteren Wilkes et al. [135] tarafından gerçekleştirilen *Nasonia vitripennis*'in endosimbiyontu olan *Arsenophonus*'a ait 5617 bp'lık *rDNA* bölgesinin belirlendiği çalışmadaki sekans verisi (GenBank: FN545282.1) üzerinde ayrıntılı analiz yapıldı. Buna göre *ArsF* primerinin Wilkes et al. [135] tarafından elde edilen dizinin 666-690, *ArsR2* primerinin ise bu dizinin 1449-1470 bölgelerine bağlandığı görüldü (Tablo 3.2). Bu 804 bp'lık bölge ile AMS'den *ArsF-R2* primerleri ile elde edilen bazı dizileri BioEdit programı kullanılarak ayrıca hizalandığında da benzer şekilde bir eşleşme olduğu görüldü.

Tablo 3.2. *ArsF*-R2 primer çifti ile elde edilen yaklaşık 800 bp uzunluğundaki dizi ile % 89 oranında benzerlik gösteren Wilkes et al. [135] tarafından *N. vitripennis*'in simbiyontu *Arsenophonus*'dan elde edilen linear DNA bölgesi.

<i>Arsenophonus</i>	<i>ArsF</i>	5'- GGGTTGTAAAGTACTTTCAGTCGT -3'				
	<i>ArsR2</i>	5'- GTAGCCCTRCTCGTAAGGGCC -3' // 3'- GGCCCTTACGAGRAGGGCTAC -5'				

Baz dizisi

661	GCCTTCGGGT	TGTAAAGTAC	TTTCAGTCGT	GAGGAAGGTG	TTAAGGTAA	TAAGCTTAGC
721	AATTGACGTT	AGCGACAGAA	GAAGCACCGG	CTAACTCCGT	GCCAGCAGCC	GCGGTAATAC
781	GGAGGGTGCG	AGCGTTAATC	GGAATTACTG	GGCGTAAAGG	GCACGCAGGC	GGTTAATTAA
841	GTTGGATGTG	AAATCCCCGG	GCTTAACCTG	GGAATGGCAT	TCAAGACTGG	TTAGCTAGAG
901	TCTTGTAGAG	GGGGGTAGAA	TTCCATGTGT	AGCGGTGAAA	TGCGTAGAGA	TGTGGAGGAA
961	TACCGGTGGC	GAAGGCGGCC	CCCTGGACAA	AGACTGACGC	TCATGTGCGA	AAGCGTGGGG
1021	AGCAAACAGG	ATTAGATACC	CTGGTAGTCC	ACGCTGTAAA	CGATGTCGAT	TTGGAGGTTG
1081	TGGTCAAGAA	CTGTGGCCTC	CGGAGCTAAC	GCGTTAAATC	GACCGCCTGG	GGAGTACGGC
1141	CGCAAGGTTA	AAACTCAAAT	GAATTGACGG	GGGCCCCGAC	AAGCGGTGGA	GCATGTGGTT
1201	TAATTCGATG	CAACGCGAAG	AACCTTACCT	ACTCTTGACA	TCCAGAGAAG	CTTTTAGAGA
1261	TAGAGGCGTG	CCTTCGGGAA	CTTTGAGACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTT
1321	GTGAAATGTT	GGGTAAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAACCCTT	ATCCTTTGTT	GCCAGCGATA
1381	CGGTCGGGAA	CTCAAAGGAG	ACTGCCGGTG	ATAAACCGGA	GGAAGGTGGG	GATGACGTCA
1441	AGTCATCATG	GCCCTTACGA	GTAGGGCTAC	ACACGTGCTA	CAATGGCGTA	TACAGAGAGA

3.2.4.2. *Spiroplasma* Primerleri (63F-TK55R) ile Elde Edilen Dizinin Analizi

63F-TK55 ile elde edilen PCR ürünlerine ait diziler BioEdit programı ile düzenlendi. PCR ürününün yaklaşık 420 bp uzunluğunda olduğu belirlendi ve bu dizilerin her birinin BLAST analizi GenBank veri tabanında yapıldı. Dizilerin GenBank'daki direk BLAST analizinde % 99 benzerlik oranı ile *Bacillus* türlerine ait olduğu görüldü (KF600526.1, KC463008.1, JX064906.1). Bunun üzerine kapsamı daraltmak adına BLAST analizi iki şekilde daha gerçekleştirildi. Birincisinde BLAST analizi *Spiroplasma* cinsine yönelik yapılırken; ikincisinde artropodlarda endosimbiyont olarak bulunan *S. ixodetis* ve *S. poulsonii* için yapıldı. Bunun sonucunda *Spiroplasma* cinsine yönelik analizinde % 79 - % 89 arasında değişen benzerlik oranları elde edildi (CP002082.1, FJ821699.1, NR_104751.1). Diğer taraftan *S. ixodetis* yönelik analizde herhangi bir benzerlik oranı elde edilemezken *S. poulsonii* analizinde ise % 84'lük benzerlik oranı (NR_044672.1) elde edildi. Bu % 84 oranında benzerlik gösteren Weisburg et al. [136] tarafından gerçekleştirilen ve *S. poulsonii*'ye ait 1467 bp'lık 16S rRNA5617 bölgesinin belirlendiği çalışmadaki sekans verisi (GenBank: NR_044672.1) kullanılarak ayrıntılı analiz yapıldı (Tablo 3.3). Bu 453 bp'lık bölge ile AMS'den 63F-TK55R primerleri ile elde edilen yaklaşık baz dizileri BioEdit programı kullanılarak ayrıca hizalandığında da benzer şekilde bir eşleşme olduğu görüldü

Tablo 3.3. 63F-TK55R primer çifti ile elde edilen yaklaşık 800 bp uzunluğundaki dizi ile % 84 oranında benzerlik gösteren Weisburg et al. [136] tarafından *S. poulsonii*'ye ait olduğu belirtilen *16S rRNA* bölgesi.

Spiroplasma	63F	5'- GCCTAATACATGCAAGTCGAAC -3'				
	TK55R	5'- TAGCCGTGGCTTTCTGGTAA -3' // 3'- TTACCAGAAAGCCACGGCTA- 5'				

Baz dizisi

1	TTTNATGAGA	GTTTGATCCT	GGCTCAGGAT	TAACGCTGGC	GGCATGCCTA	ATACATGCAA
61	GTCGAACGGG	GTGCTTGCAC	CCAGTGGCGA	ACGGGTGAGT	AACACGTATC	TAATCTACCC
121	ATTAGCAGGG	GATAACAGTT	GGAAACGACT	GCTAATACCG	CATACGACAT	TTTCTGGCAT
181	CAGAGAATGT	TAAAAGGTCC	GTTTGGACCA	CTAATGGATG	AGGGTGCGGC	GTATTAGTTA
241	GTTGGTGGGG	TAATGGCCTA	CCAAGACAGT	GATACGTAGC	CGAACTGAGA	GGTTGAACGG
301	CCACATCGGG	ACTGAGACAC	GGCCCGAACT	CCTACGGGAG	GCAGCAGTAG	GGAATTTTTC
361	NCAATGGGCG	AAAGCCTGAT	GGAGCAATGC	CGCGTGACTG	AAGACGGTCT	TCGGATTGTA
421	AAGGTCTGTT	GTAAGGGAAG	AACAGTAGGT	ATAGGAAATG	ATACTTATTT	GACGGTACCT
481	TACCAGAAAG	CCACGGCTAA	CTATGTGCCA	GCAGCCGCGG	TAATACATAG	GTGGCAAGCG

4. BÖLÜM

TARTIŞMA – SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1. Tartışma

Küresel çapta yayılışa ve ekonomik zarara neden olmasından dolayı hem AMS'nin biyolojisinin aydınlatılmasına hem de AMS ile mücadeleye yönelik çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar temelde canlı AMS bireyleri üzerinde ve genel olarak da kültüre alınarak ve/veya kitle üretimi gerçekleştirilerek yapılmaktadır. AMS'nin üretiminde ve kültüre alınmasında; uygun abiyotik şartların oluşturulması, uygun kafeslerin kullanımının yanı sıra yumurtaların açılması ve larva gelişim ortamları ile bunların optimizasyonun gerekliliği vurgulanmaktadır [124, 126, 137].

Canlılarla yürütülen, kültüre alınarak gerçekleştirilen, çalışmalarda popülasyon biyolojisine uygun koşulların gereksinimi vazgeçilmez olarak görülmektedir. Özellikle de laboratuvar ortamında bu çalışmalar doğal ortam koşulları oluşturularak gerçekleştirilmektedir. AMS kültürlerinde de abiyotik faktörler yaşam döngüsü ve kültür verimliliği üzerinde rol oynamaktadır. Öyle ki, çiftleşme, yumurta bırakma, yumurtaların açılması, beslenme, birey ölümleri ile larva ve pupa evrelerinde bireylerin gelişimleri üzerinde sıcaklık, nem ve ışık gibi çevresel koşullar son derece önemlidir. 25°C, % 60 nispi nem ve 600 lüks ışık AMS için optimum koşullar olarak nitelendirilmektedir. Dolayısıyla AMS ile laboratuvar ortamında yapılan çalışmalarda genel olarak bu koşulların sağlanabildiği insektaryumlarda gerçekleştirilebilmektedir [124, 137, 138].

Bu çalışmada, AMS'nin kültüre alınması ve üretimi için buzdolabı modifiye edilerek insektaryum olarak kullanılmıştır. Kullanılan insektaryum sadece bu çalışmadaki amacı için değil benzer çalışmalardaki gereksinimleri de karşılayabilecek şekilde tasarlanmıştır. İnsektaryumun *i)* sıcaklık, nem ve ışık gibi parametrelerinin kontrol altında tutulabilmesi ve bunların ayrı ayrı kontrol edilebilmesi; *ii)* ortam sıcaklığındaki değişmelere karşı izolasyonlu bir yapıda olması; *iii)* kabin formatında, yani bağımsız olmasından dolayı hareket ettirilebilmesi; *iv)* hijyen koşullarının kolaylıkla uygulanabilmesi; *v)* kapasitesi nedeniyle gereksinimler doğrultusunda benzer çalışmalar için kullanılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca birden fazla böcek kültürü hatta bitki kültür çalışmaları için de uygun olduğu düşünülmektedir. Öyle ki, insektaryumda başta

AMS olmak üzere *Sitophilus granarius*, *Sitophilus oryzae*, *Drosophilla* spp., kültüre alınmıştır. Hali hazırda AMS kültürü 32. nesil ile devam ettirilirken; *S. glabrata* kültürü 9., *S. oryzae* kültürü ise 5. nesildedir.

