

T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YEŞİL KURT, *Helicoverpa armigera* (LEPİDOPTERA: NOCTUİDAE): LABORATUVAR KOŞULLARINDA BAZI BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Seda YÜCEL

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YEŞİL KURT, *Helicoverpa armigera* (LEPİDOPTERA: NOCTUİDAE): LABORATUVAR KOŞULLARINDA BAZI BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Seda YÜCEL

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: **05/08/2019**

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Hanife GENÇ

ÇANAKKALE

Seda YÜCEL tarafından Prof. Dr. Hanife GENÇ yönetiminde hazırlanan ve **05/08/2019** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan "**Yeşil Kurt, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): Laboratuvar Koşullarında Bazı Biyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Moleküler Karakterizasyonu**" başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof. Dr. Hanife GENÇ ……

Başkan

Doç. Dr. Nimet Sema GENÇER ……

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Tülay TURGUT GENÇ ……

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ
Müdür
Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:……

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: FYL-2018/2466

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Seda YÜCEL

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen, çalışmamı yaparken bana her konuda yol gösteren ve destek olan, eğitim hayatım boyunca büyük yeri olan saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Hanife GENÇ'e,

Arazi çalışmalarının yürütülmesinde teknik desteklerinden dolayı Çanakkale Tarım İl Müdürlüğü'ne, Dr. Berrin ALACA ve Ziraat Mühendisi Fatih ERGİN'e,

Moleküler çalışmaların gerçekleştirilmesinde ve sonuçların yorumlanmasında bana yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Tülay TURGUT GENÇ ve doktora öğrencisi Melik GÜNAY'a,

Araştırmanın yürütülmesinde bana destek sağlayan FYL-2018/2466 nolu proje için Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Proje Komisyonu Başkanlığı'na,

Hayatımın her evresinde bana destek olan değerli aileme ve her daim yanımda olan yol arkadaşım Akın KUYULU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Seda YÜCEL

Çanakkale, Ağustos 2019

SİMGELER VE KISALTMALAR

mm	Milimetre
mg	Miligram
g	Gram
ml	Mililitre
ha	Hektar
da	Dekar
cm	Santimetre
˚C	Santigrad
%	Yüzde oranı
EtOH	Etanol
♀	Dişi
♂	Erkek
µl	Mikrolitre
BSA	Bovine Serum Albumin
mtDNA	Mitokondriyal DNA
COI	Sitokrom oksidaz I
S	Polimorfik alan sayısı
N_h	Haplotip sayısı
T_s	Transition
T_v	Transversion
k	Nükleotid farklılığı
h	Haplotip çeşitliliği
π	Nükleotid çeşitliliği
COI	Sitokrom oksidaz I
DNA	Deoksiribonükleik asit
bp	Base pair (baz çifti)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool

ÖZET

YEŞİL KURT, *Helicoverpa armigera* (LEPİDOPTERA: NOCTUİDAE): LABORATUVAR KOŞULLARINDA BAZI BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Seda YÜCEL
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
Danışman : Prof. Dr. Hanife GENÇ
05/08/2019, 94

Bu çalışma, yeşil kurdun *Helicoverpa armigera* Hübner, laboratuvarda domates üzerinde biyolojik özelliklerinin belirlenmesi, laboratuvarda konukçusuna bağlı kalmadan yetiştirilmesi için farklı yapay diyetlerin test edilerek en iyi larva diyetinin tespit edilmesi, yapay diyet üzerinde ve domateste beslenen yeşil kurt bireylerinin toplam protein miktarlarının tespit edilmesi ve genetik çeşitliliğinin moleküler yöntemlerle belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın birinci aşamasında, yeşil kurdun toplamda 6 larva dönemi geçirdiği, larva gelişme süresinin ortalama 18,2±0,83 gün ve pupa gelişme süresinin de 9,31±0,79 gün olduğu belirlenmiştir. Bir dişinin ortalama 1096,3±105,56 adet yumurta bıraktığı tespit edilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında, test edilen yapay diyetlerden diyet I ve II'de yeşil kurt larvaları laboratuvarda dört generasyon boyunca devamlı olarak başarılı bir şekilde yetiştirilmiş olup, larvaların laboratuvarda beslenmesi için besin ihtiyacının karşılanmasında uygun diyetler olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın üçüncü aşamasında, toplam protein miktarı yeşil kurt olgun larvalarında ortalama 24,37±2,63 µg/mg, pupalarında 51,14±2,66 µg/mg ve erginlerinde 33,91±4,86 µg/mg olarak belirlenmiştir. Çalışmanın son aşamasında, Çanakkale, Balıkesir ve Bursa bölgesindeki 16 farklı lokasyonu temsil eden 45 örnekten mtDNA COI bölgesinde 536 bp'lik konsensus bölge elde edilmiştir. Yapılan analizlerde bu gen bölgesinde 13 haplotip ve 13 mutasyon belirlenmiş olup, Çanakkale, Balıkesir ve Bursa'dan elde edilen *H. armigera* popülasyonlarında yüksek genetik çeşitlilik tespit edilmiştir. *H. armigera* popülasyonlarının ülkemizde ilk kez moleküler çeşitlilikleri bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

Anahtar sözcükler: Yeşil Kurt, *Helicoverpa armigera*, Biyoloji, Yapay Diyet, Genetik Çeşitlilik.

ABSTRACT

BOLLWORM, *Helicoverpa armigera* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE): DETERMINATION OF SOME BIOLOGICAL PROPERTIES IN LABORATORY CONDITIONS AND MOLECULAR CHARACTERIZATION

Seda YÜCEL

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Agricultural Biotechnology

Advisor : Prof. Dr. Hanife GENÇ

05/08/2019, 94

This study was conducted to determine the biological properties of bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner on tomato fruits and select the best larval diet by testing different artificial diets for continuous rearing without depending host in the laboratory and report the total protein content of bollworm individuals fed on artificial diet and tomato fruits and determine genetic diversity by molecular methods. In the first part of the study, the biological properties were reported. The bollworm larvae had 6 instars, larval duration period was about 18,2±0,83 days and pupal duration was about 9,31±0,79 days. The mean fecundity was 1096,3±105,56 number/eggs. In the second part of the study, different artificial diets were tested. Among the artificial tested diets, bollworm larvae were successfully reared in the laboratory for four generations in Diet I and Diet II, and were nutritionally suitable for larval feeding. In the third part of the study, total protein amount was about 24,37±2,63 µg/mg for mature larvae, 51,14±2,66 µg/mg for pupae and 33,91±4,86 µg/mg for adults. In the final part of the study, 536 bp consensus regions were obtained from mtDNA COI region from 45 samples representing 16 different locations in Çanakkale, Balıkesir and Bursa. In this analysis, 13 haplotypes and 13 mutations were identified in COI region and high genetic diversity was detected among *H. armigera* population obtained from Çanakkale, Balıkesir and Bursa. In this study, molecular diversity of *H. armigera* population was evaluated for the first time in Turkey.

Keywords: Bollworm, *Helicoverpa armigera*, Biology, Artificial Diet, Genetic Diversity.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI iii
TEŞEKKÜR iv
SİMGELER VE KISALTMALAR v
ÖZET vi
ABSTRACT viii
ŞEKİLLER DİZİNİ xi
ÇİZELGELER DİZİNİ xiii
BÖLÜM 1
GİRİŞ 1
BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 8
2.1. Yeşil Kurt (*Helicoverpa armigera*)'un Biyolojisi Üzerine Yapılan Bazı Çalışmalar 8
2.2. Yeşil Kurt (*Helicoverpa armigera*)'un Yapay Diyet Üzerine Beslenme İle İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar 11
2.3. Yeşil Kurt (*Helicoverpa armigera*)'un Genetik Çeşitliliği Üzerine Yapılan Bazı Çalışmalar 14
BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM 18
3.1. Materyal 18
3.2. Yöntem 19
3.2.1. Arazi ve Örnekleme Çalışmaları 19
3.2.2. Laboratuvar Çalışmaları 22
3.2.2.1. Doğal Konukçusu Üzerinde Yeşil Kurdun Yetiştirilmesi 22
3.2.2.2. Pupa Dönemi İçin Uygun Ortamın Oluşturulması 23
3.2.2.3. Ergin Bireylerin Yetiştirilmesi 23
3.2.2.4. Müze Materyalinin Oluşturulması 25
3.2.3. Yeşil Kurdun Doğal Konukçusu Olan Domates Üzerinde Biyolojik Dönemlerinin İncelenmesi 26
3.2.3.1. Yumurta Döneminin İncelenmesi 26
3.2.3.2. Larva Döneminin İncelenmesi 27
3.2.3.3. Prepupa ve Pupa Döneminin İncelenmesi 28
3.2.3.4. Ergin Döneminin İncelenmesi 28
3.2.3.5. Bırakılan Yumurta Sayısının Belirlenmesi 29