AMS kültürü için bir diğer gereksinim ise kültürün devamlılığı ve verimliliği için popülasyon bireylerine uygun kafeslerin kullanımıdır. Bu amaçla ahşap ve sineklik (veya tülbent) bazlı (Tezcan ve Zümreoğlu 1986;) [124, 126] kafesler ile plastik bazlı kafesler [139] kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Ancak gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılan kafeslere ilişkin olarak avantaj/dezavantaj yönüyle herhangi bir değerlendirme yapılmamış ve hatta bazı çalışmalarda ölçüleri dışında herhangi bir bilgi verilmemektedir. Sadece bu çalışmada denenen kafes tiplerinden yola çıkarak; AMS kültürü için, başta ışık girişine engel olmayacak tarzda malzemelerden yapılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir. Diğer yandan yumurtaların bırakıldığı kısımda kullanılacak malzeme özelliklerinin (et kalınlığı, rengi, vb.) gibi faktörlerin hem kültürün devamlılığı hem de kültüre müdahale noktasında rol oynadığı gözlemlenmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada kapsamında geliştirilen insektaryum ve kafes sistemleri ile ilk kez AMS'nin laboratuvar koşullarında kültürü için gerekenler ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Türkiye’de AMS’inde aralarında bulunduğu meyve sinekleri ile gerçekleştirilen çalışmalarda genel olarak dört başlık altında gerçekleştirilmiştir. Bunlar, yayılışına [31, 49, 140], biyolojisinin belirlenmesine ve kültür koşullarının (larva besin ortamı, üretimi, vb.) optimizasyonuna [52, 126], kimyasal tabanlı mücadelesine [5] ve önemine [4, 36] yönelik olarak gerçekleştirilen çalışmalardır. Yayılışına yönelik gerçekleştirilen çalışmalarda AMS ve diğer meyve sineklerinin narenciye gibi konukçuların bulunduğu ılıman iklim koşullarına sahip bölgelerde, Akdeniz, Ege ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde, yayılış gösterdiği belirtilmektedir [31, 49, 140]. Bu çalışma kapsamında Doğu Akdeniz ve Ege bölgesi (Hatay-İzmir) arasındaki sahil şeridinde AMS enfekteli meyvelerin elde edilmesi yoluyla gerçekleştirilen arazi çalışmalarında da AMS'nin benzer şekilde yayılış gösterdiği gözlenmiştir.

Dünyada ise tarımsal üretim özellikle de meyve üretimi üzerinde tehdit arz eden zararlılara yönelik çalışmalarda, Türkiye’deki çalışmaların yanı sıra, daha çevreci, etkili ve sürdürülebilir kısır böcek tekniği (KBT) (sterile insect technique, SIT) mücadele

yöntemleri üzerinde durulmaktadır [7, 55, 54, 141]. Bu yöntemlerin temelinde multidisipliner bir yaklaşımla, bakteriler [57, 69, 70], sıcaklık [59], radyasyon ve antibiyotik [60] gibi birçok farklı bileşen ayrı ayrı kullanılabildiği gibi entegre mücadele birlikte de kullanılmaktadır. Dünyada zararlılar ile mücadele için bu şekilde alternatif yöntemlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapılırken Türkiye’de benzer şekilde ayrıntılı bir çalışma bulunamamıştır.

Tarımsal ürün zararlılarının etkilerinin tarladan pazara görülmesi [4] ve bunlarla mücadelede kullanılan insektisitlerin de (çevre ve insan sağlığı açısından) tehdit olarak nitelendirilmesi nedeniyle [7, 55, 141] son yıllarda zararlı etkileri olmayan yöntemlerin geliştirilmesi için çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalarda zararlının yok edilmesi yerine zararının en az seviyede tutulmasını sağlayacak şekilde popülasyon sayısının baskılanması amaçlanmaktadır [10, 24]. Bunun için önerilen yöntemlerden biri olarak yumurta yoluyla kalıtılan ve konakçısının üreme şeklini manipüle eden bakterilerin kullanımı olarak gösterilmektedir. Dolayısıyla da bu bakterilere yönelik artropodlarda gerek tarama gerekse bunların konakçı fenotipi ve genotipi üzerine etkilerine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmektedir [7, 13, 14, 16, 24]. Sekonder simbiyont (endosimbiyont) olarak adlandırılan bu bakteriler; *Wolbachia* [70, 77], *Arshenophonus* [118, 119, 142], *Cardinium* [14, 84], *Hamiltonella* [122, 123, 143], *Rickettsia* [83, 110, 144, 145] ve *Spiroplasma*’dır [79, 112, 113]. Bu bakterilerin gerek konakçısı ile ilişkisi gerekse bu ilişkinin konakçısı ile mücadele için kullanılabilmesi nedeniyle, son yıllarda popüler çalışma konusu olmuştur. Türkiye’de ise bu bakterilere yönelik olarak sadece Toprakçı ve Göçmen [146] tarafından *Wolbachia*’nın önemini ve konakçılarıyla ilişkisini ortaya koyan derleme çalışması bulunabilmiştir. Ancak bu çalışma ile gerek coğrafi konumu gerekse zengin böcek faunasına sahip Türkiye’de ilk kez, böceklerin özellikle de zararlıların üreme davranışına müdahale şeklinde etki eden ve gelecek vaat eden, endosimbiyotik bakterilere yönelik bir tarama yapılmıştır. Ayrıca AMS’nde ilk kez bu 6 endosimbiyont bir arada taranmıştır. Dolayısıyla buradan elde edilen verilerin daha sonra gerçekleştirilecek çalışmalar için kaynak oluşturacağı düşünülmektedir.

Bu endosimbiyontların konakçısı durumundaki arthropodların yeryüzündeki toplam birey sayısı göz önüne alındığında bu bakterilerin en yaygın bakteri grubu olduğu da ifade edilmektedir [147-149]. Bu nedenle yeni ve farklı karakterlere sahip sekonder simbiyontların belirlenmesine yönelik olarak her geçen gün farklı böcekler üzerinde

taramalar yapılmaktadır. Öyle ki artropodlarda maternal olarak kalıtılan ve en iyi bilinen *Wolbachia*'nın ve diğer endosimbiontların belirlenmesi, bunlar ile konakçıları arasındaki ilişkinin belirlenmesinin acil bir ihtiyaç olduğu vurgulanmaktadır [23]. Hatta bu doğrultuda gerçekleştirilen Duron et al. [23] tarafından yapılan bu çalışmanın başlığı 'Artropodlar arasında üreme parazitlerinin çeşitliliği: *Wolbachia* yalnız yürümüyor' (The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone) şeklinde atılmıştır.

Bu doğrultuda gerçekleştirilen Weeks et al. [20] tarafından yapılan bir çalışmada aralarında Tephritidae familyasına ait *Neotephritis* sp.'nin de bulunduğu toplam 223 farklı tür üzerinde *Wolbachia* ve *Cardinium* (*Clo* primeri ile)'a yönelik tarama yapılmıştır. Çalışma sonucunda 223 türün 16'sında (~% 7) *Cardinium*, 49'unda (~% 22) *Wolbachia* ve 7'sinde (~% 3) hem *Cardinium* hem *Wolbachia* enfeksiyonu tespit edilirken; *Neotephritis* sp.'de ise herhangi bir enfeksiyona rastlanmadığı ifade edilmiştir. Zchori-Fein and Perlman [14] tarafından gerçekleştirilen çalışmada da aralarında AMS'nin de bulunduğu 99 böcek türünde *Wolbachia* (*wspec*, *wsp* primerleri ile) ve *Cardinium* (*Ch* ve *Clo* primerleri ile) taraması yapılmış; bunların % 6'sında *Cardinium*, % 24'ünde *Wolbachia* enfeksiyonu tespit edildiği, AMS dahil diğerlerinde ise her iki bakteri enfeksiyonunun olmadığı belirtilmiştir. Bourtzis et al. [150] tarafından yapılan bir diğer çalışmada *Drosophila melanogaster* ile AMS'de *Wolbachia* enfeksiyonu incelenmiş ve *D. melanogaster*'de *Wolbachia*'nın tespit edildiği ancak AMS'nde ise enfeksiyona rastlanılmadığı ifade edilmiştir. Duron et al., [23] tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise 2003 yılında Fransa'dan temin edilen AMS de (11 birey, 3♂/8♀) dahil 136 artropod türü üzerinde *Wolbachia* (*16Swolb76-99f* ve *16Swolb1012-994r*; *wsp* primerleri *81F/522R*, *172F/691R*, *81F/484R* ve *136F/691R* ile) ve *Cardinium*'un (*CLO-f1/CLO-r1*, *ChF/CLOr1* primerleri ile) da aralarında bulunduğu 7 endosimbiyontla yönelik tarama gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda da AMS'nde her iki bakterinin tespit edilmediği bildirilmiştir. Rocha et al. [151] tarafından Brezilya'da yapılan bir diğer çalışmada ise AMS'de *Wolbachia* (*Wspec* primeri ile) taraması yapılmış ve çalışma sonucunda GenBank veri tabanında *Wolbachia* tip A grubu ile % 95-98 benzerlik gösteren sonuçlar elde edildiği belirtilmiştir. Ancak bu çalışma dışında *C. capitata*'da *Wolbachia* enfeksiyonuna dair herhangi bir literatür verisi ve bilgisi bulunamamıştır. Diğer çalışmalardan farklı olarak, AMS'nde

Wolbachia bakterisinin tespit edildiği Rocha et al. [151] tarafından yapılan çalışmada, henüz kanıtlanamamış olmasına rağmen, bu durumun Brezilya'nın da içerisinde yer aldığı tropikal ("neotropical") bölgeye has bir durum olduğu ifade edilmiştir. Bu çalışmada da *Wolbachia* spesifik primerlerle (*Wspec* ve *Wsp*) Türkiye'de ilk olarak Doğu Akdeniz-Ege Bölgesi (Hatay-İzmir) arasında bir böcek türü, AMS, taranmıştır. Ancak daha önceki çalışmalardaki sonuçlara benzer şekilde AMS'nde *Wolbachia* enfeksiyonu tespit edilmemiştir.

Diğer yandan *Cardinium*'a yönelik olarak Duron et al., [23] ve Zchori-Fein and Perlman [76] tarafından da AMS'de *Ch* ve *Clo* primerleri ile taramamalar gerçekleştirilmiştir. Ancak ne bu çalışmalarda ne de söz konusu primerlerle gerçekleştirilen diğer çalışmalarda [20, 69, 149, 152, 153]; bu primerler için spesifik olmayan ya da bu çalışmada elde edilen boyutta bir PCR ürününe ilişkin bir bilgiye yer verilmemiştir. Dolayısıyla bu çalışmadan *Ch* ve *Clo* ile elde edilen sırasıyla 170 bp ve 280 bp'lik PCR ürünleri, herhangi bir literatür verisine göre yorumlanamamıştır. Diğer yandan AMS bireylerine, *Cardinium* enfeksiyonu üzerinde etkili olan, antibiyotik uygulamasına karşın; söz konusu primerler ile elde edilen PCR ürünlerinin kaybedilememiş olması, bunların AMS genetik materyalinden kaynaklı spesifik olmayan bir bağlanmanın ürünü olduğunu düşündürmektedir. Bu durumu düşündüren bir başka husus ise bunların AMS kültüründe her nesilde ve yüzey sterilizasyonu yapılmış yumurtada da tespit edilmesidir. Ancak bu primerlerin ve PCR ürünlerinin baz dizileri hem bu çalışmadaki AMS'nden elde edilen 410 bp'lik mitokondrial gen bölgesinde hem de Spanos et al. [134] tarafından belirtilen 15980 bp'lik mitokondrial genomunda ayrıntılı olarak incelense de bir sonuca ulaşılamamıştır.

Diğer taraftan sekonder simbiyonların gerek maternal olarak dikey (vertikal) ya da farklı türler arasında yatay (lateral, horizontal) yönlü transfer ediliyor olmaları gerekse konakçıları ile olan ilişkileri nedeniyle genetik materyal transferinde rol oynamaktadırlar. Dolayısıyla bu durumun evrimsel sürece katkıda bulunduğu ifade edilmektedir [154, 155]. Nitekim bu simyotik yaşam nedeniyle bakterilerden ökaryotlara horizontal olarak gen transferinin gerçekleştiği de belirtilmektedir [156]. Bu çalışmada *Ch* ve *Clo* primerleri ile elde edilen sonuçların, bu tarz bir durumdan kaynaklandığı da düşünülmüş ancak, gelinen noktada elde edilen veriler bu durumu açıklamak için çok yetersizdir. Öte yandan söz konusu PCR ürünlerinin her nesilde

istikrarlı bir şekilde tespit edilmesi, bunların baz dizisinin GenBank (NCBI) veri tabanında herhangi bir organizma ile ilişkilendirilememesi açıklanamamaktadır. Dolayısıyla bu primerlerin AMS’nde; spesifik olarak mı olmayarak mı PCR ürünü veriyor (?); her iki durum içinde geçerli olmak üzere, bu PCR ürünlerinin kalıbı hangi organizmaya ait (?); eğer spesifik olmayan bir PCR sonucu ise, elde edilen baz dizileri nasıl birbiri ile hizalanabiliyor (?) sorularına cevap bulunamamıştır. Ancak burada belirtilmesi gereken belki de en önemli nokta ise bu çalışmaların pozitif kontrol varlığında gerçekleştirilmemiş olmasıdır. Dolayısıyla bu primerlerin pozitif bir kontrolle ve alternatif yöntemleri de kullanarak gerçekleştirilecek çalışmalarla bu sonuçların kontrol edilmesinin gerektiği düşünülmektedir.

Enfekte ettiği artropodlarda erkek öldürücü şeklinde etki gösteren bir diğer sekonder simbiyotik bakteri olan *Rickettsia* ise, *Adalia bipunctata* [157] ve *Brachys tessellatus*’da (Coleoptera: Buprestidae) [145] tespit edilmiştir. Konakçısına sıcaklık, patojen ve parazitoid karşı direnç sağlama özelliğinin yanı sıra larva gelişimini bloke eden *Hamiltonella* ise *Bemisia tabaci*’de, yaprak bitlerinde ve bitki özsuğu ile beslenen diğer böceklerde incelenmiştir (143, 122, 123). Bunlardan *Hamiltonella*’ya yönelik olarak AMS’nde bir tarama veya çalışma bulgusuna rastlanılmamıştır. *Rickettsia*’ya yönelik olarak ise sadece Duron et al., [23] AMS’nin de aralarında bulunduğu artropodlarda tarama çalışması yapılmış ve AMS’nde *Rickettsia* enfeksiyonu olmadığı belirtilmiştir. Bu çalışmada ise Türkiye’de ilk kez *Rickettsia* ve *Hamiltonella* İzmir-Bornova AMS popülasyonunda taranmıştır. Taramalar sonucunda bu bakterilerin taranan lokasyon bazında AMS popülasyonunda bulunmadıkları belirlenmiştir. Ancak sonuçlar pozitif kontrol olmadan elde edildiği için, pozitif kontrol kullanılarak elde edilen bu sonucun teyidinin gerektiği düşünülmektedir.

Artropodların % 5’inde bulunduğu belirtilen [86], *Arsenophonus* ise şuana kadar Ixodida [158-160], Araneae’nın [23] yanı sıra Blattaria [23], Diptera [16, 23], Hemiptera [23, 161-163], Hymenoptera [23, 118, 142], Neuroptera [164]’da tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar arasında AMS’nde bu bakteriye yönelik olarak Duron et al. [23] tarafından *ArsF*, *ArsF2*, *ArsF3*, *ArsR2* ve *ArsR3* primerleri ile tarama gerçekleştirilirken, Dale et al., [16] tarafından ise AMS’ne en yakın Diptera şubesinden *Pseudolynchia canariensis*’de *CAIF-CAIR* tarama gerçekleştirilmiştir. Duron et al. [23] AMS’nde *Arsenophonus* enfeksiyonuna rastlanmadığını belirtirken, Dale et al. ise [16]

P. canariensis'de bu bakterinin tespit edildiğini belirtmiştir. *P. canariensis*'den CAIF-CAIR ile elde ettikleri baz dizisinin (GenBank'daki BLAST analizinde), böceklerle yakın ilişkili ve bunların simbiyontu durumundaki *Arsenophonus* ile % 99 benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Bunun yanı sıra bu dizilerin *Wolbachia* ve diğer endosimbiyontlar ile % 92-99 arasında benzerlik olduğunu da belirtmektedirler.

Bu çalışmada ise *ArsF*-R3 primer çifti ile AMS total DNA'sında herhangi bir veri elde edilemezken, *ArsF*-*ArsR2* primer çifti ile yaklaşık 730 bp uzunluğunda baz dizisi elde edilmiştir. Bu primerler ile elde edilen 3 farklı baz dizisinin GenBank veri tabanındaki BLAST analizinde ise % 87 - % 89 arasında değişen oranlarda *Arsenophonus* ile benzerlik göstermiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. *ArsF*-R2 primer çifti ile elde edilen yaklaşık 730 bp uzunluğundaki baz dizisinin GenBank veri tabanındaki BLAST analiz sonuçları.

GenBank No	Benzerlik (%)	Açıklama
FN545282.1	89	<i>Arsenophonus nasoniae</i> 'nin parçaları dizelenmiş (shotgun) bütün genomu
NR042811.1	89	<i>Arsenophonus nasoniae</i> suşunun (ATCC 49151) 16S rRNA'nın kısmi sekansı
AY264674.1	89	<i>Arsenophonus nasoniae</i> 'nin 16S rRNA geninin kısmi sekansı
JN204470.1	88	<i>Bemisia tabaci</i> 'nin endosimbiyontu olan <i>Arsenophonus</i> 'un 16S rRNA geni
M90801.1	87	<i>Arsenophonus nasoniae</i> 'nin 16S rRNA geni

Buna göre Türkiye'de ilk olarak *Arsenophonus*'a yönelik bir taramanın gerçekleştirildiği bu çalışmada, İzmir-Bornova AMS popülasyonunda *Arsenophonus* enfeksiyonu olduğuna dair sonuçlara ulaşıldığı düşünülmektedir. Ancak bu çalışmalar pozitif kontrol olmadan gerçekleştirildiğinden, bu bulguların pozitif kontrol eşliğinde tekrarlanarak teyit edilmesinin gerektiği düşünülmektedir.

Bu çalışma kapsamında AMS'nde taranan bir başka sekonder simbiyont olan *Spiroplasma* ise (*Harmonia axyridis*, *Adalia bipunctata*, *Danaus chrysippus* gibi) avcı ve (*Drosophila* sp.) herbivor böceklerde [22, 79, 114, 165, 166] kenelerde [167, 168] ve akarlarda [169] tespit edilmiştir. *Spiroplasma* mutualistik simbiyontların aksine genel olarak spesifik hücrelerde olmak üzere hem hücre içi hem de hücre dışında bulunmaktadır [170] ve artropodlarda erkek öldürücü şekilde fenotipe etki eden iki

türü vardır; bunlar *S. ixodetis* ve *S. poulsonii*'dir [23, 83]. Diğer yandan Kageyama et al., [91] tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise *Spiroplasma*'nın *D. hydei*'de maternal olarak kalıtıldığı, ancak üreme sisteminde bahsedilen tarzda etkiye sahip olmadığı ifade edilmiştir. Xie et al. [171] tarafından yapılan bir başka çalışmada ise aynı böcekte parazit arılara kaşı konakçısını koruyucu bir rol oynadığı belirtilmiştir. Bunlarla beraber bazı *Spiroplasma* türleri böceklerde (*S. melliferum* arılarda), bazıları ise bitkilerde patojen (*S. citri* portakalda, *S. kunkelii* mısırdada)'dir. Dolayısıyla artropodlardaki *Spiroplasma* enfeksiyonunun, konakçının enfekteli bir bitki ile beslenme sonucu yatay transfer yoluyla gerçekleşebildiği gibi böcekler arasında yatay ve dikey transfer yoluyla da gerçekleşebilmektedir [83, 172-175]. *Spiroplasma* çeşitliliği, yayılışı, enfeksiyonunun fenotipe etkisi gibi birçok farklı karakteri nedeniyle her çalışmada farklı olmak üzere çok çeşitli primerler kullanılmıştır. Örneğin *S. ixodetis* ve *S. poulsonii* AMS'nde Duron et al., [23] tarafından yapılan çalışmada *Spixof-SpoxR*, *Spouf-SpouR* primerleri ile taranmış, ancak AMS'nde bunlara ilişkin bir enfeksiyon belirlenememiştir. Bu çalışma ise Fukatsu and Nikoh [17] ve Mateos et al., [22] tarafından önerilen ve *Spiroplasma*'ya yönelik olarak gerçekleştirilen diğer çalışmalarda da [165, 176-179] kullanılan 63F-TK55R (TKSSR) ile gerçekleştirilmiştir. Bu primerler ile toplam 35 AMS total DNA'sının (ergin birey, larva, pupa ve yumurta) tamamında yaklaşık 450 baz uzunluğunda PCR ürünleri elde edilmiştir. Ancak bu PCR ürünlerinin baz dizisinin GenBank veri tabanındaki BLAST analizinde (Tablo 4.2) *Bacillus* cinsi bakterilere % 99 benzerlik göstermiştir. *Spiroplasma* cinsi bakterilere ise en yüksek % 89 oranında benzerlik göstermiştir. Bunlardan böceklerde endosimbiyotik olarak bulunan *S. poulsonii*'yle ise % 84 oranında benzerlik göstermiştir. Ancak bu sonuçlar pozitif kontrol olmadan elde edildiğinden, bu çalışmaların pozitif kontrol ile tekrarlanarak doğrulanmasının gerektiği düşünülmektedir.