3.2.4. Yeşil Kurdun Yapay Diyetlerinin Hazırlanması 30
3.2.4.1. Yapay Diyet I ve Hazırlanması 30
3.2.4.2. Yapay Diyet II ve Hazırlanması 31
3.2.4.3. Yapay Diyet III ve Hazırlanması 31
3.2.4.4. Yapay Diyet IV ve Hazırlanması 32
3.2.4.5. Yapay Diyet V ve Hazırlanması 32
3.2.4.6. Yapay Diyet VI ve Hazırlanması 33
3.2.4.7. Yapay Diyet Denemelerinin Oluşturulması ve İzlenmesi 34
3.2.4.8. İstatistiksel Analizler 35
3.2.5. Yeşil Kurdun Protein Analizi 35
3.2.6. Yeşil Kurdun Moleküler Çeşitliliğinin Belirlenmesi 37
3.2.6.1. Genomik DNA İzolasyonu 37
3.2.6.2. DNA Miktarı ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi 39
3.2.6.3. Agaroz Jel Elektroforezi 39
3.2.6.4. Hedef mtDNA Bölgesinin PCR Amplifikasyonu ve Optimizasyonu 40
3.2.6.5. DNA Dizi Analizi 42
3.2.6.6. Filogenetik Analizler 42
BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 44
4.1. Yeşil Kurdun Domates Üzerindeki Biyolojik Dönemlerinin Belirlenmesi 44
4.1.1. Yumurta Dönemi 44
4.1.2. Larva Dönemi 45
4.1.3. Pupa Dönemi 49
4.1.4. Ergin Dönemi 50
4.2. Yeşil Kurdun Yapay Diyet Ortamlarında Yetiştirilmesi 52
4.3. Yeşil Kurt Bireylerinin Protein İçeriklerinin Belirlenmesi 57
4.4. Yeşil Kurdun Moleküler Çeşitliliğinin Belirlenmesi 59
4.4.1. Yeşil Kurt DNA Miktarı ve Konsantrasyonu Ölçümleri 59
4.4.2. Yeşil Kurt mtDNA COI Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyonları ve Dizi Analizleri 61
BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER 82
KAYNAKLAR 84
ÖZGEÇMİŞ I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Böcek mitokondriyal genomu (Jalali ve ark., 2015) 6
Şekil 3.1. Eceabat'taki domates tarlalarında yeşil kurt ile bulaşık domateslerin genel görünümü (A ve B) ve bulaşık domateslerin incelenmesi (C ve D) 18
Şekil 3.2. Çanakkale ili ve çevresindeki *H. armigera*'nın sörvey alanları 20
Şekil 3.3. Yeşil kurt ile bulaşık domates meyvesi (A), larvalara ait beslenme izi ve giriş deliği (B), bulaşık örneklerin poşette (C) ve kese kağıtlarında laboratuvara getirilmesi (D) 21
Şekil 3.4. Yeşil kurt larva yetiştirme ortamı (A), olgun dönemde larvada kannibalizm (B), kannibalizm sonucu zarar görmüş larva (C) ve tekli kültür kabı (D) 22
Şekil 3.5. Laboratuvarda pupa dönemi için hazırlanan ortam (A), son dönem larvanın kumun içine girmesi (B), kumda oluşan pupa (C) ve pupaların genel görünümü (D) 23
Şekil 3.6. Ergin kafesinin dış görünümü (A) ve ballı su ile beslenen ergin bireyler (B) 24
Şekil 3.7. Ergin yetiştirme kafesinin içeriden (A) ve dışarıdan (B) görünümü 24
Şekil 3.8. Çiftleşen ergin bireylerin uzaktan (A) ve mikroskop altında görünümü (B) 25
Şekil 3.9. Domates yaprağının üst kısmına (A) ve alt kısmına (B) bırakılan yumurtalar 25
Şekil 3.10. Köpük üzerinde gerilmiş ve kurumaya bırakılmış yeşil kurt ergin kelebeklerin görünümü 26
Şekil 3.11. Domates yapraklarına bırakılan yumurtaların görünümü (A) ve yumurtaların petri kabına toplanılması (B) 27
Şekil 3.12. Laboratuvarda yeşil kurt larvalarının yetiştirilmesinde kullanılan kültür kabı (A), larvaya ait kafa kapsülü ve atılan deri (B) ve kafa kapsülünün saklanması (C) 28
Şekil 3.13. Laboratuvarda 1♀:1♂ çiftleştirme kafesinin görünümü (A) ve erginlerin kafeste dışarıdan görünümü (B) 29
Şekil 3.14. Dişinin ergin kafesinin teline yumurta bırakması (A), yumuşak beze bırakılan yumurta (B) ve yumurtanın petri kabında görünümü (C) 30
Şekil 3.15. Yapay diyetin aktarılan kaptaki görünümü ve saklanması 31
Şekil 3.16. Biyoloji çalışmalarında kullanılan I. dönem larva (A), test edilen yapay diyetlerin petri kabında görünümü (B) ve olgun larva (C) 35
Şekil 3.17. Örneklere Bradford solüsyonu ilave edilmesi (A) ve boyanın mikroplaka üzerinde örneklere bağlanması (B) 36
Şekil 3.18. DNA izolasyonu aşamaları. Örneklerin mikropestil ile ezilmesi (A), tüplere Proteinaz K ilave edilmesi (B), tüplerin sıcak su banyosuna yerleştirilmesi (C), örneklere vorteks uygulanması (D), tüplere etanol eklenilmesi (E), spin column hazırlanması (F) 38
Şekil 3.19. Nanodrop ile DNA tayini. Elution buffer solüsyonu ile blank alınması (A), gDNA örneklerinin cihaza yüklenilmesi (B) ve cihazda okumanın gerçekleştirilmesi (C) 39
Şekil 3.20. Agarozun tartılması (A), agaroz jele ethidium bromide ilave edilmesi (B) ve agaroz jelin elektroforez aparatına dökülmesi (C) 40
Şekil 3.21. Tüplerin PCR makinesine yerleştirilmesi (A) ve çalışmada kullanılan PCR cihazı (B) 40
Şekil 3.22. Örneklerin loading dye ile karıştırılması (A), örneklerin kuyucuklara yüklenmesi (B) ve elektroforez düzeneğinin çalıştırılması (C) 41
Şekil 4.1. Yeşil kurt yumurta dönemi. Yeni bırakılan yumurta (A), iki gün yaşta yumurta (B), açılmak üzere olan yumurtanın görünümü (C) 44

Şekil 4.2. Yeşil kurdun larva dönemleri. (A) I. larva dönemi, (B) II. larva dönemi, (C) III. larva dönemi,(D) IV. larva dönemi, (E) V. larva dönemi, (F) V. larva dönemi46
Şekil 4.3. I. dönem larvanın açılan yumurta kabuğu (A) ve açılmamış yumurta ile beslenmesi (B) 47
Şekil 4.4. Yeşil kurdun larva dönemlerinin kafa kapsülleri 48
Şekil 4.5. Yeşil kurdun prepupa ve pupa dönemi. Pre pupa (A), yeni oluşan pupa (B), bir saat yaşında pupa (C), üç saat yaşında pupa görünümü (D) 49
Şekil 4.6. Yeşil kurdun pupalarının cinsiyetleri (A ve B) 50
Şekil 4.7. Yeşil kurt erginlerinin dorsal ve ventralden görünümü. Dişi bireyin dorsal görünümü (A), dişi bireyin ventral görünümü (B), erkek bireyin dorsal görünümü (C), erkek bireyin ventral görünümü (D) 52
Şekil 4.8. Yeşil kurdun yapay diyet I'de beslenmesi. II. dönem larva (A), III. dönem larva (B), IV. dönem larva (C), olgun larvanın kuma girmesi (D) 54
Şekil 4.9. Yeşil kurdun yapay diyet II'de beslenmesi. IV. dönem larva (A), V. dönem larva (B), diyette kafa kapsülü ile birlikte bulunan pupa (C) 54
Şekil 4.10. 595 nm dalga boyundaki BSA protein standart eğrisi 57
Şekil 4.11. Farklı biyolojik dönemlerdeki yeşil kurdun protein miktarları 58
Şekil 4.12. Farklı yapay diyet üzerinde beslenen yeşil kurt erginlerinin protein içerikleri 58
Şekil 4.13. Farklı lokasyonlardan izole edilen yeşil kurt gDNA örneklerinin %0,7'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü (M: markır; 1-kb DNA ladder, H1: Eşelek/Gökçeada, H2: Eşelek/Gökçeada, H3: Eşelek/Gökçeada, H4: Umurbey/Lapseki, H5: Umurbey/Lapseki, H6: Umurbey/Lapseki, H7: İvrindi/Balıkesir) 60
Şekil 4.14. Farklı lokasyonlardan izole edilen yeşil kurdun mtDNA COI PCR amplifikasyon ürünlerinin %1'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü (M: markır; 1-kb DNA ladder, H1: Çamoba/Ezine, H2: Tevfikiye/Çanakkale, H3: Kösedere/Ayvacık, H4: Nebiler/Bayramiç, H5: Geyikli/Geyikli, H6: Batakovası/Çanakkale, H7: Kösedere/Ayvacık, H8: Çamoba/Ezine, H9: Orhaneli/Bursa, H10: Batakovası/Çanakkale, H11: Dümrek/Çanakkale) 61
Şekil 4.15. 45 adet yeşil kurt örneğine ait mtDNA COI gen bölgesinin MEGA X programında hizalama görünümü 62
Şekil 4.16. Test edilen 45 yeşil kurt bireyindeki COI geninin farklı haplotiplere ait gen dizileri 67
Şekil 4.17. Yeşil kurt COI haplotiplerinin ağ modeli (Median-Joining Network) 73
Şekil 4.18. Yeşil kurt bireylerinin uyumsuzluk (Mismatch) dağılım analizi 74
Şekil 4.19. Yeşil kurt bireyleri arasındaki COI genine dayalı filogenetik ilişki (536 bp; NJ modeli) 74
Şekil 4.20. Test edilen 45 yeşil kurt bireyinin UPGMA dendogramı 75

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Domates üretiminde ilk beş sıradaki ülkeler (FAOSTAT, 2017) 1
Çizelge 1.2. Çanakkale ili ve ilçelerindeki sofralık ve salçalık domates üretim alanları (TÜİK, 2018) 2
Çizelge 3.1. Yeşil kurdun Çanakkale ili ve çevresindeki sörveyleri sonucunda yayılış alanı, varlığı ve örnek alınan yerleri 20
Çizelge 3.2. Yeşil kurt için test edilen yapay diyetlerin bileşenleri 33
Çizelge 3.3. Protein standardının (BSA) hazırlanması 37
Çizelge 3.4. PCR'da kullanılan kimyasalların konsantrasyonları ve miktarları 41
Çizelge 4.1. Yeşil kurt larva dönemlerine ait kafa kapsülü eni ve boyu (Ort±SH, n=14) ... 47
Çizelge 4.2. Yeşil kurdun larva gelişme dönemlerindeki eni, boyu, ağırlığı ve gelişme süreleri (Ort±SH, n=14) 48
Çizelge 4.3. Yeşil kurt bir dişi erginin bıraktığı yumurta sayısı (adet), ovipozisyon süreleri (gün) ve ergin ömürleri (gün) (Ort±SH, n=10) 51
Çizelge 4.4. Yapay diyetler ve doğal konukçu üzerinde yetiştirilen yeşil kurdun biyolojik parametreleri (Ort±SH, n=30) 53
Çizelge 4.5. Yapay diyetlerde ve domateste yetiştirilen yeşil kurt larvalarının kafa kapsülü çapı ölçümleri (Ort±SH, n=15) 56
Çizelge 4.6. *H. armigera* örneklerinin gDNA miktarı ve konsantrasyonu 59
Çizelge 4.7. Test edilen 45 yeşil kurt bireyinin aksesyon numaraları 63
Çizelge 4.8. Yeşil kurt haplotipleri arasındaki ikili baz çifti karşılaştırmaları 65
Çizelge 4.9. Yeşil kurt popülasyonları arasındaki ikili genetik uzaklık (F_{st}) değerleri 66
Çizelge 4.10. Test edilen yeşil kurt popülasyonlarının genetik varyasyonları 72
Çizelge 4.11. Yeşil kurt popülasyonlarında COI bölgesinde tespit edilen haplotiplerin mutasyon bölgeleri ve nükleotid değişimleri (536 bp) 76

BÖLÜM 1
GİRİŞ

Domates (*Solanum lycopersicum* L.), dünyada ve ülkemizde yoğun üretimi yapılan, Güney Amerika orijinli, tek yıllık bir bitkidir. Dünya genelinde toplam domates üretim alanı 182,301,395 ton, ekilen alan 4,848,384 ha ve verim 37,600 ton/ha'dır. Türkiye'de ise domates üretim alanı 12,750,000 ton, ekilen alan 187,070 ha ve verim 68,156 ton/ha'dır. Çizelge 1.1'de belirtildiği üzere Türkiye domates üretimi bakımından dünyada Çin ve Hindistan'dan sonra 3. sırada yer almaktadır (Anonim, 2017).

Çizelge 1.1. Domates üretiminde ilk beş sıradaki ülkeler (FAOSTAT, 2017)

	Ülkeler	**Üretim (ton)**	**Ekilen alan (ha)**	**Verim (ton/ha)**
1	Çin	59,514,773	1,028,454	57,868
2	Hindistan	20,708,000	797,000	25,982
3	Türkiye	12,750,000	187,070	68,156
4	Amerika	10,910,990	126,070	86,547
5	Mısır	7,297,108	182,444	39,996

Ülkemizde 2018 yılında, domates ekim alanı sofralık 1,175,095 da ve salçalık ekim alanı ise 519,742 da alan olup, üretim miktarı ise sofralıkta 8,414,920 ton ve salçalıkta 3,735,080 ton'dur. Ülkemizde hemen hemen her yerde domates üretimi yapılmaktadır. İller bazında en fazla domates üretiminin yapıldığı yer 2,504,290 ton sofralık üretim miktarı ve 197,468 da ekim alanı ile Antalya'dır. Antalya ilinin ardından en fazla domates üretimi Mersin, Muğla, Çanakkale, Bursa ve Tokat illerinde yapılmaktadır (Anonim, 2018).