Tablo 4.2. 63F-TK55R primer çifti ile elde edilen yaklaşık 450 baz uzunluğundaki baz dizisinin GenBank veri tabanındaki BLAST analiz sonuçları

GenBank No	Benzerlik (%)	Açıklama
KF600526.1	99	<i>Bacillus</i> sp. 3384O2'nin 16S rRNA geninin kısmi sekansı
KC463008.1	99	<i>Bacillus thuringiensis Nordb9</i> 'in 16S rRNA geninin kısmi sekansı
JX064906.1	99	<i>Bacillaceae bacterium 6_St_4</i> 16S rRNA geninin kısmi sekansı

Tablo 4.2. (Devamı) 63F-TK55R primer çifti ile elde edilen yaklaşık 450 bp uzunluğundaki baz dizisinin GenBank veri tabanındaki BLAST analiz sonuçları

GenBank No	Benzerlik (%)	Açıklama
CP002082.1	79	<i>Spiroplasma mirum</i> (ATCC 29335)'in tüm genomu
FJ821699.1	86	<i>Spiroplasma</i> sp. BARC 4689'in 16S rRNA geninin kısmi sekansı
NR_104751.1	89	<i>Spiroplasma diabroticae</i> DU-1 suşunun 16S rRNA geninin kısmi sekansı
NR_044672.1	84	<i>Spiroplasma poulsonii</i> DW-1 (ATCC 43153)'in 16S rRNA geninin kısmi sekansı

Türkiye’de ilk olarak *Spiroplasma* taramasının gerçekleştirildiği bu çalışmada, AMS yumurta total DNA’sından da elde edilen bu ~420 bp’lik PCR ürünlerinin BLAST analizinden endosimbiyotik *Spiroplasma* ile neden yüksek yüzeyde bir benzerlik elde edilemediği açıklanamamıştır. Bununla birlikte yüzey sterilizasyonu işlemlerinin kontrol edildiği (Şekil 3.11) yumurta total DNA’sından 16S rDNA primeri ile elde edilen 1500 bp uzunluğundaki PCR ürünlerinin baz dizisinin en az iki ayrı DNA’ya ait belirlenmiştir. Buradan hareketle söz konusu DNA’ların birinin *Arsenophonus*’a diğerinin ise *Spiroplasma*’ya ait olduğu düşünülmektedir. Nitekim artropodlarda birden fazla kalıtılan bakterilerin olabileceği de belirtilmektedir. Birden fazla sekonder simbiyotik bakterinin kalıtıldığını gösteren çalışmalardan biri Jahan et al., [149] tarafından *B. tabaci*’de belirlenmiştir. Bu çalışmada *Arsenophonus*, *Cardinium*, *Hamiltonella* ve *Wolbachia*’nın sitoplama yoluyla bir sonraki nesle aktarıldığını tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada ise *Cardinium* ve *Wolbachia*’nın aynı konakçıda, *Tetranychus truncates*’da, birlikte (co-infection) kalıtıldığı belirtilmektedir [183]. Benzer şekilde *Spiroplasma* ve *Wolbachia*’nın *D. melanogaster*’de birlikte kalıtıldığı ve konakçıda asimetric bir ilişki içerisinde oldukları belirtilmektedir [184].

Bu çalışma ile elde edilen bir ayrıntı da, 12S mtDNA (CRF-CRR) primer çifti şuna kadar Branchiopod [130], İso pod [180], Aphid [181] ve çe çe sineği [182] ile gerçekleştirilen çalışmalarda kullanıldığı halde daha önce AMS için kullanılmadığı görülmüştür. Bu çalışmada yüzey sterilizasyonu yapılmış AMS yumurtalarında CRF-CRR primerleri ile Spanos et al. [134] tarafından belirtilen 15980 bp’lik mitokondrial genomunda sırasıyla 14248-14268 ve 14625-14650 bölgelerine bağlandığı belirlenmiştir. Spanos et al. [134] çalışmasının amacını kısır böcek tekniği kapsamında elde edilecek AMS bireyleri ile doğal bireylerini birbirinden ayırmak için bir kaynak

elde etmek olarak belirtmektedir. Bu çalışmada kullanılan *CRF-CRR* bu primerlerinin ve bunlarla elde edilen 410 bp'lik baz dizisinin de hem bu doğrultuda hem de AMS ile gerçekleştirilecek diğer çalışmalarda kullanılabileceği düşünülmektedir.

4.2. Sonuç ve Öneriler

Türkiye’de ilk kez bir böcekte endosimbionik bakterilere yönelik bu şekilde kapsamlı çalışma yapılmıştır. Gerçekleştirilen bu çalışma ile;

- i) Benzer çalışmalarda da kullanılabilecek insektaryum ve kafes modelleri oluşturulmuştur.
- ii) Türkiye’de ilk olarak bir böcekte endosimbiontlara yönelik tarama yapılmıştır.
- iii) Türkiye’de Hatay–İzmir arasındaki sahil şeridindeki AMS popülasyonlarında *Wolbachia* enfeksiyonunun bulunmadığı belirlenmiştir.
- iv) İzmir-Bornova AMS popülasyonunda ise *Hamiltonella* ve *Rickettsia* enfeksiyonu bulunmamaktadır.
- v) *Cardinium* için özgül olarak nitelendirilen *Ch* ve *Clo* primerleri ile spesifik olmadığı düşünülen sonuçlar elde edilmiş ancak bu durumun tam olarak açıklanamamıştır.
- vi) AMS’nde *Arsenophonus* ve *Spiroplasma* enfeksiyonlarının bulunduğu dair ilk veriler sunulmuştur.

Bu sonuçlardan özellikle *Arsenophonus* ve *Spiroplasma* bakterilerinin tespitinde her ne kadar spesifik primerleri kullanılmış olsa da bu sonuçların pozitif kontrol varlığında; flüoresan *in situ* hibridizasyon (FISH), çok bölgeli sekans tiplemesi (Multi Locus Sequencing Typing, MLS) ve real-time PCR gibi alternatif metotlarla teyidi gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Agarwal, M. L., Sueyoshi, M., 2005. Catalogue of Indian fruit flies (Diptera: Tephritidae). **Oriental Insects**, **39**: 371-433. ,
2. De Meyer, M., Robertson, M. P., Mansell, M. W., Ekesi, S., Tsuruta, K., Mwaiko, W., Vayssie`res, J. F., Peterson, A. T., 2010. Ecological niche and potential geographic distribution of the invasive fruit fly *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae). **Bulletin of Entomological Research** **100** (1): 35-48.
3. Savaris, M., Lampert, S., Marsaro-Júnior, A. L. Adaime, R., De Souza-Filho, M. F., 2013. First record of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) on Arecaceae in Brazil. **Florida Entomologist** **96** (4): 1597-1599.
4. Elekçioğlu, N. Z., 2009. Akdeniz Meyvesineği. **Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi**, **2** (1): 61-65.
5. Kahyaoğlu, M., Gürkan, M. O., 2010. Akdeniz meyve sineği [*Ceratitidis capitata* Wiedemann, 1824 (Diptera: Tephritidae)] için yeni hazır yem formülasyonlarının geliştirilmesi. **Türk Entomol. Derg.**, **35** (3): 485-494.
6. Hendrichs, J., Franz, G., Rendon, P., 1995. Increased effectiveness and applicability of the sterile insect technique through male-only releases for control of Mediterranean fruit flies during fruiting seasons. **Journal of Applied Entomology**, **119**: 371–377.
7. Hendrichs, J., Robinson, A. S., Cayol, J. P., Enkerlin, W., 2002. Medfly area wide sterile insect technique programmes for prevention, suppression or eradication: the importance of mating behavior studies. **Florida Entomologist**, **85**: 1–13.
8. Yuval, B., Ben-Ami, E., Behar, A., Ben-Yosef, M., Jurkevitch, E., 2010. The Mediterranean fruit fly and its bacteria – potential for improving sterile insect technique operations. **Journal of Applied Entomology**, **137** (1): 39-42.

9. Stibick J. N. L., 2004, Natural enemies of true fruit flies (Tephritidae). **United States Department of Agriculture (USDA)**. pp 8-10.
10. Behar, A., Yuval, B., Jurkevitch, E., 2008. Gut bacterial communities in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) and their impact on host longevity. **Journal of Insects Physiology**, **54**, :: 1377–1383.
11. Ami, E. B., Yuval, B. Jurkevitch, E., 2010. Manipulation of the microbiota of mass-reared Mediterranean fruit flies *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) improves sterile male sexual performance. **The ISME Journal**, **4**, : 28–37.
12. , H., El-Aouame, L., El-Messoussi, S., Oufdou, K., 2010. Biological activity of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) atrains on larvae and adults of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Journal of Environmental Protection**, **1**: 337-345.
13. Brelsfoard, C. L., Dobson, S. L., 2009. Wolbachia-based strategies to control insect pests and disease vectors. **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, **17** (3): 55-63.
14. Zchori-Fein, E., Perlman, S. J., Kelly, S. E., Katzir, N., Hunter, M. S., 2004. Characterization of a ‘Bacteroidetes’ symbiont in *Encarsia* wasps (Hymenoptera: Aphelinidae): proposal of ‘Candidatus *Cardinium hertigii*’, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, **54**: 961–968.
15. Kaiwa, N., Hosokawa, T., Kikuchi, Y., Nikoh, N., Mou, X. Y., Kimura, N., Ito, M., Fukatsu, T., 2010. Primary gut symbiont nd secondary, Sodalis-allied symbiont in the scutellerid stinkbug *Cantao ocellatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, **76**: 3486-3494.
16. Dale, C., Beeton, M., Harbison, C., Jones, T., and Pontes, M., 2006. Isolation, pure culture, and characterization of “Candidatus *Arsenophonus arthropodicus*,” an intracellular secondary endosymbiont from the hippoboscid louse fly *Pseudolynchia canariensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, **72**: 2997–3004.
17. Fukatsu, T., Nikoh, N., (2000). Endosymbiotic microbiota of the bamboo pseudococcid *Antonina crawii* (Insecta, Homoptera). **Applied and Environmental Microbiology**, **66**(2): 643–650.

18. Werren, J. H., Windsor, D. M., 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? Proceedings. **The Royal Society**, **267**(1450): 1277–1285.
19. Zchori-Fein, E., Brown, J. K., 2002. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). **Annals of the Entomological Society of America**, **95**: 711–718.
20. Weeks, A. R., Velten, R., Stouthamer, R., 2003. Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods. **Proceedings of the Royal Society B**, **270**:1857-1865.
21. Gottlieb, Y., Ghanim, M., Chiel, E., Gerling, D., Portnoy, V., Steinberg, S., Tzuri, G., et al. (2006). Identification and localization of a *Rickettsia* sp. in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). **Applied and Environmental Microbiology**, **72** (5): 3646–3652.
22. Mateos, M., Castrezana, S. J., Nankivell, B. J., Estes, A. M., Markow, T. A., Moran, N. A., 2006. Heritable endosymbionts of *Drosophila*. **Genetics**, **174** (1): 363–376.
23. Duron, O., Bouchon, D., Boutin, S., Bellamy, L., Zhou, L., Engelstädter, J., Hurst, G. 2008. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. **BMC Biology**, **6** (27) 1-12.
24. Duron, O., Hurst, G. D. D., 2013. Arthropods and inherited bacteria: from counting the symbionts to understanding how symbionts count. **BMC Biology**, **11** (45):1-4.
25. Herren, J. K., Paredes, J. C., Schüpfer, F., Lemaitre, B., 2013. Vertical transmission of a *Drosophila* endosymbiont via cooption of the yolk transport and internalization machinery. **American Society for Microbiology: MBio**, **4** (2): 1-8.
26. Bergsten, D., Lance, D., Stefan, M., 1999. Mediterranean fruit flies and their management in the U.S.A. **The Royal Society of Chemistry**, **10**: 207-212.
27. USDA (U.S. Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service), 2003. Mediterranean fruit fly action plan. **Plant Protection and Quarantine**, Version 12/2003-02.

28. Liquido, N. J., Cunningham, R. T., Nakagawa, S., 1990. Host plants of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) on the Island of Hawaii (1949-1985 survey). **Journal of Economic Entomology**, **83**: 1863-1878.
29. Bayrak, N., Hayat, R., 2012. Türkiye'nin Tephritidae (Diptera) türleri. **Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi**, **5** (2): 49-55.
30. Harris, E. J., Olalquiaga, G., 1991. Occurrence and distribution patterns of the Mediterranean fruit fly in desert areas in Chile and Peru. **Environmental Entomology**, **20**: 174-178.
31. Kütük, M., Yaran, M., Hayat, R., Koyuncu, M. Ö., Görmez, V., Aytekin, H. U., 2013. The determination of fruit fly (Diptera: Tephritidae) fauna in Adıyaman, Kilis, and Şanlıurfa provinces with a new record for Turkish fauna. **Turkish Journal of Zoology**, **37**: 38-49.
32. De Meyer, M., 2000. Systematic revision of the subgenus *Ceratitis* MacLeay s.s. (Diptera, Tephritidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**. **128**: 439-467.
33. UF-IFAS. 2013. Mediterranean fruit fly
http://entnemdept.ifas.ufl.edu/creatures/fruit/mediterranean_fruit_fly.htm
(Erişim tarihi: Şubat 2014)
34. Shoukry, A., Hafez, M., 1979. Studies on the biology of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, **261**: 33-39.
35. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü. Turunçgil Hastalık ve Zararlıları ile Mücadele, 2010, Ankara, ss. 40-41.
36. Elekçioğlu, N. Z., 2013. Fruit flies of economic importance in Turkey, with special reference to Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wied.), **Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi**, **6** (2): 33-37, 2013.
37. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), 2013 yılı Bitkisel üretim istatistikleri.
<http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (Erişim tarihi: Şubat 2014)
38. Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO), 2012, Citrus fruit fresh and processed annual statistics.
http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Citrus/Documents/CITRUS_BULLETIN_2012.pdf (Erişim tarihi: Şubat 2014)

39. T.C. Ekonomi Bakanlığı, İhracat Genel Müdürlüğü Tarım Ürünleri Daire Başkanlığı. Sektör raporları, Yaş meyve ve sebze sektörü.
<http://www.ibp.gov.tr/pg/sektorpdf/tarim/yasmeyvesebze.pdf> (Erişim tarihi: Şubat 2014)
40. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü, BÜGEM Faaliyetleri, Ocak 2014.
<http://www.tarim.gov.tr/Documents/SagMenuVeriler/BUGEM.pdf> (Erişim tarihi: Şubat 2014)
41. Akdeniz İhracatçı Birlikleri Genel Sekreterliği, Yaş Meyve Sebze Sektör Şefliği, Yaş Meyve Sebze İhracatçıları Birliği değerlendirme raporu Türkiye geneli (2012 / 2013 Mart Ayı Dönemi).
42. Kayıkçı N.Ş. 2013. Rusya Federasyonu'na Yaş Meyve ve Sebze İhracatı Eğitim Toplantısı, "Rusya Federasyonu'na Taze Meyve Sebze ve Kesme Çiçek İhracatında Karantina Yönüyle Önem Arz Eden Hususlar" (Başlıklı sunumdan). T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Zirai Karantina Müdürlüğü, İzmir.
<http://www.izka.gov.tr/rusya-federasyonuna-taze-meyve-ve-sebze-ihracati-bilgilendirme-egitimi-yaptik/> (Erişim tarihi: Şubat 2014)
43. Akgün C. 2006. 2006. Turunçgiller sektör profili. İstanbul Ticaret Odası, Dış ticaret şubesi uygulama servisi.
<http://www.ito.org.tr/Dokuman/Sektor/1-97.pdf> (Erişim tarihi: Şubat 2014)
44. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü, irana_yonelik_narenciye_ihr_soguk_islem_prosedur_firma_listesi.docx, www.tarim.gov.tr (Erişim tarihi: Şubat 2014).
45. Lo Verde, G., Caleca, V., Lo Verde, V., 2011. The use of kaolin to control *Ceratitis capitata* in organic citrus groves. **Bulletin of Insectology**, **64**(1): 127-134.
46. Carey, JR, 1996. The future of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* invasion of California: A predictive framework. **Biological Conservation**, **78**: 35-50.
47. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü, Rusyakarantinalistesi.xls, www.tarim.gov.tr, (Erişim tarihi: Şubat 2014).

48. 2013 yılı Bitki Sağlığı ve Karantina Program ve Prensipleri. Sertifika No: 17793. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü, Hilal Form Matbaacılık, Ankara, 49 s.
49. İleri, M., 1961. Türkiye’de Akdeniz meyve sineği durumu ve mücadelesi. Tarım Bakanlığı, Ankara Ziraî Mücadele Enstitüsü Md. Yayını, Ankara, 38 s.
50. Cingöz, L., 2012. Akdeniz meyve sineği (*Ceratitis capitata*). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma İstasyonu, Erdemli-Mersin.
51. Elekçioğlu, N., 2012. Akdeniz meyvesineği, T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, **Bereket**, Biyolojik mücadele araştırma istasyonu müdürlüğü (Adana) Yayınları, Bereket, No:4.
52. Zümreoğlu, A., Güvener, A., Çakıcı, M., Ercan, H., 1987. Akdeniz meyve sineği (*Ceratitis capitata* ve Zeytin Sineği (*Dacus oleae* Gmel.) mücadelesinde kullanılacak yerli üretim cezbedicileri geliştirme ve uygulama olanakları üzerinde araştırmalar. **Doğa**, **16**: 607–620.
53. Wharton, R. A., Trostle, M. K., Messing, R. H., Copeland, R. S., Kimani-Njogu, S. W., Lux, S., Overholt, W. A., Mohamed, S., Sivinski, J., 2000. Parasitoids of medfly, *Ceratitis capitata*, and related tephritids in Kenyan coffee: a predominantly koinobiont assemblage. **Bulletin of Entomological Research**. **90**: 517-526.
54. Mostakim, M., El abed, S., Iraqui, M., Benbrahim, K. F., Houari, A., Gounni A. S., Ibensouda, S. K., 2012. Biocontrol potential of a *Bacillus subtilis* strain against *Bactrocera oleae*. **Annals of Microbiology**, **62**(1): 211-216.
55. Wimmer, E. A., 2005. Eco-friendly insect management. **Nature Biotechnology**, **23**: 432 - 433.
56. Morrison, N. I., Franz, G., Koukidou, M., Miller, T. A., Saccone, G., Alphey, L. S., Beech, C. J., Nagaraju, J., Simmons, G. S., Polito, L. C., 2010. Genetic improvements to the sterile insect technique for agricultural pests, **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, **18**(2): 275-295.
57. Ami, E. B., Yuval, B., Jurkevitch, E., 2009. Manipulation of the microbiota of mass-reared Mediterranean fruit flies *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) improves sterile male sexual performance. **The ISME Journal**, 1–10.

58. Hendrichs, J. 2000, Use of the sterile insect technique against key insect pests, **Sustainable Development International**, **2**: 75–79.
59. Franz, G., 2005. Genetic sexing strains in Mediterranean fruit fly, an example for other species amenable to large-scale rearing for the sterile insect technique. pp. 427-451. *In* Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-wide Integrated Pest Management (Eds.: V. A. Dyck, J. Hendrichs, A. S. Robinson). Springer, Dordrecht, The Netherlands.
60. Ogaugwu, C. E., Schetelig, M. F., Wimmer, E. A., 2013. Transgenic sexing system for *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) based on female-specific embryonic lethality. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, **43**(1):1-8.
61. Maor, M., Kamensky B., Shloush S., Yuval, B., 2004. Effects of post-teneral diet on foraging success of sterile male Mediterranean fruit flies. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. **110**: 225-230.
62. Barry, J. D., Opp, S. B., Dragolovich, J., Morse, J. G., 2007. Effect of adult diet on longevity of sterile Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, **90**: 650–655.
63. Teal, P. E. A., Proveaux, A. T., Heath, R. R., 2000. Analysis and quantitation of insect juvenile hormones using chemical ionization ion-trap mass spectroscopy. **Analytical Biochemistry**, **277**: 206-213.
64. Niyazi, N., Lauzon, C. R., Shelly, T. E., 2004. Effect of probiotic adult diets on fitness components of sterile male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) under laboratory and field cage conditions. **Journal of Economic Entomology**. **97**: 1570–1580.
65. Papadopoulos, N. T., Katsoyannos, B. I., Kouloussis, N. A., Hendrichs, J., 2001. Effect of orange peel substances on mating competitiveness of male *Ceratitidis capitata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, **99**: 253–261
66. Shelly, T. E., Rendon, P., Hernandez, E., Salgado, S., McInnis, D., Villalobos, E., Liedo, P., 2003. Effects of diet, ginger root oil, and elevation on the mating competitiveness of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) from a mass-reared, genetic sexing strain in Guatemala. **Journal of Economic Entomology**. **96**: 1132–1141.
67. Robinson, A. S., 2002. Genetic sexing strain in medfly, *Ceratitidis capitata*, sterile insect technique programmes. **Genetica** **116**: 5-13.