Çanakkale ili domates yetiştiriciliğinde ülkemizde dördüncü sırada yer alması ile önemli bir yere sahiptir. Çanakkale merkezde sofralık ekim alanı 12,805 da olup, üretim miktarı 98,865 ton'dur. İlçelerde ise en büyük paya 11,384 da sofralık ekim alanı ve 81,916 ton sofralık üretim miktarının yanında 13,700 da salçalık ekim alanı ve 112,440 ton salçalık üretim miktarı ile Biga ilçesi sahiptir (Anonim, 2018) (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Çanakkale ili ve ilçelerindeki sofralık ve salçalık domates üretim alanları (TÜİK, 2018)

	SOFRALIK		**SALÇALIK**	
İlçe Adı	**Ekilen alan (da)**	**Üretim miktarı (ton)**	**Ekilen alan (da)**	**Üretim miktarı (ton)**
Merkez	12,805	98,865	1,300	10,143
Ayvacık	4,450	32,464	230	1,725
Bayramiç	5,250	38,300	2,350	17,858
Biga	11,384	81,916	13,700	112,440
Bozcaada	25	104	20	89
Eceabat	1,303	8,318	90	593
Ezine	6,318	44,900	4,200	29,789
Gelibolu	5500	39,010	-	-
Gökçeada	150	912	100	608
Lapseki	3,550	23,380	200	1,419
Yenice	1,200	8,998	4000	27,155
Çan	203	1,350	350	2,376

Diğer tarımsal ürünleri etkileyen sıcaklık, su, nem, yağış, kuraklık gibi abiyotik faktörlerin yanında hastalık ve zararlı gibi biyotik faktörlerin etkisi de büyüktür. Bu faktörler üründe kalitenin düşmesine ve ürün kayıplarına neden olur. Domates üretimini olumsuz etkileyen birçok tarımsal zararlı bulunmaktadır. Bu zararlıların başında yeşil kurt (*Helicoverpa armigera* Hübner), domates yaprak güvesi (*Tuta absoluta* Meyrick), tütün thripsi (*Thrips tabaci* Lindeman), çiçek thripsi (*Frankliniella occidentalis* Pergande), iki noktalı kırmızı örümcek (*Tetranychus urticae* Koch) ve pas akarı (*Aculops lycopersici* Massee) gibi zararlılar gelmektedir. Domates üretimi yapılan çoğu alanda yeşil kurdun etkisi görülmekte olup, zararı oldukça önemlidir. Diğer zararlılar da uygun koşullarda ekonomik olarak zarar oluşturabilmektedir.

Yeşil kurt ülkemizde ilk defa 1913 yılında Bergama'da tespit edilmiştir (Alkan, 1948). Zararlı, ülkemizde Güney Anadolu bölgesinde pamuğun, Güneydoğu Anadolu bölgesinde bazı baklagillerin ve nohutun, Ege ve Marmara bölgesinde ise domates ve tütünün en önemli zararlısı olarak bildirilmiştir (Kaya, 2000). Zararlının dünyada ise Afrika (Güney Afrika, Libya, Mısır), Avrupa (Portekiz, Romanya, Yunanistan, İspanya), Asya (İran, Çin,Hindistan) ve Güney Amerika'da yaygın olarak dağılım gösterdiği ifade edilmiştir (Bueno ve Sosa-Gomez, 2014; Murua ve ark., 2014).

Yeşil kurt polifag bir zararlıdır. Zararlının konukçuları arasında başta domates (*Solanum lycopersicum* L.), biber (*Capsicum annuum* L.), patlıcan (*Solanum melongena*

L.), mısır (*Zea mays* L.), tütün (*Nicotiana tabacum* L.), bamya (*Abelmoschus esculentus* L.), nohut (*Cicer arietinum* L.), pamuk (*Gossypium* spp.), baklagiller, süs bitkileri vb. gelmektedir. Yeşil kurt larvalarının 40 familyaya ait 172 bitki türünde zarar yaptığı bildirilmiştir (Liu ve ark., 2004; Krinski ve Godoy, 2015). Zararlının farklı konukçular ile beslenmesinin larva gelişme süresi, pupa gelişme süresi, üremesi gibi bazı biyolojik parametrelere etki ettiği belirlenmiştir (Kakimoto ve ark., 2003; Liu ve ark., 2004; Naseri ve ark., 2010; Kouhi ve ark., 2014; Suits ve ark., 2017).

Yeşil kurt ergin bireylerin kanat açıklığı 35-37 mm olup, vücut uzunluğu 18-20 mm'dir. Vücut kremsi beyaz renkte ve ön kanatlarının üzerinde böbrek şeklinde lekeler bulunmaktadır. Kanatların dışında bulunan saçaklar krem rengindedir (Öngören ve ark., 1977). Erginler alacakaranlıkta aktiftir. Gündüz az hareketli olup, ergin bireyler ışık görmeyen kuytu yerlerde gizlenir. Yumurta bırakma ve pupadan ergin çıkışının meydana gelmesi alacakaranlıkta gerçekleşmektedir. Çiftleşmenin ardından dişi bireyler yumurtalarını konukçu bitkinin gövde, çiçek, meyve ve yeşil aksam gibi kısımlarına tek tek bırakır. Yumurtalar krem renkli, basık, yuvarlak şekilli olup üzerinde uzunlamasına çizgiler bulunur. Yeşil kurdun asıl zararını larvalar oluşturur. I. ve II. dönem larvalar konukçu bitkinin yaprakları ile beslenirken, III. dönemden sonra larvalar konukçu bitkinin generatif organları ile de beslenir (Kaya ve Kovancı, 2000). Larvalar gelişme süreleri boyunca 5-6 dönem geçirmektedir. Yeşil kurt larvaları toprakta pupa olur. Pupalar önce sarımsı yeşil renkte olup, birkaç saat sonra parlak kızılımsı kahverengini alırlar (Öngören ve ark., 1977).

Yeşil kurdun polifag bir tür olması nedeni ile zararlı, çevre koşullarına bağlı olarak ülkemizde 4-5 döl vermektedir (Koçlu ve Karsavuran, 2000). Zararlının 1977 yılında İzmir'de 4 döl (Öngören ve ark., 1977), 1978 yılında Çukurova bölgesinde 3 döl, 1979 yılında ise 4 döl (Yabaş ve Özer, 1980), Hindistan'da 4 döl (Chaudhary ve Sharma,1983), Suriye'de 3 döl (Tahhan ve Hariri, 1984), Özbekistan'da 4 döl (Adaskevich ve Rashidov, 1989) verdiği tespit edilmiştir.

Öngören ve ark. (1977)'na göre, İzmir ve çevresinde ilk erginler Mayıs ayından itibaren ortaya çıkmaktadır. Yabaş ve Özer (1979)'e göre, Çukurova bölgesinde yeşil kurt erginlerinin 1978 yılında Mayıs ayı sonlarında görüldüğü, Eylül ve Ekim aylarında ergin popülasyonunun düşük oranda devam ettiği, 1979 yılında ise erginlerin Nisan ayı sonlarında görüldüğü ve son döl erginlerin Ekim ayının ortasında görüldüğü bildirilmiştir.

Yeşil kurt larvaları gelişme dönemleri boyunca domatesin yaprak, çiçek salkımı, sap, tomurcuk ve meyvede açtıkları deliklere girerek beslenir. Bu nedenle saprofit fungusların

etkisiyle meyvelerde çürümeye neden olur (Koçlu ve Karsavuran, 2000). Domateste meyve ve tohum bağlamada azalmalara neden olur ve ekonomik olarak verim kayıplarına yol açar. Lammers ve MacLeod (2007) tarafından bu zararlıyı kontrol altına almak için dünyada yıllık maliyetin verim kayıpları ile birlikte 5 milyar ABD dolarına ulaştığı bildirilmiştir. Hindistan ve Çin'de, pestisitlerin %50'sinin bu zararlıyı kontrol altına almada kullanıldığı, İspanya'da ise yeşil kurdun ticari amaçlı kullanılan domateslerde en önemli zararlılarından biri olduğu ifade edilmiştir (Arnó ve ark., 1999). Zararlının polifag olmasının yanı sıra, çeşitli habitatlarda yaşamını sürdürebilmesi, değişen çevre koşullarına kolay adapte olabilmesi, üreme gücünün yüksek olması zararlı ile her üretim sezonunda birçok kez mücadelenin yapılmasını gerekli kılmaktadır (Mironidis ve Savopoulou-Soultani, 2008).

Yeşil kurt ile mücadelede en fazla kullanılan yöntem kimyasal mücadeledir. Özellikle organofosfatlı (profenofos), spinosin grubundan (spinosad), karbamatlı (thiodicarb) ve pyridalyl insektisitleri gibi farklı kimyasal grupta bulunan insektisitlerin bu zararlı ile mücadelede etkin bir şekilde kullanılabileceği ifade edilmiştir (Konuş ve Karaağaç, 2014). Ülkemizde ve diğer birçok ülkede zararlıların başta piretroid vb. etkili maddelere ve farklı gruptan insektisitlere karşı geliştirdiği dayanıklılık, dayanıklılık oranları ve dayanıklılık mekanizmalarının belirlenmesi konularında çalışmalar bulunmaktadır (Daly, 1988; McCaffery, 1998; Uğurlu ve ark., 2007; Uğurlu ve Gürkan, 2007; Karaağaç ve Konuş, 2012).

Özellikle son yıllarda kimyasal ilaçların sürekli, bilinçsiz ve yoğun bir şekilde kullanılması zararlının direncinde artış meydana getirirken, aynı zamanda insan sağlığına olumsuz etkide bulunarak toksik zehirlenmelere de neden olmaktadır (Longnecker ve ark., 1997). Bununla birlikte günümüzde zararlının tarımsal ilaçlara karşı geliştirdiği dayanıklılık, ilaçların etkisinin düşmesine sebep olarak, tarımsal ürün desenini tehdit eden en önemli problem olarak karşımıza çıkmaktadır (Knight ve Norton, 1990). Bu yöntemlere alternatif olarak entegre mücadele kapsamında kültürel, biyolojik ve biyoteknik mücadele çalışmaları yaygın olarak kullanılmaktadır. Kültürel mücadele çalışmalarında yabancı ot temizliğinin yapılması, zararlı ile bulaşık meyvelerin uzaklaştırılması ve hasattan sonra derin sürüm yapılması en etkili yöntemlerden biridir. Zararlının doğal düşmanları arasında *Chrysoperla carnea* Stephens (Neuroptera:Chrysopidae), *Coccinella septempunctata* L. (Coleoptera:Coccinellidae) ve *Geocoris* spp. (Hemiptera:Lygaeidae) bulunmaktadır (Sathe ve Bhosale, 2001). Biyolojik mücadele konusunda yapılan çalışmalarda ise *Trichogramma chilonis* Ishii' in yumurta parazitoiti, *Campoletis chlorideae* Uchida, *Hyposoter didymator*

Thun., *Heteropelma scaposum* Morley ve *Netelia producta* Brullé' nın larva parazitoiti olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Romeis ve Shanower, 1996; Ahmad ve ark., 1998; You ve ark., 2002; Johns ve Whitehouse, 2004; Şimşek ve ark., 2015; War ve ark., 2016). Ayrıca Tobias (1995) ise *Chelonus oculator* Panzer' un yumurta-larva parazitoiti olarak kullanıldığını belirtmiştir.

Zararlılarla daha kapsamlı ve etkin bir şekilde mücadele yapılmasında zararlının biyolojik özelliklerinin ortaya konulması önemli bir etkendir. Özellikle ergin çıkış zamanı, çiftleşme ve yumurta bırakma zamanlarının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

Böceklerin laboratuvar şartlarında kitle üretiminin yapılması zararlıları ile mücadelede kolaylık sağlamaktadır. Bu sebeple kitle üretimi yapılmadan önce zararlının konukçusunda beslenme durumu bilinmeli ve konukçu bitkisi devamlı olarak sağlanmalıdır. Konukçu bitkinin üretimi zaman, yer, maliyet ve iş gücü gerektirmektedir. Bu sebeple, günümüzde böceklerin konukçusu olan bitkilere bağlı kalmadan devamlı olarak yetiştirilmesinde yapay besin ortamları büyük önem taşımaktadır (Knipling, 1979).