68. Fu, G., Condon, K. C., Epton, M. J., Gong, P., Jin, L., Condon, G. C., Morrison, N. I., Dafa'alla, T. H., Alphey, L., 2007. Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing. **Nature Biotechnology**, **25**: 353-357.
69. Gotoh, T., Noda, H., Ito, S., 2007. *Cardinium* symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites. **Heredity**, **98**: 13-20.
70. Zhang, K. J., Han, X., Hong, X. Y., 2013. Various infection status and molecular evidence for horizontal transmission and recombination of *Wolbachia* and *Cardinium* among rice planthoppers and related species, **Insect Science**, **20**: 329–344.
71. Moran, N. A., McCutcheon, J. P., Nakabachi, A., 2008. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. **Annual Review of Genetics**, **42**: 165–190.
72. Hedges, L. M., Brownlie, J. C., O'Neill, S. L., Johnson, K. N., 2008. *Wolbachia* and virüs protection in insects. **Science** **322**: 702.
73. Penz, T., Schmitz-Esser, S., Kelly, S. E., Cass, B. N., Müller, A., Woyke, T., Malfatti, S. A., Hunter, M. S., Horn, M., 2012. Comparative genomics suggests an independent origin of cytoplasmic incompatibility in *Cardinium hertigii*, **PLoS Genet**, **8**:10, e1003012. doi: 10.1371/journal.pgen.1003012.
74. Ben-Yosef, M., Jurkevitch, E., Yuval, B., 2008. Effect of bacteria on nutritional status and reproductive success of the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*. **Physiological Entomology**, **33**: 145–154.
75. Werren, J. H., Baldo, L., Clark, M. E., 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. **Nature ReviewS, Microbiology**, **6**: 741-751.
76. Zchori-Fein, E., Perlman, S. J., 2004. Distribution of the bacterial symbiont in *Cardinium* arthropods, **Molecular Ecology** **13**: 2009–2016.
77. Saridaki, A., Bourtzis, K., 2010. *Wolbachia*: more than just a bug in insects' genitals. **Current Opinion in Microbiology**, **13**: 67-72
78. Matalon, Y., Katzir ., Gottlieb, Y., Portnoy, V., Zchori-Fein, E., 2007, *Cardinium* in *Plagiomerus diaspidis* (Hymenoptera: Encyrtidae), **Journal of Invertebrate Pathology**, **96**: 106–108.
79. Jiggins, F. M., Hurst, G. D. D., Majerus, M., E., N., 2000, Sex-ratio-distorting *Wolbachia* causes sex-role reversal in its butterfly host. **Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences** **267**: 69–73.

80. Telschow, A., Flor, M., Kobayashi, Y., Hammerstein, P., Werren, J. H., 2007 *Wolbachia*-induced unidirectional cytoplasmic incompatibility and speciation: mainland-island model. **PLoS ONE** 2: e701. doi:10.1371/journal.pone.0000701.
81. Cordaux, R., Bouchon, D., Greve, P., 2011. The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms. **Trends Genet** 27: 332–341.
82. O'Neill, S. L., Giordano, R., Colbert, A. M. E., Karr, T. L. Robertson, H. M., 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 94: 2699-2702.
83. Hurst, G. D., Jiggins, F. M., 2000. Male-killing bacteria in insects: mechanisms, incidence, and implications. **Emerging Infectious Diseases Journal**, 6 (4): 329–336.
84. Wolbachia Biology.
<http://www.rochester.edu/college/bio/labs/WerrenLab/WerrenLab-WolbachiaBiology.html> (Erişim tarihi: Şubat 2014).
85. Zchori-Fein, E., Gottlieb, Y., Kelly, S. E., Brown, J. K., Wilson, J. M., Karr, T. L. Hunter, M. S., 2001. A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98: 12555-12560.
86. Wilkes, T. E., Duron, O., Darby, A. C., Hypša, V., Nováková, E., Hurst, G. D. D. 2011. The Genus *Arsenophonus*. pp 226-241. *In*: Manipulative Tenants: Bacteria Associated with Arthropods (Eds: Einat Z.-F., Kostas B.). CRC Press.
87. Werren, J. H. Beukeboom, L. W., 1998. Sex determination, sex ratios and genetic conflict. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, 29: 233–261.
88. Weeks, A. R. Breeuwer, J. A., 2001. *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. **Proceedings of the Royal Society B**, 268: 2245–2251.
89. Markov, A. V., Zakharov, I. A., 2005. Sexual reproduction of insects is regulated by cytoplasmic bacteria. **Russian Journal of Developmental Biology**, 36: (4), 230–239.

90. Rousset, F. et al. 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B**, **250**: 91–98.
91. Kageyama, D. et al. 1998. Female-biased sex ratio in the asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*: evidence for the occurrence of feminizing bacteria in insects. **Heredity** **81**: 311–316.
92. Kageyama, D., Nishimura, G., Hoshizaki, S., Ishikawa, Y., 2002. Feminizing *Wolbachia* in an insect, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Heredity** **88** (6): 444–449.
93. Charlat, S., Hurst, G. D. D., Merçot, H., 2003. Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. **Trends in Genetics**, **19** (4): 217–223.
94. Stouthamer, R., Breeuwer, J. A., Luck, R. F., Werren, J. H., 1993. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. **Nature** **361**: 66–68.
95. Zchori-Fein, E., Faktor, O., Zeidan, M., Gottlieb, Y., Czosnek, H., Rosen, D., 1995. Parthenogenesis-inducing microorganisms in *Aphytis* (Hymenoptera: Aphelinidae). **Insect Molecular Biology**, **4**: 173–78.
96. Hurst, G. D., Johnson, A. P., Schulenburg, J. H., Fuyama, Y., 2000. Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: a temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. **Genetics**, **156**: 699–709.
97. Fialho, R.F., Stevens, L., 2000. Male killing *Wolbachia* in a flour beetle. **Proceedings of the Royal Society B**, **267**: 1469–1473.
98. Zeh, D. W., Zeh J. A. Bonilla, M. M., 2005. *Wolbachia*, sex ratio bias and apparent male killing in the harlequin beetle riding pseudoscorpion. **Heredity** **95**: 41–49.
99. Hurst, L. D., 1991. The incidences and evolution of cytoplasmic male killers. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B**, **244**: 91–99.
100. Hurst, G. D. D., Jiggins, F. M., Majerus, M. E. N., 2003. Inherited microorganisms that selectively kill male hosts: The hidden players of insect evolution?, pp. 177–198. *In*: Insect Symbiosis, (Eds: K. Bourtzis and T. A. Miller). CRC Press, Boca Raton, Florida.
101. Hertig, M., Wolbach, S. B., 1924. Studies on *Rickettsia*-like organisms in insects. **The Journal of Medical Research**, **44**: 329–374.

102. Min, K. T., Benzer, S., 1997. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **94**: 10792–10796.
103. Hunter, M. S., Perlman, S. J., Kelly, S. E., 2003. A bacterial symbiont in the Bacteroidetes induces cytoplasmic incompatibility in the parasitoid wasp *Encarsia pergandiella*. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, **270**: 2185–2190.
104. Perlman, S. J., Kelly, S. E., Hunter, M. S., 2008. Population biology of cytoplasmic incompatibility: maintenance and spread of *Cardinium* symbionts in a parasitic wasp. **Genetics**, **178**: 1003–1011.
105. Breeuwer, J. A. J., Werren, J. H., 1990. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. **Nature**, **346**: 558–560.
106. Gotoh, T., Noda, H., Hong, X. Y., 2003. *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility based on a survey of 42 spider mite species (Acari: Tetranychidae) in Japan. **Heredity**, **91**: 208–216.
107. Bigliardi, E., Sacchi, L., Genchi, M., Alma, A., Pajoro, M., Daffonchio, D., Marzorati, M., Avanzati, A. M., 2006. Ultrastructure of a novel *Cardinium* sp. symbiont in *Scaphoideus titanus* (Hemiptera: Cicadellidae). **Tissue and Cell**, **38** (4): 257–61.
108. Massimo, M., Alma, A., Sacchi, L., Pajoro, M., Simona, P., Brusetti, L., Raddadi, N., Balloi, A., Tedeschi, R., Clementi, E., Corona, S., Quaglino, F., Bianco, P.A., Beninati, T., Bandi, C., Daffonchio, D., 2006. A novel Bacteroidetes symbiont is localized in *Scaphoideus titanus*, the insect vector of Flavescence Dore'e in *Vitis vinifera*. **Applied and Environmental Microbiology**, **72** (2): 1467–1475.
109. Chigira, A., Miura, 2005. Detection of 'Candidatus *Cardinium*' bacteria from the haploid host *Brevipalpus californicus* (Acari: Tenuipalpidae) and effect on the host. **Experimental and Applied Acarology**, **37**: 107–116.
110. Davis, M. J., Ying, Z. T., Brunner, B. R., Pantoja A., Ferwerda F. H., 1998. Rickettsial relative associated with papaya bunchy top disease. **Current Microbiology**, **36**: 80–84.

111. Werren, J. H., Hurst, G. D., Zhang, W., Breeuwer, J. A., Stouthamer, R., Majerus, M. E., 1994. Rickettsial relative associated with male killing in the ladybird beetle (*Adalia bipunctata*). **Journal of Bacteriology**, **176** (2): 388–394.
112. Williamson, O. L., Poulson, I. D. F., 1979. Sex ratio organisms (*Spiroplasmas*) of *Drosophila*. pp. 175-208. In: The Mycoplasmas, (Eds: Whitcomb, R. F., Tully, J. G.) Academic Press, New York.
113. Hurst, G. D. D., Purvis, E. L., Sloggett J. J., Majerus, M. E. N., 1996. Male-killing bacterium in a fifth ladybird beetle, *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). **Heredity**, **77**: 177-185.
114. Hurst, G. D. D., Schulenburg, H. G., Majerus, T. M. O., Bertrand, D., Zakharov, I. A., Baungard, J., et al., 1999. Invasion of one insect species, *Adalia bipunctata*, by two different male-killing bacteria. **Insect Molecular Biology**, **8**:133-142.
115. Montenegro, H., Petherwick, A.S., Hurst, G.D.D., Klaczko, L.B., 2006. Fitness effects of *Wolbachia* and *Spiroplasma* in *Drosophila melanogaster*. **Genetica**. **127**: 207–215.
116. Haselkorn, T. S., Markow, T. E A., Moran, N.Y A., 2009. Multiple introductions of the *Spiroplasma* bacterial endosymbiont into *Drosophila*. **Molecular Ecology**, **18**: 1294–1305.
117. Randerson, A. P., Smithà, N. G. C., Hurst, L. D., 2000. The evolutionary dynamics of male-killers and their hosts. **Heredity**, **84**: 152-160.
118. Skinner, S. W. 1985. Son-killer: a third extrachromosomal factor affecting sex ratios in the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. **Genetics**, **109**: 745–754.
119. Werren, J. H.. 2004. *Arsenophonus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. 2), (Eds: G.M. Garrity). Springer-Verlag, New York.
120. Werren, J. H., Skinner, S. W., Huger, A. M., 1986. Male-killing bacteria in a parasitic wasp. **Science**, **231**: 990–992.
121. Darby, A. C., Choi, J. H., Wilkes, T., Hughes, M. A., Werren, J. H., Hurst, G. D. D., Colbourne, J. K., 2010. Characteristics of the genome of *Arsenophonus nasoniae*, sonkiller bacterium of the wasp *Nasonia*. **Insect Molecular Biology**, **19**: 75–89.

122. Degnan, P. H., Moran, N. A., 2008. Diverse phage-encoded toxins in a protective insect endosymbiont. **Applied and Environmental Microbiology**, **74**: 21, 6782–6791.
123. Rao, Q., Wang, S., Su, Y. L., Bing, X.-L., Liu, S. S., Wang, X. W., 2012. Draft Genome Sequence of "Candidatus *Hamiltonella defensa*," an Endosymbiont of the Whitefly *Bemisia tabaci*. **Journal of Bacteriology**, **194** (13): 3558–3558.
124. Zümreoglu, A., 1975. Sterile male tekniğini mücadelede uygulamak gayesiyle suni ortamlarda Akdeniz Meyve Sineği'ni yetiştirme metodları üzerinde araştırmalar. E. Ü. Zir. Fak. Ent. Zir. Zool. Kürs. Uzmanl. Tezi. Araştırma Eserleri serisi No: 34, 94s.
125. Joachim-Bravo, I. S., Alberto, S. N. M., Simões, D., 2009. Biological and behavioral aspects of two laboratory strains of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): the influence of periodic introduction of wild flies in the colony, **Vanessa Acta Zoológica Mexicana**, **25** (2): 359-374
126. Tezcan, H., Zümreoğlu, A., 1986. Laboratuvar koşullarında üretilen Akdeniz meyve sineği (*Ceratitis capitata*) (Wied.) (Diptera: Tephritidae) populasyonlardaki bazı kalite parametreleri üzerinde araştırmalar. **Türkiye Bitki Koruma Dergisi**, **10** (4): 237-243.
127. Doyle, J. J., Doyle, J. L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** **12**: 13-15.
128. Baldo, L., Hotopp, J. C. D., Jolley, K. A., Bordenstein, S. R., Biber, S. A., Choudhury, R. R., Hayashi, C., Maiden, M. C. J., Tettelin, H., Werren, J. H., 2006. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. **Applied and Environmental Microbiology**, **72**: 7098–7110.
129. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, **173**: 697–703.
130. Hanner, R., Fugate, M., 1997. Branchiopod phylogenetic reconstruction from 12S rDNA sequence data. **Journal of Crustacean Biology**, **17**: 174–183.
131. Morimoto, S., Kurtti, T. J., Noda, H., 2006. In vitro cultivation and antibiotic susceptibility of a Cytophaga-like intracellular symbiote isolated from the tick *Ixodes scapularis*. **Current Microbiology**, **52**: 324–329.

132. Kenyon, S. G., Hunter, M. S., 2007. Manipulation of oviposition choice of the parasitoid wasp, *Encarsia pergandiella*, by the endosymbiotic bacterium *Cardinium*. **Journal of Evolutionary Biology** **20** (2): 707-716
133. Quesada-Moraga E., Martin-Carballo, I., Garrido-Jurado, I., Santiago-Álvarez, C., 2008. Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Biological Control**, **47**: 115–124.
134. Spanos, L., Koutroumbas, G., Kotsyfakis, M., Louis, C., 2000. The mitochondrial genome of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. **Insect Molecular Biology**, **9**: 139-144.
135. Wilkes, T. E., Darby, A. C., Choi, J. H., Colbourne, J. K., Werren, J. H., Hurst, G. D. 2010. The draft genome sequence of *Arsenophonus nasoniae*, son-killer bacterium of *Nasonia vitripennis*, reveals genes associated with virulence and symbiosis. **Insect Molecular Biology**, **19**: 59-73.
136. Weisburg, W. G., Tully, J. G., Rose, D. L., Petzel, J.P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T.G., Van Etten, J., Maniloff, J., Woese, C. R., 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. **Journal of Bacteriology**, **171** (12): 6455–6467.
137. Ekesi, S., Mohamed, S. A., 2011. Mass rearing and quality control parameters for Tephritid fruit flies of economic importance in Africa. pp 387-395, *In*: Wide Spectra of Quality Control. Mass Rearing and Quality Control Parameters for Tephritid. (Eds: I. Akyar). InTech.
138. Caceres, C., 2002. Mass rearing of temperature sensitive genetic sexing strains in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*). **Genetica**, **116**: 107–116.
139. Cayol, J. P., Vilardi, J., Rial, E., Vera, A. T., 1999. New indices and method to measure the sexual compatibility and mating performance of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) laboratory-reared strains under field cage conditions. **Journal of Economic Entomology**, **92** (1): 140-145.
140. Kütük, M., 2003. Güney Batı Anadolu Bölgesi Meyve Sinekleri (Diptera: Tephritidae) Faunası ve Sistematigi Üzerine Araştırmalar, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, ss 217.
141. Vreysen, M. J. B., Hendrichs J., Enkerlin W. R., 2006. The sterile insect technique as a component of sustainable area-wide integrated pest management

- of selected horticultural insect pests. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, **14**: 107- 131.
142. Gherna, R. L., Werren, J. H., Weisburg, W., Cote, R., Woese, C. R., Mandelco, L., Brenner, D. J., 1991. *Arsenophonus nasoniaegen*.-nov., sp.-nov., the causative agent of the son killer trait in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **41**: 563–565.
 143. Moran, N. A., Russell, J. A., Koga, R., Fukatsu, T., 2005. Evolutionary relationships of three new species of enterobacteriaceae living as symbionts of aphids and other insects. **Applied and Environmental Microbiology** **71** (6): 3302–3310.
 144. Werren, J. H., Windsor, D. D., LI LI RONG RONG GUO GUO. 1995b. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. **Proceedings of the Royal Society B**, **262**: 197-204.
 145. Lawson, E. T., Mousseau, T. A., Klaper, R., Hunter, M. D., Werren, J. H., 2001. Rickettsia associated with male-killing in a buprestid beetle. **Heredity**. **86**: 497–505.
 146. Topakcı, N., Göçmen, H., 2003. *Wolbachia* bakterileri ve entomolojideki yeri, **Bahçe** **32** (1-2): 63 - 68.
 147. Dobson, S. L., Bourtzis, K., Braig, H. R., Jones, B. F., Zhou, W., Rousset, F., O'Neill, S. L.. 1999. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, **29**: 153–160.
 148. Nirgianaki, A., Banks, G. K., Frohlich, D. R., Veneti, Z., Braig, H. R., Miller, T. A., Bedford, I. D., Markham, P. G., Savakis, C., Bourtzis, K., 2003. *Wolbachia* infections of the whitefly *Bemisia tabaci*. **Current Microbiology**. **47**: 93–101.
 149. Jahan, S. M. H., Rahman, M. A., Asaduzzaman, M., Lee, K. Y., 2011. Secondary endosymbionts distribution in Bangladesh whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae). **Journal of Agro-Environment**, **5** (1): 45-50.
 150. Bourtzis, K., Nirgianaki, A., Onyango, P., Savakis, C., 1994. A prokaryotic dnaA sequence in *Drosophila melanogaster*: *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility among laboratory strains. **Insect Molecular Biology**, **3** (3):131-142.

151. Rocha, L., Mascarenhas, R., Perondini, A. P., Selivon, D., 2005. Occurrence of *Wolbachia* in Brazilian Samples of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Neotropical Entomology**, **34** (6): 1013-1015.
152. Ros, V. I. D., Fleming, V. M., Feil, E. J., Breeuwer, J. A. J., 2012. Diversity and recombination in *Wolbachia* and *Cardinium* from Bryobia spider mites. **BMC Microbiology**, **12**: S13.
153. Martin, O. Y., Puniamoorthy, N., Gubler, A., Wimmer, C., Germann, C., Bernasconi, M. V., 2013. Infections with the microbe *Cardinium* in the Dolichopodidae and other Empidoidea. **Journal of Insect Science**, **13** (47): 1-13.
154. Hunter M. S., Zchori-Fein E., (TARİH) Inherited Bacteroidetes symbionts in arthropods pp 39-52. *In*: Insect Symbiosis Volume 2. (Eds: Kostas, B., Thomas, A. M.) CRC Press, Taylor & Francis Group.
155. Latorre, A., Moya, A., Comparative genomics in *Buchnera aphidicola*, primary endosymbiont of aphids. pp 168-169, *In*: Insect Symbiosis Volume 2. (Eds: Kostas, B., Thomas, A. M.). CRC Press, Taylor & Francis Group.
156. Fenn, K., Blaxter, M., 2007. Coexist, cooperate and thrive: *Wolbachia* as long-term symbionts of filarial nematodes. pp 66–76, *In*: *Wolbachia*: a bug's life in another bug (Issues in infectious diseases) Volume 5. (Eds: Hoerauf, A., Rao, R. U., Karger,
157. Werren, J. H., Hurst, G. D., Zhang, W., Breeuwer, J. A., Stouthamer, R., Majerus, M. E., 1994. Rickettsial relative associated with male killing in the ladybird beetle (*Adalia bipunctata*). **Journal of Bacteriology**, **176** (2): 388–394.
158. Grindle, N., Tyner, J. J., Clay, K., and Fuqua, C. 2003. Identification of *Arsenophonus*-type bacteria from the dog tick *Dermacentor variabilis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, **83**: 264–266.
159. Clay, K., Klyachko, O., Grindle, N., Civitello, D., Oleske, D., Fuqua, C., 2008. Microbial communities and interactions in the lone star tick, *Amblyomma americanum*. **Molecular Ecology**, **17**: 4371–4381.
160. Dergousoff, S. J., Chilton, N. B., 2010. Detection of a new *Arsenophonus*-type bacterium in Canadian populations of the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni*. **Experimental and Applied Acarology**, **52**: 85–91.