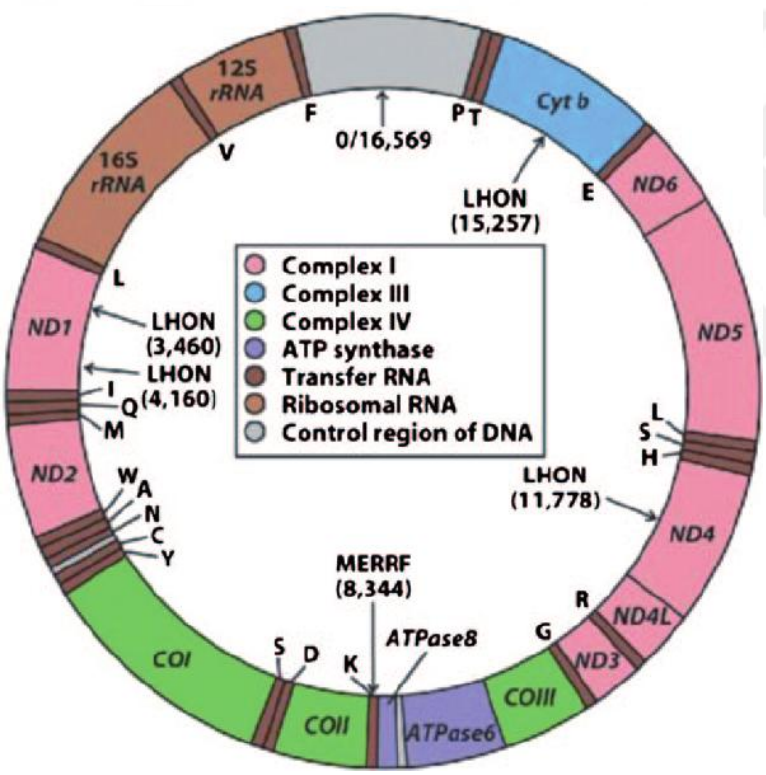
Böceklerin vücutlarında bulunan yağ, karbonhidrat, protein, vitamin ve mineral gibi yapısal moleküller böceklerin üreme ve gelişmesinde temel bir etkendir. Böceklerin besin ihtiyaçları diyapoz, yaş, göç ve fizyolojik stres gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir (Nation, 2015). Besin maddeleri arasında bulunan proteinler, böceklerde fizyolojik olayların gerçekleşmesinde rol oynamaktadır. Özellikle ergin dişilerin yumurta ve ovarilerinin olgunlaşmasında proteinlerin önemi büyüktür (Nation, 2015). Kelebeklerde yağ asitlerinin etkisi ergin dönemde daha fazla izlenmektedir. Yağ asitleri eksikliğinde kelebek kanatlarında şekil bozuklukları ve deformasyonlar meydana gelmektedir (Vanderzant, 1974). Karbonhidrat eksikliğinde ise böceklerde gelişmenin yavaşladığı ya da gelişmenin durduğu bildirilmiştir (Chapman, 1998). Vitaminlerin ise bazı böceklerde özellikle yumurta verimine etkisinin önemli olduğu ifade edilmiştir (McFarlern, 1992).

Günümüzde zararlıların moleküler yöntemler yardımıyla ayırt edilmesi ve genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde mitokondrial DNA temeline dayalı teknikler kullanılmaktadır. Mitokondrial DNA analizleri, zararlının benzer türlerle akrabalık derecesinin belirlenmesinde, popülasyon genetik yapısının tahmin edilmesinde, tür bazında filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde ve zararlının orijininin belirlenmesi gibi çalışmalarda etkin ve başarılı olarak kullanılan bir yöntemdir.

Mitokondrial DNA canlılarda maternal olarak kalıtsaldır ve nesilden nesile değişikliğe uğramadan aktarılmaktadır (Simon ve ark., 1994). Böcek mitokondrial DNA'sı (mtDNA) yaklaşık 14-18 kb büyüklüğünde olup, dairesel, çift sarmal ve toplamda 37 gen

bölgesinden meydana gelmiştir. Bu genler; 13 protein kodlayabilen gen (PCGs); alt birimleri olarak 6 ve 8 ATPaz (atp6 ve atp8), sitokrom C oksidaz alt birimleri 1-3 (COI-COIII), sitokrom B (cob), NADH dehidrojenaz alt birimleri 1-6 ve 4L (NAD1-6 ve NAD4L), 2 rRNA geni; küçük ve büyük alt birim olan rRNAs (rrnL ve rrnS), 22 tRNA geni ve transkripsiyon ve replikasyon için A+T'ce zengin başlama bölgelerini içermektedir (Boore, 1999) (Şekil 1.1).

Mitokondrial DNA'nın diğerlerine oranla boyutunun daha küçük ve basit yapıda olması, genlerin anne tarafından aktarılması, hemen hemen tüm hayvanlarda bulunması ve fazla sayıda kopyasının olması vb. (Behura, 2006) belirteç ya da markır olarak kullanılmasını moleküler çalışmalarda önemli kılmaktadır.



Şekil 1.1. Böcek mitokondriyal genomu (Jalali ve ark., 2015)

Böcek mitokondriyal genomunda yapılan çalışmalarda hedef organizmadan mtDNA izolasyonu yapılarak sitokrom oksidaz I (CO-I), sitokrom oksidaz II (CO-II), 16S, 12S rRNA, NADH5 dehidrojenaz, NADH4 dehidrojenaz ve tRNA gibi gen bölgeleri hedef alınarak karakterizasyon çalışmaları yapılmaktadır.

Mitokondrial DNA'nın COI bölgesi, böcek mitokondrial genomunun en çok çalışılan bölgesinden biridir. COI bölgesi terminal katalizördür ve üç sitokrom oksidaz alt biriminin

en büyüğüdür (Lunt ve ark., 1996). Özellikle COI ve COII bölgesi böceklerin popülasyon genetiği çalışmalarında başarıyla ve yaygın olarak kullanılmaktadır (Brower, 1994; Caterino ve ark., 2001).

Çalışmanın amacı, domates ekim alanlarında yapılan sörveylerle elde edilen yeşil kurdun domates üzerinde laboratuvar kolonisinin oluşturulması, laboratuvar adaptasyonunun sağlanması ve biyolojik özelliklerinin belirlenmesi, yıl boyu konukçusuna bağlı kalmadan yapay diyet üzerinde beslenebilen laboratuvar kolonisinin oluşturularak yapay diyette biyolojik özelliklerinin belirlenmesi, yeşil kurdun domates ve yapay diyet üzerinde beslenen bireylerin toplam protein tayinlerinin yapılması ve özellikle Çanakkale ve çevresindeki domates üretim alanlarından elde edilen yeşil kurt popülasyonlarının genetik çeşitliliğinin belirlenmesidir.

BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Yeşil Kurt (*Helicoverpa armigera*)'un Biyolojisi Üzerine Yapılan Bazı Çalışmalar

Kaya ve Kovancı (2000), yeşil kurdun doğal koşullarda ve laboratuvarda biyolojisini araştırmak üzere yaptıkları çalışmada, yeşil kurdun Bursa'da yılda 4 döl verdiği ve kışı ortalama 7,08±1,53 cm derinlikte toprakta pupa döneminde diyapoz halinde geçirdiğini belirlemiştir. Ergin çıkışlarının Mayıs ayında başladığı ve doğada bir dişinin ortalama 954,70±403,52 adet yumurta bıraktığı ve yumurta açılma oranının %58 olduğu ifade edilmiştir. Laboratuvar koşullarında ise bir dişinin 678,50±492,53 adet yumurta bırakarak, yumurta açılma oranı %57 olarak hesaplanmıştır. Yeşil kurdun larva gelişiminin bir dölünü 36,08 günde tamamladığı belirtilmiştir. Erginlerin eşey oranı 1:1.08 olarak belirtilmiştir.

Nasreen ve Mustafa (2000) tarafından yapılan çalışma, yeşil kurdun laboratuvar şartlarında çeşitli biyolojik dönemlerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Laboratuvarda elde ettikleri pupaları cinsiyetlerine göre ayırarak 30 X 15 cm'lik şeffaf plastik kavanozlara yerleştirmişlerdir. Kavanozda hava sirkülasyonunu sağlamak için, kavanozun kenarlarını ve kapaklarını delmişlerdir. Dişilerin iki farklı sıvı besin ortamında yumurta bırakma oranı üzerinde etkinliğinin tespit edilmesinde, kavanozların içerisine %10 ballı su karışımı ve sadece su içeren ergin beslenme ortamları kullanmışlardır. Denemeyi 40 adet yeşil kurt larva ve pupası kullanarak yürütmüşlerdir. Çalışma sonucunda, larva gelişme süresini ortalama 17,32±0,32 gün, pre-pupa süresini 2,1±0,1 gün, erkek pupa ve dişi pupa süresinin ise sırasıyla 15,4±0,5 gün ve 13,2±0,4 gün sürdüğünü ifade etmişlerdir. Larva dönemlerinin gelişme sürelerinin I. larva döneminde 2,07±0,08 günde, II. larva döneminde 2,15±0,11 günde, III. larva döneminde 2,47±0,16 günde, IV. larva döneminde 3,12±0,16 günde, V. larva döneminde 3,55±0,16 günde ve VI. larva döneminde ise 3,95±0,17 günde tamamladığını kaydetmişlerdir. Larva dönemlerine ait larva boyu ortalamasını sırasıyla, I. larva döneminde 3,40±0,22 mm, II. larva döneminde 4,60±0,34 mm, III. larva döneminde 9,65±0,74 mm, IV. larva döneminde 17,00±0,71 mm, V. larva döneminde 28,35±0,69 mm ve VI. larva döneminde ise 36,85±0,75 mm olarak hesaplamışlardır. Farklı sıvı besin ortamı ile beslenen erginlerin bıraktığı yumurta sayısını, %10 ballı su karışımı ile beslenen bir dişide ortalama 795,02 adet, su ile beslenen dişide 248,55 adet ve hiçbir besinle beslenmeyen dişide ise 7,37 adet yumurta olarak belirlemişlerdir.

Kakimoto ve ark. (2003) çalışmalarında *H. armigera*'nın çeşitli konukçu bitki arasındaki yumurta bırakma tercihi, larva performansı ve farklı dönem larvalar arasındaki kannibalizm frekanslarını araştırmışlardır. Çalışmada konukçu bitki olarak bamya, pamuk kozası, krizantem çiçeği, soya tohumu, küçük domates ve yeşil biber kullanmışlardır. Larva yoğunluğunun kannibalizm üzerindeki etkisinin test edilmesinde 2, 5, 10 ve 20 adet larva kullanmışlardır. Denemeyi 30 birey ile yürütmüşlerdir. Çalışma sonucunda, dişilerin yumurtalarını %58,1 oranla en çok bamyaya bıraktıkları bildirilmiştir. Larva gelişme süresini 13,0±0,9 gün ile en kısa bamyada, 20,7±2,0 gün ile en uzun yeşil biberde olduğunu belirlemişlerdir. Bamyanın %90 oran ile en yüksek pupa olma yüzdesine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Farklı konukçular üzerinde beslenen pupaların ağırlıklarını sırasıyla bamyada 340,2±15,3 mg, pamuk kozasında 336,6±13,4 mg, krizantem çiçeğinde 314,9±20,6 mg, soya tohumunda 300,4±22,7 mg, küçük domateste 292,6±25,7 mg ve yeşil biberde ise 267,4±27,2 mg olarak ölçmüşlerdir. Kannibalizm oranı bakımından larva yoğunluğu karşılaştırıldığında ise, larva sayısının artmasıyla pupa olma oranı ve pupa ağırlığında azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Liu ve ark. (2004), yaptıkları çalışmada laboratuvarda 27˚C sıcaklık ve 14:10 saat fotoperiyotta *H. armigera*'nın altı farklı konukçuda larva ağırlığı, gelişme süresi ve yumurta bırakma oranlarını test etmişlerdir. Çalışmada konukçu olarak pamuk, mısır, domates, biber, tütün ve fasulye kullanmışlardır. Yeşil kurt larvalarını Çin'in Hunan bölgesinden toplamışlar ve laboratuvarda yapay diyet (Wu ve Gong, 1997) üzerinde yetiştirmişlerdir. Larvaları III. döneme kadar aynı yerde, III. dönemden sonra kannibalizm özelliklerinden dolayı kaplarda tek tek yetiştirmişlerdir. Denemeler sonucunda, domates ve biberde larvaların ölüm oranının diğer konukçularına göre daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Larva gelişme süresini mısırda 26,6 gün ve domateste 35,1 gün olarak tespit etmişlerdir. Dördüncü dönem larva ağırlığını mısırda 22,8 mg ve tütünde 5,9 mg, son dönem larva ağırlığını ise pamukta 176,7 mg ve domateste 132,5 mg olarak elde etmişlerdir. Mısırda 285,2 mg ve domateste 167,1 mg pupa ağırlığı elde etmişlerdir. Yumurta döneminden pupa dönemine kadar canlı kalma oranları pamukta %33,1 ve biberde %1,7 tespit etmişlerdir. Bir dişinin bıraktığı yumurta sayısının ortalama 708,4 adet, mısırda 784,8 adet, fasülyede 778,1 adet, domateste 559,1 adet, biberde 562,5 ve tütünde ise 314,3 adet olarak belirtilmiştir. Sonuç olarak, *H. armigera*'nın yaşam döngüsünün domates ve biberde düşük oranlarda olmasına rağmen, test edilen tüm altı konukçuda da tamamladığını ifade etmişlerdir.

Mironidis ve Savopoulou-Soultani (2008), laboratuvar koşulları altında 12.5, 15, 17.5, 20, 25, 27.5, 30, 32.5, 35, 37.5 ve 40˚C'de 11 farklı sabit sıcaklığın ve beş alternatif sıcaklığın (25-10, 30-15, 32.5-17.5, 35-20 ve 35-27.5˚C) *H. armigera*'nın ergin ömrü, yumurta bırakma oranı ve gelişme süresi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Sonuç olarak, 17.5-32.5˚C sıcaklık aralığı dışında yetiştirilen *H. armigera*'nın yumurta döneminden ergin çıkışına kadar olan döneminde gelişme göstermediği bildirilmiştir. Ortalama ergin ömrünün 15˚C'de 34,4 gün ve 35˚C'de 7,6 olduğu ifade edilmiştir. Dişilerde en uygun yumurta bırakma sıcaklığının 25˚C olduğu kaydedilmiştir. Çok yüksek sıcaklıkların *H. armigera*'nın biyolojik parametreleri üzerinde olumsuz etki yarattığını belirtmişlerdir.

Patel ve ark. (2011) laboratuvarda *H. armigera*'yı gül üzerinde yetiştirerek biyolojisi üzerine araştırma gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada ergin dişilerin yumurtalarını yapraklara ve sürgünlere tek tek bıraktıklarını gözlemlemişlerdir. Yumurtalarının enini 0,54±0,02 mm ve boyunu 0,49±0,04 mm olduğunu belirtmişlerdir. Larvaların 6 larva dönemi geçirdiği ve toplam larva gelişme süresini 24,16±2,25 günde tamamladığını belirlemişlerdir. Yumurta, pre-pupa ve pupa gelişim dönemlerini sırasıyla 3,72 gün, 2,28 gün, 10,44 gün olarak tespit etmişlerdir. Bir dişinin 290-910 adet yumurta bıraktığını ve bu yumurtaların %83,67'sinin açıldığını belirlemişlerdir. Ergin ömür uzunluğunu dişilerde ortalama 8,84 (5-11) gün ve erkeklerde ortalama 5.40 (4-8) gün olduğunu belirlemişlerdir.

Kouhi ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada laboratuvar koşullarında SUN 6108 f1, Rio grande UG, Korral, Super strain B, CH falat, Hed rio grande, Cal.JN3 ve Super crystal olarak adlandırılan sekiz farklı domates çeşidi üzerinde yetiştirilen *H. armigera*'nın larva dönemleri ve beslenme performansını araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, tüm larva dönemlerine göre alınan ve sindirimi yapılan dönüşüm değerinin en yüksek Hed rio grande çeşidinde, en düşük ise Rio grande UG çeşidinde olduğu tespit edilmiştir. Beslenme indeks sonuçlarına göre de Rio grande UG çeşidinin *H. armigera* için ideal konukçu olmadığı belirtilmiştir.

Rabari ve ark. (2017a) çalışmalarında nohut, domates ve kabak kullanarak *H. armigera*'nın laboratuvar koşullarında biyolojisini araştırmışlardır. Denemeleri 20,73±2,55˚C sıcaklık, %65,77±7,65 oransal nemde 30 birey ile yürütmüşlerdir. Toplam larva gelişme süresini nohutta 22,97 (20-26) gün, domateste 25,53 (23-29) gün, kabakta 27,10 (25-31) gün arasında, pre-pupa süresini ortalama nohutta 1,93 (1-3) gün, domateste 2,20 (2-3) gün, kabakta 2,27 (2-3) gün tespit etmişlerdir. Dişi ve erkek ergin ömrünü en uzun nohutta, ardından domates ve en son ise kabakta belirlemişlerdir. Bir dişinin bıraktığı yumurta sayısını sırasıyla; nohutta 229,10 adet, domateste 203,50 adet ve kabakta 191,70

olarak tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, laboratuvarda *H. armigera*'nın yetiştirilmesinde en uygun konukçunun nohut olduğu bildirilmiştir.

Rabari ve ark. (2017b) yaptıkları çalışmada *H. armigera*'nın pre Rabi (Ekim ayının ilk ve Kasım ayının son haftası arası), Rabi (Aralık ayının ilk ve Şubat ayının ikinci haftası arası) ve post Rabi (Mart ayının ilk ve Nisan ayının son haftası arası) dönemlerindeki biyolojisini araştırmışlardır. Çalışmayı 2013 ve 2014 yılları arasında laboratuvarda pre Rabi döneminde 25,40±2,95˚C sıcaklık ve %59,10±7,30 bağıl nemde, Rabi döneminde 20,73±2,55˚C sıcaklık ve %65,77±7,65 bağıl nemde, post Rabi döneminde ise 27,57±3,48˚C sıcaklık ve %53,00±6,46 bağıl nemde gerçekleştirmişlerdir. Sonuç olarak, post Rabi döneminde larva gelişme süresi (23,97 gün) ve pre-pupa gelişme süresinin (2,10 gün) diğer dönemlere göre daha kısa olduğu belirlenmiştir. Bu dönemde ergin ömrünü dişilerde 9,80 (7-11) gün, erkeklerde 5,80 (5-7) gün olarak gözlemlemişlerdir. Bu verilere göre *H. armigera*'nın yetiştirilmesinde en uygun dönemin post Rabi dönemi olduğunu bildirmişlerdir.

2.2. Yeşil Kurt (*Helicoverpa armigera*)'un Yapay Diyet Üzerine Beslenme İle İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar

Casimero ve ark. (2000) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *H. armigera*'nın yedi farklı doğal konukçu ile bir yapay diyet üzerinde larva canlılık oranı, larva gelişme süresi, larva dönemi ve pupa ağırlığı gibi bazı biyolojik gelişme parametreleri araştırılmıştır. Denemede doğal konukçu olarak pamuk kozası, pamuk yaprakları, bamya, soya, domates meyvesi, domates yaprakları, mısırla birlikte ticari olarak formüle edilmiş Insecta LF yapay diyetini kullanmışlardır. Sonuç olarak, larva gelişme süresinin pamuk kozasında 11,40 gün, pamuk yapraklarında 22,75 gün, bamyada 13,19 gün, soyada 14,50 gün, domates meyvesinde 15,04 gün, domates yapraklarında 18,48 gün, mısırda 12,52 gün ve yapay diyette ise 12,75 gün sürdüğünü bildirmişlerdir. Pupa ağırlığını sırasıyla en yüksek yapay diyette (324,67 mg), soyada (299,71 mg), pamuk kozasında (287,60 mg), domates meyvesinde (277,93 mg), bamyada (248,42 mg), pamuk yapraklarında (246,31 mg) ve en son ise domates yapraklarında (193,24 mg) tespit etmişlerdir. Birinci dönem larvaların ise canlılık oranının en fazla bamya ve yapay diyette olduğunu belirtmişlerdir.

Kaya (2000) yaptığı çalışmada, *H. armigera*'nın yumurta verimi, cinsiyet oranı ve ömrü üzerindeki etkisini araştırmıştır. Bunun için çalışmada nohut, domates, tütün ve yapay diyetten oluşan dört farklı besin kullanmıştır. Yapay diyetin içeriğini kuru fasulye unu, kuru bira mayası, askorbik asit, mısır unu, havuç unu, agar, nipagin ve saf su

kullanarak hazırlamıştır. Çalışmanın sonucunda, yapay besinle beslenen dişi bireylerin bıraktığı yumurta sayısının diğer besinlere göre daha fazla olduğunu belirlemiştir. Tütünle beslenen dişi bireylerin ise bıraktığı yumurta sayısı en az olmuştur. Ergin ve dişi ömrünün en uzun yapay besinde, en kısa ise nohutta beslenen bireylerde olduğunu saptamıştır. Cinsiyet oranını ise 1.0:1.0 (dişi:erkek) olarak tespit etmiştir.

Blanco ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada, Shaver ve Raulston (1971) tarafından geliştirilen Noctuidae familyasına ait besinin içinde bulunan protein oranının düşürülmesinde *Heliothis virescens* üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Bileşenlerinde Nutrisoy (soya unu) ve buğday tohumu olan beş farklı besin hazırlamışlardır. Denemede 300 adet yumurtadan yeni açılan birinci dönem larvaları teker teker beslemişlerdir. P_o, F_1 ve F_2 dölleri için larva gelişme süresi, pupa olma oranı ve ergin çıkışı parametrelerini belirlemişlerdir. Çalışmada soya unu ve buğday tohumuna ek olarak; agar, sorbik asit, Wesson's tuzu, nipagin, aereomycin, agar, şeker, vitamin karışımları ve saf su malzemelerini kullanarak yapay diyeti değiştirerek hazırlamışlardır. Elde edilen verilere göre, içeriğinde buğday tohumu bulunan besinde *Heliothis virescens* bireylerinin beslenmediği bildirilmiştir. Larvaların pupa olma oranı %1,3 olarak hesaplanmıştır. Çalışma sonucunda, besin içeriğindeki protein oranının %5 altına düşmesinin böceklerde gelişmelerinde olumsuz etki yaptığını bildirmişlerdir.

Amer ve El-Sayed (2014), çalışmalarında *H. armigera* larvalarını pamuk, bamya, mısır, hint yağı bitkisi, bezelye, fasulye ve yapay diyet üzerinde yetiştirerek larva ve pupa gelişme süresi, pupa ağırlığı, ergin dönemine ait ömür uzunluğu ve ovipozisyon süresi parametrelerini belirlemiştir. Deneme laboratuvarda 26˚C sıcaklık ve 14:10 fotoperiyotta yürütülmüştür. Çalışmada her bir konukçu ve yapay diyetin etkinliğinin test edilmesinde 100 adet yumurtadan yeni çıkan larvayı 3 tekerrürlü olarak yetiştirmişlerdir. Yapay diyetin hazırlanmasında 250 g haşlanmış ve ardından kurutulmuş barbunya unu, 2,25 g sorbik asit, 2,25 g nipagin, 1 g sorbik asit, 25 g Brewer's mayası, 10 g agar, 2,5 ml formaldehit ve 500 ml su kullanmışlardır. Deneme sonuçlarına göre, larva gelişme süresini en kısa bezelye (16 gün) ve yapay diyette (16,50 gün) en uzun ise pamuk (23 gün) ve bamyada (22 gün) tespit etmişlerdir. Larva ve pupa ölüm oranının en fazla mısır ve pamukta olduğu bildirilmiştir. Bezelye ve yapay diyette beslenen pupa ağırlıklarının diğer konukçularına göre daha fazla olduğunu ifade etmişlerdir. Yapay diyet (%92,73) ve bezelyede (%90,57) beslenenlerde yüksek ergin çıkış oranı görülmüştür.