161. Hypsa, V., Dale, C., 1997. In vitro culture and phylogenetic analysis of “Candidatus *Arsenophonus triatominarum*,” an intracellular bacterium from the triatomine bug, *Triatoma infestans*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **47**: 1140–1144.
162. Wang, W.-X., Luo, J., Lai, F.-X., Fu, Q., 2010. Identification and phylogenetic analysis of symbiotic bacteria *Arsenophonus* from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal) (Homoptera: Delphacidae). **Acta Entomologica Sinica**, **53**: 647–654.
163. Rana, V. S., Singh, S. T., Priya, N. G., Kumar, J., Rajagopal, R., 2012. *Arsenophonus* GroEL interacts with CLCuV and is localized in midgut and salivary gland of whitefly *B. tabaci*. **Plos One**, **7** (8): 1-13.
164. Dunn, A. K., Stabb, E. V., 2005. Culture-independent characterization of the microbiota of the ant lion *Myrmeleon mobilis* (Neuroptera: Myrmeleontidae). **Applied and Environmental Microbiology**, **71**: 8784–8794.
165. Fukatsu, T., Tsuchida, T., Nikoh, N., Koga, R., 2001. *Spiroplasma* symbiont of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). **Applied and Environmental Microbiology** **67**: 1284–1291.
166. Tinsley, M. C., Majerus, M. E. N, 2006. A new male-killing parasitism: *Spiroplasma* bacteria infect the ladybird beetle *Anisosticta novemdecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). **Parasitology**, **132**: 757-765.
167. Brinton, L. P., Burgdorfer, W., 1976. Cellular and subcellular organization of the 277F agent, a *Spiroplasma* from the rabbit tick (*Haemaphysalis leporispalustris* (Acari: Ixodidae)). **International Journal of Systematic Bacteriology**, **26**: 554-560.
168. Tully, J. G., Rose, D. L., Yunker, C. E., Carle, P., Bove, J. M., Williamsen, D. L., Whitcomb, R. F., 1995. *Spiroplasma ixodetis* sp. nov., a new species from *Ixodes pacificus* ticks collected in Oregon. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **45**: 23-28 .
169. Reeves, W. K., Dowling, A. P. G., Dasch, G. A., 2006 Rickettsial agents from parasitic Dermanyssoidea (Acari: Mesostigmata). **Experimental and Applied Acarology**, **38**: 181–188

170. Ishikawa, H., 2003. Insect Symbiosis: An Introduction. pp 11-13, *In: Insect Symbiosis (Contemporary Topics in Entomology Series)* (Eds: Bourtzis K. and Miller T. A.) CRC Press, Boca Raton, Florida, US.
171. Xie, J., Vilchez, I., Mateos, M., 2010. *Spiroplasma* bacteria enhance survival of *Drosophila hydei* attacked by the parasitic wasp *Leptopilina heterotoma*. **PLoS ONE** **5** (8): 1-7.
172. Whitcomb, R. F., 1980, The genus *Spiroplasma*. **Annual Review of Microbiology**, **34**: 677-709.
173. Anbutsu, H., Fukatsu, T., 2003. Population dynamics of male-killing and non-male-killing *Spiroplasmas* in *Drosophila melanogaster*. **Applied and Environmental Microbiology**, **69** (3): 1428–1434.
174. Majerus, T. M. O., Majerus, M. E. N., 2010. Discovery and identification of a male-killing agent in the Japanese ladybird *Propylea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae). **BMC Evolutionary Biology**, **10**: 37 1-10.
175. Niu, L., Ningxin, W., Zi, L., Xiangliang, M., Peiguang, L., Xu, C., Jia, S., Huang, D., 2013. Screening of reproductive endosymbionts indicates *Wolbachia* flourish alone across fig wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea). **Journal of Food, Agriculture & Environment**, **11** (3-4): 979-985.
176. Lorenzo-Carballa, M. O., Cordero-Rivera, A., 2009. Thelytokous parthenogenesis in the damselfly *Ischnura hastata* (Odonata, Coenagrionidae): genetic mechanisms and lack of bacterial infection. **Heredity**, **103** (5): 377-384.
177. Watts, T., Haselkorn, T S., Moran, N A., Markow, T A., 2009. Variable incidence of *Spiroplasma* infections in natural populations of *Drosophila* species. **PLoS ONE**, **4** (5):1-6.
178. Higashiura, Y., Yamaguchi, H., Ishihara, M., Ono, N., Tsukagoshi, H., Yokobori, S., Tokishita, S., Yamagata, H., Fukatsu, T., 2011. Male death resulting from hybridization between subspecies of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. **Heredity**, **106** (4): 603-613.
179. Rouchet, R., 2012. Host-parasitoid coevolution : The Role of Parasitoid Adaptation to Endosymbiont-Mediated Defence in Aphids. University of Rennes, France. Mc of Sci. Thessis, pp 53-54.

180. Wetzter, R., 2001. Hierarchical analysis of mtDNA variation and the use of mtDNA for isopod (Crustacea: Peracarida: Isopoda) systematics. **Contributions to Zoology**, **70**: 23-39.
181. Augustinos, A. A., Santos-Garcia, D., Dionyssopoulou, E., Moreira, M., Papapanagiotou, A., Scarvelakis, M., Doudoumis, V., Ramos, S., Aguiar, A. F., Borges, P. A. V., Khadem, M., Latorre, A., Tsiamis, G., Bourtzis, K., 2011. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in natural populations of aphids: is the hidden diversity fully unraveled? **PLoS ONE**, **6**: 12, 1-11.
182. Doudoumis, V., Tsiamis, G., Wamwiri, F., Brelsfoard, C., Alam, U., Aksoy, E., Dalaperas, S., Abd-Alla, A., Ouma, J., Takac, P., Aksoy, S., Bourtzis, K., 2012. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in laboratory and natural populations of different species of tsetse (genus *Glossina*). **BMC Microbiology**, **12**: 1-13.
183. Zhao, D. X., Zhang, X. F., Hong, X. Y., 2013. Host-symbiont interactions in spider mite *Tetranychus truncates* doubly infected with *Wolbachia* and *Cardinium*. **Environmental Entomology**, **42** (3):445-452.
184. Goto, S., Anbutsu, H., Fukatsu, T., 2006. Asymmetrical interactions between *Wolbachia* and *Spiroplasma* endosymbionts coexisting in the same insect host. **Applied and Environmental Microbiology**, **72**: 4805–4810.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Tayfun KAYA
 Uyuğu: Türkiye (TC)
 Doğum Tarihi ve Yeri: 14 Mayıs 1981, Hacıbektaş / Nevşehir
 Medeni Durumu: Evli
 Tel: +90 386 280 45 19
 Fax: +90 386 280 45 25
 email: tkaya@ahievran.edu.tr
 Yazışma Adresi: Ahi Evran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bağbaşı Yerleşkesi, 40100 Kırşehir

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	GÜ Fen Bilimleri Enstitüsü	2008
Lisans	GÜ Kırşehir Fen Edb. Fak.	2004

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2006 – -----	AEÜ Fen Edb. Fak. Biyoloji Böl.	Araştırma Görevlisi
2005 – 2006	GÜ Kırşehir Fen Edb. Fak. Biyoloji Böl.	Araştırma Görevlisi
2004 – 2005	IMC Özel Hastanesi	Laboratuvar Teknisyeni

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

A. SCI indeksine kayıtlı dergilerde yayınlanan

1. **Kaya, T.**, Aslim, B., Kariptaş, E., 2014. Production of biosurfactant by *Pseudomonas* spp. isolated from industrial waste in Turkey. **Turkish Journal of Biology**, **38**: Baskıda. (DOI: 10.3906/biy-1303-18)
2. Ozturk, S., **Kaya, T.**, Aslim, B., Tan, S., 2012. Removal and reduction of chromium by *Pseudomonas* spp. and their correlation to rhamnolipid production. **Journal of Hazardous Materials**, **231-232**: 64-69.

3. Erdem, B., Kariptaş, E., **Kaya, T.**, 2010. Siderophore, hemolytic, protease, and pyrazinamidase activities and antibiotic resistance in motile *Aeromonas* isolated from fish. **Turkish Journal of Biology**, **34**: 453-462.

B. Hakemli dergilerde yayımlanan

1. **Kaya, T.**, Kariptaş, E., Aslım, B., 2007. Biyosüpfektanlar ve biyoteknolojik önemi. **Anadolu University Journal of Science and Technology**, **2**: 325-335.

C. Yer aldığı Projeler

1. Çam kese böceğı türlerinden *Wolbachia* bakterisinin yalıtımı ve tanımlanması, Ahi Evran Üniveritesi Bilimsel Araştırmalar Projesi, PYO-FEN.4001.13.002, (2013-Devam ediyor).
2. Bazı zararlı böcek türlerinde *Wolbachia* bakterilerinin izolasyonu ve identifikasyonu, Ahi Evran Üniveritesi Bilimsel Araştırmalar Projesi, PYO-FEN-4001-12011, (2012-Devam ediyor).
3. *Wolbachia*-based strategies to increase *Ceratitidis capitata* Wiedemann (Diptera:Tephritidae) quality in support of SIT, Uluslar Arası Atom Enerjisi (IAEA) ve Dünya Gıda Örgütü (FAO) tarafından desteklenen Coordineli Araştırma Projesi (CRP), 17071/R0, (2011-Devam ediyor).

C. Görev Aldığı Ulusal ve Uluslar Arası Kongreler ve/veya Bilimsel Toplantılar

1. II. Türkiye Sulak Alanlar Kongresi, 27 Eylül- 01 Ekim 2010, Ahi Evran Üniversitesi, Kongre sekteryası.