Krishnareddy ve Hanur (2015) yaptıkları çalışmada, nohut yapay diyetindeki Protein-X etkinliğinin *H. armigera*'nın yumurta sayısı üzerindeki etkisini araştırmışlardır.

Arazide domates, nohut ve bezelye üzerinden topladıkları larvaları laboratuvara getirerek yapay diyette yetiştirmişlerdir. Denemeleri laboratuvarda 25±2˚C sıcaklıkta, %65±5 oransal nemde larvaları her bir petriye teker teker yerleştirerek 5 tekerrürde yürütmüşlerdir. Yapay diyetin içeriğini 100 g nohut, 30 g maya, 25 g sükroz, 5 g Wessons's tuzu, 5 g nipagin, 10 g askorbik asit, 6 g sorbik asit, 100 mg spreptomisin, 10 ml kolin klorit (%5), 2 ml formaldehit, 2 g Protein-X ve 1000 ml saf su kullanarak hazırlamışlardır. Çalışma sonucunda, Protein-X diyeti ile beslenen dişilerin yumurta bırakma oranında %9,6'lık bir artış gözlemlemişlerdir.

Gomes ve ark. (2017) tarafından Brezilya'da gerçekleştirilen çalışmada, *H. armigera*'nın pamuk, soya, mısır, buğday ve yapay diyet (Greene ve ark., 1976) üzerinde beslenme biyolojisini araştırmışlardır. Yapay diyet üzerindeki larvaları kontrol olarak yetiştirmişlerdir. Denemeleri laboratuvarda kontrollü koşullarda 25 ± 1 ˚C sıcaklık, % 70 oransal nem ve 14 saat fotoperiyotta gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada 170 adet I. dönem larvaları içinde konukçu bitkilerin yaprakları ve generatif organları bulunan petri kaplarında (60X15cm) bireysel olarak yetiştirmişlerdir. Petri kapları içinde bulunan yaprakların kurumasını önlemek için, petri kaplarının altına nemlendirilmiş beyaz kurutma kağıtları koymuşlardır. Yeşil kurt bireylerini pupa olana kadar petri kaplarında yetiştirmişlerdir Ardından aynı gün yaşta olan 10 ♀ ve 10 ♂ pupayı plastik kaplara yerleştirmişlerdir. Açılan erginleri etrafı tül ile kaplı PVC'den yapılmış ergin yetiştirme kafeslerinde yetiştirmişlerdir. Erginlerin beslenmesi için kafese %10'luk ballı su solüsyonu ilave edilmiştir. Denemeyi 17 tekerrür ile kurmuşlardır. Sonuç olarak, test edilen farklı konukçu tipleri arasında yeşil kurdun yumurta bırakma oranı ile birlikte gelişme dönemi üzerinde önemli etkilerin olduğunu belirtmişlerdir. Mısır ve buğdayda yetiştirilen larvalarda yüksek oranda larva ve pupa ölümleri gözlemlemişlerdir. Pamuk ve soya üzerinde yetiştirilen larvaların test edilen diğer konukçularına göre gelişme döneminde daha yüksek canlılık oranına ve ergin dişilerin yüksek yaşama oranına sahip olduklarını ifade etmişlerdir.

Nunes ve ark. (2017) çalışmalarında, farklı diyetler kullanarak laboratuvarda *H. armigera*'nın biyolojik gelişme parametrelerini incelemişlerdir. Larvaları üç farklı diyette yetiştirmişlerdir. İlk diyetteki besin içeriğinde buğday ruşeymi (60 g), soya proteini (30 g), kazein (30 g), Brewer's mayası (37,5 g), agar (22,5 g), askorbik asit (3,96 g), sorbik asit (1,98 g), tetrasiklin (124 g), nipagin (3,3 mg), distile su (1200 ml) ve vitamin kompleksine (9,9 ml) ek olarak fasulye unu (75 g) ilave etmişlerdir. İkinci diyette aynı besin malzemelerini kullanarak fasulye unu yerine nohut unu (75 g) eklemişlerdir. Üçüncü doğal

konukçuda ise sadece yeşil fasulye kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda, larva gelişme süresini 11,67 gün ile en kısa nohut içerikli yapay diyette, 14,54 gün ile en uzun yeşil fasulyede belirlemişlerdir. Larva ve pupa canlılığının diğer besinle beslenen larvalara göre daha yüksek oranda olduğunu saptamışlardır. Elde edilen verilere göre, kısa generasyon süresine sahip olması nedeniyle nohut unu bazlı yapay diyetin laboratuvarda yetiştirilmesinde uygun bir diyet olduğu ifade edilmiştir.

2.3. Yeşil Kurt (*Helicoverpa armigera*)'un Genetik Çeşitliliği Üzerine Yapılan Bazı Çalışmalar

Folmer ve ark. (1994) yaptıkları çalışmada, 11 omurgasız şubede COI geninin 710 bp'lik fragmentinin PCR amplifikasyonu için evrensel DNA primeri geliştirmişlerdir. Genomik DNA izolasyonunu CTAB yöntemi kullanarak gerçekleştirmişlerdir. LCO1490 ve HCO2198 primerleri kullanarak 50 µl'lik toplam hacimde PCR yapmışlardır. Elde ettikleri PCR ürünlerini %2'lik agaroz jelde görüntülemişlerdir. Sonuç olarak, LCO1490 ve HCO2198 evrensel primerlerinin 11 şubede 80'den fazla omurgasız türünde başarılı bir şekilde amplife edildiğini, bu primerlerin türler arasında ve taksonomik sınıflandırmalarda filogenetik analizlerin yapılmasında yardımcı olacağını bildirmişlerdir.

Zhou ve ark. (2000) doğu Akdeniz'deki *H. armigera* popülasyonlarının genetik çeşitliliğini araştırmışlardır. Ergin bireylerin örneklemesi 5 lokasyon İsrail ve 1 lokasyon Türkiye'den alınarak yapılmıştır. Örneklerin genetik ilişkileri RAPD-PCR kullanılarak analiz edilmiştir. Popülasyon yapısının belirlenmesinde üç adet 10-oligonükleotid primer kullanılmıştır ve sonuç olarak 84 polimorfik lokus tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda, İsrail ve Türkiye popülasyonları arasında genetik uzaklığın düşük olduğu belirlenmiştir.

Hebert ve ark. (2004) kuzeybatı Kosta Rika'daki *Astraptes fulgerator*'un müze örneklerinin DNA barkodu ile morfolojik çalışmalarını birleştirerek *A. fulgerator*'un moleküler karakterizasyonunu yapmışlardır. Çalışmalarında DNA barkodu için 484 ergin kelebek kullanmışlardır. Genomik DNA izolasyonunu GenElute genomik DNA kiti ile yapmışlardır. Lepidoptera takımı için geliştirilen LEP-F1 ve LEP-R1 primerlerini kullanarak, 50 µl'lik toplam hacim ile PCR işlemini gerçekleştirmişlerdir. PCR ürünlerini %1'lik agaroz jelde görüntülemişlerdir. Elde edilen PCR ürünlerini saflaştırarak forward primer ile birlikte sekans analizine göndermişlerdir. Çalışma sonucunda, *Astraptes fulgerator*'un en az 10 türünün simpatrik tür olduğunu belirlemişlerdir.

Ming ve Wang (2006), AFLP analizi ile iki yakın tür olan *H. armigera* ve *H. assulta* 'nın türler arası genetik çeşitlilik ve tür içi genetik varyasyonun elde edilmesini

hedeflemişlerdir. Çalışmada örnekleri Çin'den toplamışlardır. Genomik DNA izolasyonu erginlerin baş ve thoraks kısmı kullanılarak yapılmıştır. AFLP analizleri dokuz primer çifti kullanılarak test edilmiştir. Sonuç olarak, amplife edilen AFLP markırları arasında %39,6'sının *H. armigera* 'ya spesifik, %30,7'sinin *H. assulta* 'ya spesifik ve %29,7'sinin her iki türün ortak bandı olduğunu belirlemişlerdir. Dokuz primer kombinasyonu arasında *H. armigera* 'ya spesifik ortalama bant sayısının *H. assulta* 'ya göre daha fazla olduğunu ifade etmişlerdir. Çalışma sonucunda birbirine iki yakın türün primerlerinin her biri için oluşturulan AFLP bant desenleri ile kolayca ayırt edilebildiğini belirlemişlerdir.

Tay ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada, ribozomal protein (Rp) ve Dopa Dekarboksilaz (DDC) genleri ile birlikte polimorfizm gösteren allelleri baz alarak *H. armigera* için exon-primed intron-crossing (EPIC) nükleer DNA markırı geliştirmişlerdir. Çalışmada gDNA ve cDNA'nın intron/ekson bölgelerini NCBI'da model organizma olarak *Drosophila*'yı seçerek belirlemişlerdir. EPIC primer dizaynı için *B. mori*'nin yaklaşık 80-350 baz çifti uzunluğundaki intronlarını seçmişlerdir. Primerleri gradient PCR ile test etmişlerdir. Avustralya ve Çin'den örnekleme yapılan yeşil kurt bireylerini %6 PAGE üzerinde intron polimorfizmini saptamak için görüntülemişlerdir. Sonuç olarak, beş EPIC PCR markırın *H. armigera* için, aynı zamanda da *H. assulta, H. punctigera* ve *H. zea'*nın moleküler teşhisinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Chen ve ark. (2011) *H. armigera* 'ya spesifik nükleer DNA markırı kullanarak *H. armigera* ve *H. assulta* arasındaki ayrımın yapılmasında PCR metodunu kullanmışlardır. Çalışmada 65 *H. armigera* ve 123 *H. assulta* larvasını konukçusu olan tütün, biber ve domates alanlarından toplamışlardır. Bununla birlikte, çalışmada *Helicoverpa punctigera, Ostrinia furnacalis, Spodoptera exigua* ve *Argyrogramma agnata* türlerini de teste tabi tutmuşlardır. Fenol-kloroform yöntemine dayalı ergin örneklerden gDNA izole ederek PCR yapmışlardır. Daha sonra PCR ürünleri 16S rRNA bölgesi (557 bp) için *Ase*I ve *Mse*I, COI bölgesi (511 bp) için *BstZ*717I ve Cyt b bölgesi (434 bp) için *Hph*I restriksiyon enzimleri kullanılarak kesimleri gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, çalışmada kullanılan HarSSR3 lokusu ile *H. armigera* 'nın diğer türlerinden ayırt edildiğini göstermişlerdir.

Li ve ark. (2011) yaptıkları bu çalışmada, mitokondriyal DNA COI gen bölgesini kullanarak larva döneminde morfolojik olarak benzerlik gösteren iki tür olan *H. armigera* ve *H. assulta* 'yı birbirinden ayırt etmişlerdir. Çin'den *H. assulta, H. armigera* ve *M. brassicae* örneklerini toplamışlardır. Toplanılan larvaları DNA ekstraksiyonu için saf ethanol içinde -20˚C'de bekletmişlerdir. DNA ekstraksiyonunda olası kontaminasyonu önlemek için kanat ile abdomeni uzaklaştırarak ekstarksiyon baş, thoraks ve bacaklardan

yapılmıştır. COIF ve COIR primerleri (Hebert ve ark., 2004) kullanarak 50 µl'lik toplam hacimde PCR yapmışlardır. Elde edilen PCR ürünlerini saflaştırarak sekans analizine göndermişlerdir. Sonuç olarak, *M. brassicae* 'den 4 haplotip, *H. armigera* 'dan 16 haplotip ve *H. assulta* 'dan 3 haplotip olmak üzere toplamda 23 haplotip tespit etmişlerdir.

Albernaz ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada, mitokondriyal DNA markırlarını (COI, COII ve NAD6) kullanarak Brezilya'daki önemli pamuk ve soya üretim alanlarından toplanan *H. virescens'*in popülasyon içi ve popülasyonlar arası genetik çeşitliliğini belirlemişlerdir. Çalışmada 11 farklı lokasyondan *H. virescens* örneklerini toplamışlar ve laboratuvarda ergin dönemine kadar yetiştirmişlerdir. Erginlerin thoraks kısmından DNA izolasyonu yapılmıştır. Ardından 25 µl toplam hacim ile PCR işlemini gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen PCR ürünlerini saflaştırarak sekans analizine göndermişlerdir. mtDNA bölgesinin genetik çeşitliliği Mega v.5 ve DnaSP v.5 programlarını kullanarak hesaplanmıştır. Haplotip sayısı, haplotip çeşitliliği ve nükleotid çeşitliliği gibi parametreleri belirlenmiştir. AMOVA analizini kullanarak, *H. virescens* popülasyonları arasındaki genetik yapıyı tespit etmişlerdir. Elde edilen verilere göre, minimum spanning network analizi ile toplamda 35 haplotip belirlenmiştir. Çalışma sonucunda ise, Brezilya'daki popülasyonlar arasında haplotip çeşitliliğinin yüksek ve nükleotid çeşitliliğinin ise düşük olduğu tespit edilerek, pamuk ve soya üretim alanlarından örnekleme yapılan popülasyonlar arasında önemli bir genetik çeşitliliğin olmadığını bildirmişlerdir.

Asokan ve ark. (2012) mtDNA COI gen bölgesini *H. armigera* 'nın moleküler çeşitliliğini ve bunların filogenetik ilişkisini araştırmışlardır. Qiagen kiti kullanarak genomik DNA'yı izole etmişler ve ardından elde edilen DNA'dan PCR ile hedef gen bölgesini çoğaltmışlardır. PCR için LCO-52 ve HCO-52 universal barkod primerlerini kullanmışlardır. Elde ettikleri 658 bp'lik PCR ürününü %1'lik agaroz jelde yürütmüşler ve UVP jel görüntüleme sistemi altında fotoğraflamışlardır. Hindistan popülasyonlarının COI nükleotid dizileri ile birlikte NCBI-GenBank'ta mevcut olan dizileri filogenetik analizlerde kullanılmıştır. Popülasyonlar arası filogenetik ilişkilerin gösterilmesinde MEGA 4.0 programının Minimum Evolution (ME) modülünden yararlanmışlardır. Sonuç olarak, çeşitli konukçudan ve coğrafi lokasyonlardan toplanan *H. armigera* 'nın COI bölgesinde önemli varyasyonların bulunmadığını ifade etmişlerdir.

Yenagi ve ark. (2012) çalışmalarında Hindistan'ın Kuzey Karnataka bölgesinde farklı coğrafi alanlardan elde ettikleri *H. armigera* popülasyonları arasındaki genetik çeşitliliğini RAPD markırları kullanarak test etmişlerdir. Çalışma sonucunda, seçilen 19

RAPD primerinden toplamda 58 PCR amplikonu elde etmişler ve bunun 26'sının polimorfik olduğunu saptamışlardır. Primer başına ortalama 6,44 PCR ürünü tespit etmişlerdir. Popülasyonlar arası genetik ilişkileri ise NTYSS PC2 paket programı kullanarak hesaplamışlardır. Popülasyonların genetik benzerliklerinin 0.84 ile 0.00 arasında yer aldığı belirtilmiştir.

Arnemann ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada Güney Amerika'da yer alan Paraguay ve Uruguay'da *H. armigera* 'nın mtDNA COI gen bölgesini kullanarak moleküler karakterizasyonunu yapmışlardır. *H. armigera* ergin güvelerini delta tuzağı yardımı ile 2014 ve 2015 yılları arasında Uruguay ve Paraguay'daki soya üretim alanlarından toplamışlardır. Toplam gDNA izolasyonunu Qiagen kiti kullanarak yapmışlardır. 707 bp'lik COI fragmenti PCR ile elde edilmiştir. PCR amplikonlarını pürifikasyon kiti ile pürifiye etmişler ve ardından örnekler dizi analizine gönderilmiştir. MEGA 6 paket programında yer alan maksimum likelihood modelinin seçilerek haplotipler arasındaki genetik çeşitliliği belirlemişlerdir. Haplotip ve nükleotid çeşitliliğini DnaSP v.5 programını kullanarak hesaplamışlardır. Çalışmanın sonucunda, Brezilya, Uruguay ve Paraguay'da *H. armigera* popülasyonlarını paylaşan ortak haplotipler belirlemişlerdir. Düşük haplotip ve nükleotid çeşitliliği Uruguay'daki popülasyonlarda tespit edilmiştir. Aynı zamanda, Paraguay ve Uruguay popülasyonları arasında yeni mtDNA COI haplotipleri belirlemişlerdir. Filogenetik analiz sonucuna göre, Maksimum likelihood ağacına *H. zea* ve *H. punctigera* haplotiplerinin de dahil edilmesi ile Paraguay ve Uruguay'daki *H. armigera* popülasyonlarının %97,4 bağlanma ile aynı dal üzerinde kümelendiğini ifade etmişlerdir.

Venkatesan ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada, EST (Expressed Sequence Tags) kaynaklarının tespit edilerek güney ve batı Hindistan'daki *H. armigera* popülasyonları arasında gen akışının belirlenmesinde DNA markırlarının potansiyeli araştırılmıştır. Çalışmada Hindistan'ın 20 farklı lokasyonundan *H. armigera* larvaları toplanmış ve bu larvalar yapay diyette yetiştirilmiştir. Diyetlerden elde edilen pupalar %0,1'lik sodyum hipoklorit solüsyonu ile sterilize edilerek ergin çıkışı beklenmiştir. Erginler DNA izolasyonunda kullanılmak üzere -20˚C'de %95'lik ethanolde muhafaza edilmiştir. Erginlerin DNA izolasyonunda Qiagen kiti kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda, türe özgü allellerin ortalama frekansının %11 ve F_{st} değerinin ise 0,17 olduğu tespit edilmiştir. Genetik çeşitlilik analizinde 30 polimorfik mikrosatellit belirlenerek güney ve batı Hindistan'daki *H. armigera* popülasyonları içinde geniş bir genetik farklılık olduğu ifade edilmiştir.

BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmanın ana materyalini Çanakkale ili ve çevresindeki domates üretim alanlarından elde edilen yeşil kurdun (*Helicoverpa armigera* Hübner) farklı biyolojik dönemleri (Şekil 3.1A ve B) ile bulaşık domates meyveleri ve bu meyvelerden elde edilen yeşil kurt larvaları oluşturmaktadır (Şekil 3.1C ve D).



Şekil 3.1. Eceabatta'ki domates tarlalarında yeşil kurt ile bulaşık domateslerin genel görünümü (A ve B) ve bulaşık domateslerin incelenmesi (C ve D)

Yeşil kurdun biyolojisi ile ilgili çalışmalarda Tupperware® kültür kutuları, yumuşak ve sert pens (BioQuip), 9 cm çaplı ve 2 cm yükseklikteki petri kapları, parafilm, PVC'den yapılmış ergin kelebek kafesi, sinek teli, şifon tül, Olympus SZX9 stereozoom mikroskop, Olympus C7070 dijital kamera ataçmanı, 00 numara ince uçlu fırça, yumuşak bez (albahealth®), beyaz kurutma kağıdı, siyah filtre kağıdı (Whatman®), koleksiyon iğneleri (00-1 numara arası), toplu iğne, erlen, deniz kumu, straform (köpük), glassine zarf ve yağlı kağıt kullanılmıştır.

Yapay diyet çalışmalarında buğday ruşeymi (MP Biomedicals), barbunya unu (Kenton), mısır unu (Kenton), nohut unu (Kenton), Brewer's mayası (MP Biomedicals), torula mayası (MP Biomedicals), soya fasulyesi (Kenton), nipagin (Acros Organics) ve sukroz gibi temel besinler kullanılmıştır.

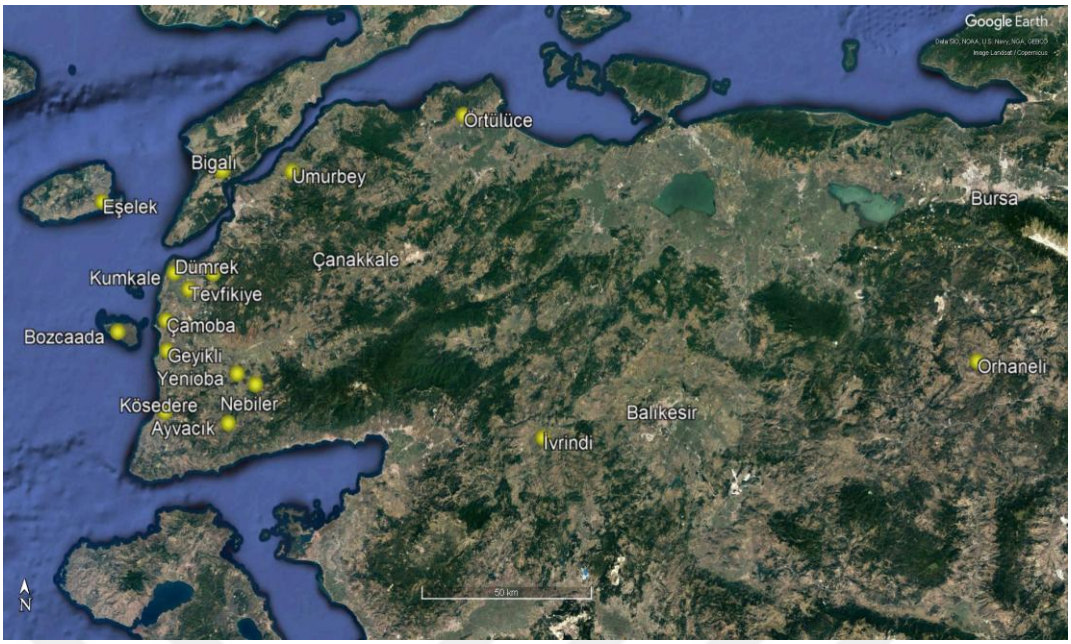
Protein ekstraksiyonu çalışmalarında Bradford solüsyonu (Sigma-Aldrich), 1X Sodyum Fosfat Buffer (PBS), Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich), eppendorf tüp (2.0 ml), Standart Assay (Quick Start™ Bradford Protein Assay), düz tabanlı 96 kuyulu mikroplate kullanılmıştır. Kimyasal malzeme olarak ise, NaCI, KCI, Na_2HPO_4, KH_2PO_4 kullanılmıştır.

Moleküler çalışmalarda ise, DNA izolasyon kiti (GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific), steril eppendorf tüp (2.0 ml), eppendorf tüpe uyumlu ezici çubuklar (mikropestil), mikropipetler, vortex, -20 ˚C'lik derin dondurucu, hassas terazi (Sartorius), santrifüj (Eppendorf), mikrodalga fırın, yatay elektroforez sistemi (Biorad), sıcak su banyosu (Memmert), nanodrop (Thermo scientific), UV transilluminatör (BioDoc-It™ imaging system) ve PCR (Bio-Rad S1000TM Thermal Cycler) kullanılmıştır. Çalışmada kimyasal malzeme olarak, % 96'lık ethanol, steril saf su, 50 X TAE buffer (Thermo scientific), agarose (Prona), DNA loading dye, DNA ladder ve EtBr kullanılmıştır. PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) için ise, steril PCR tüpü (0.2 ml) (USA scientific), DNA, primerler, dNTP, 10X Buffer ve Taq Polimeraz enzimi kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Arazi ve Örnekleme Çalışmaları

Arazi çalışmaları 2017-2018 yılları arasında Dümrek (Merkez), Tevfikiye (Merkez), Batakovası (Merkez), Örtülüce (Biga), Çamoba (Ezine), Kösedere (Ayvacık), Nebiler (Bayramiç), Geyikli (Merkez), Eceabat (Bigalı), Gökçeada (Eşelek), Bozcaada (Merkez), Ayvacık (Merkez), Yenioba (Ezine), Umurbey (Lapseki), Balıkesir (İvrindi) ve Bursa (Orhaneli) olmak üzere toplam 16 farklı lokasyonda yürütülmüştür (Şekil 3.2 ve Çizelge 3.1).



Şekil 3.2. Çanakkale ili ve çevresindeki *H. armigera*'nın sörvey alanları

Çizelge 3.1. Yeşil kurdun Çanakkale ili ve çevresindeki sörveyleri sonucunda yayılış alanı, varlığı ve örnek alınan yerleri

	Örnekleme yapılan yer	**Örnekleme tarihleri**	**Alınan örnek sayısı**	**Elde edilen larva sayısı**	**Toplanılan konukçu**
Çanakkale (Merkez)	Dümrek	05.07.2017	40	5	Domates
	Tevfikiye	21.08.2017	62	26	Domates
	Batakovası	21.08.2017	20	3	Domates
Ezine	Çamoba	22.08.2017	127	80	Domates
	Yenioba	27.08.2018	8	2	Biber
Ayvacık	Merkez	23.08.2018	20	11	Domates
	Kösedere	23.08.2017	71	30	Domates
Biga	Örtülüce	23.08.2018	3	3	Domates
Bayramiç	Nebiler	04.09.2017	39	5	Domates
Geyikli	Merkez	22.08.2017	22	3	Domates
Eceabat	Bigalı	18.08.2018	23	6	Domates
Bozcaada	Merkez	29.08.2018	10	7	Domates
Lapseki	Umurbey	02.09.2018	19	3	Domates
Gökçeada	Eşelek	06.09.2018	21	6	Domates
Bursa	Orhaneli	09.09.2017	9	2	Domates
Balıkesir	İvrindi	17.09.2018	7	2	Domates

Sörveyler zararlının yoğun olduğu Temmuz-Ağustos ayları boyunca gerçekleştirilmiştir. Ekim alanlarında bulunan domatesler gözle kontrol yöntemi ile

dikkatli bir şekilde incelenmiştir. Rastgele seçilen domates üretim alanlarından, domatesin yeşil aksamı ve generatif organlarında inceleme yapılarak zararlının giriş veya beslenme deliğinin bulunduğu bulaşık meyveler toplanmıştır (Şekil 3.3A ve B). Zararlının farklı biyolojik dönemlerini içeren bulaşık domates örnekleri poşetlere (Şekil 3.3C) ve kese kağıtlarına alınmıştır (Şekil 3.3D). Üzerine örneklerin alındığı tarih ve yer bilgilerini içeren etiket bilgileri yazılmıştır. Ardından, toplanan bulaşık örnekler Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Böcek Moleküler Biyolojisi Laboratuvarına getirilmiştir. Yeşil kurdun farklı larva dönemlerini içeren larvalar (1-5 adet) eppendorf tüplere (2.0 ml) alınarak, zararlının farklı popülasyonlardaki genetik çeşitliliğinin belirlenmesi amacı ile moleküler çalışmalar yapılıncaya kadar -20˚C'de saklanmıştır.



Şekil 3.3. Yeşil kurt ile bulaşık domates meyvesi (A), larvalara ait beslenme izi ve giriş deliği (B), bulaşık örneklerin poşette (C) ve kese kağıtlarında laboratuvara getirilmesi (D)

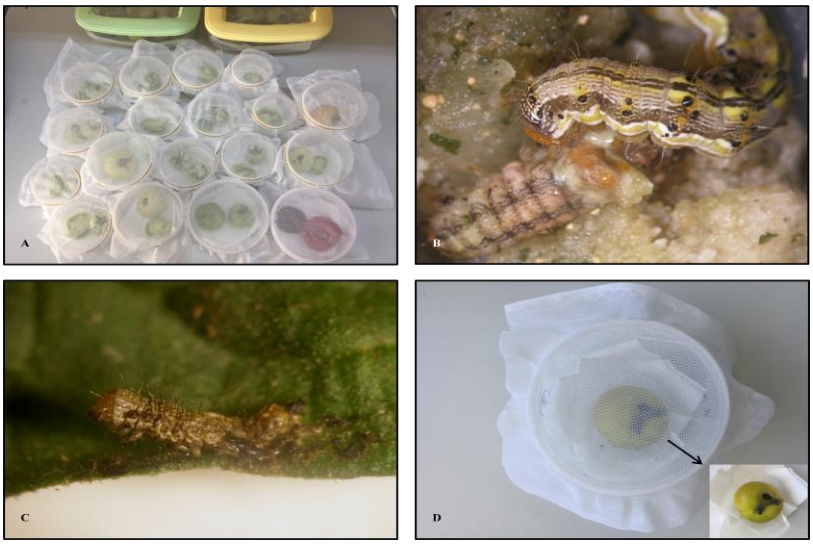
Araziden getirilen yeşil kurt larvalarının III. ve IV. dönemleri laboratuvarda konukçusu üzerinde kültüre alınmıştır. I. dönem larvaların çok küçük olması ve çıplak gözle görünümünün zor olması nedeni ile larvalar öncelikle mikroskop altında incelenmiş, sonra kültüre alınmıştır. Çalışma, öncelikle Dümrek'ten toplanılan 5 larva, Tevfikiye'den toplanılan 26 larva ve Batakovası'ndan toplanılan 3 larva ile toplamda 34 larvanın elde

edilmesiyle yeşil kurt laboratuvar kolonisi oluşturularak başlamıştır. Aynı zamanda, çalışma boyunca farklı zamanlarda yapılan sörveylerden elde edilen yeşil kurt bireyleri laboratuvara getirilerek yeşil kurt kolonisine ilave edilmiş ve böylelikle laboratuvarda popülasyonun genetik çeşitliliği arttırılması hedeflenmiştir.

3.2.2. Laboratuvar Çalışmaları

3.2.2.1. Doğal Konukçusu Üzerinde Yeşil Kurdun Yetiştirilmesi

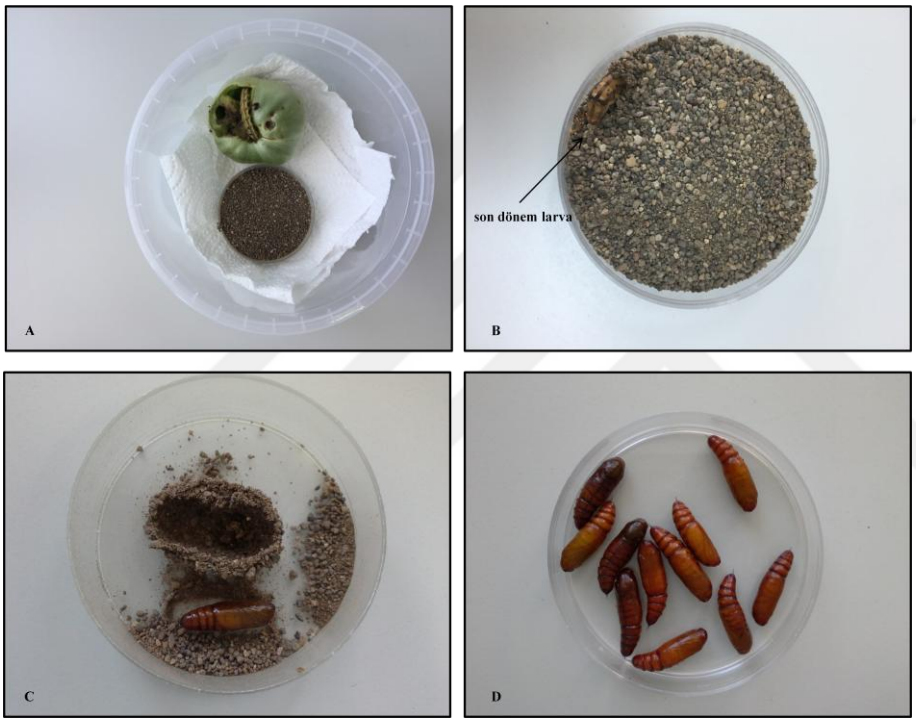
Sörveyler sonucunda araziden getirilen yeşil kurt larvaları 24 ± 1 ˚C sıcaklık, % 65 oransal nem ve 16:8 saat fotoperiyot koşullarında laboratuvarda kültüre alınmıştır. Bu amaç doğrultusunda, larva gelişimi için 14X6,5 cm boyutunda ve 0,7 L hacimdeki Tupperware® saklama kutuları kullanılmıştır (Şekil 3.4A). Saklama kutularının içine havlu peçete konulmuştur. Daha sonra üzeri şeffaf tül ile lastik yardımıyla kapatılmıştır. Yeşil kurt bireylerinin kannibalizm özelliklerinden dolayı (Şekil 3.4B ve C), larvalar III. döneme kadar aynı yerde toplu olarak yetiştirilmiş olup, daha sonra tek tek ayrı kaplara alınmıştır (Şekil 3.4D). Larvaların beslenmesi için bulaşık domateslerin yanında sağlıklı domates meyvesi larva büyüklüğüne bağlı olarak dilimlenerek veya bütün olarak konulmuştur. Çalışma boyunca domates meyvesi ilaçlama yapılmayan yerden temin edilmiştir. Olası pestisit kalıntısını gidermek için domatesler yıkanıp, kurutulduktan sonra kullanılmıştır. Kültür kaplarındaki larvalar her gün kontrol edilmiştir. Çürüyen veya bozulan domatesler iki günde bir taze domates meyvesi ile değiştirilmiştir. Larvaların beslenme pislikleri ve ölen larvalar enfeksiyon oluşturmamak için ortamdan uzaklaştırılmıştır.



Şekil 3.4. Yeşil kurt larva yetiştirme ortamı (A), olgun dönem larvada kannibalizm (B), kannibalizm sonucu zarar görmüş larva (C), tekli kültür kabı (D)

3.2.2.2. Pupa Dönemi İçin Uygun Ortamın Oluşturulması

Laboratuvarda larva gelişme sürelerini tamamlayarak olgun hale gelen larvaların pupa dönemi için ortam hazırlanmıştır. Bunun için, otoklavda 120˚C, 1 saat steril edilen deniz kumu petri kaplarına aktarılarak (9 cm) kültür kaplarının içerisine yerleştirilmiştir (Şekil 3.5A). Pupa dönemine girecek olan olgun larva meyvede beslenmeyi terk ederek kumun içine giriş yapmıştır (Şekil 3.5B) ve petri içinde bulunan kumda pupa olmuştur (Şekil 3.5C). Pupalar yumuşak pens yardımı ile petri kaplarına alınmıştır (Şekil 3.5D) ve ergin çıkışına kadar ergin kafesi içinde bekletilmiştir.



Şekil 3.5. Laboratuvarda pupa dönemi için hazırlanan ortam (A), son dönem larvanın kumun içine girmesi (B), kumda oluşan pupa (C), pupaların genel görünümü (D)

3.2.2.3. Ergin Bireylerin Yetiştirilmesi

Pupa gelişmesini tamamlayan bireyler açılarak ergin hale gelmiştir. Ergin bireyler için, Kaya ve Kovancı (2000), Mironidis ve Savopoulou-Soultani (2008) ve Nunes ve ark., (2017) tarafından da belirtildiği gibi, 20x20x20 cm boyutlarında olan PVC'den yapılmış, dört tarafı sinek teli ile çevrili ergin yetiştirme kafesleri hazırlanmıştır. Kafeslerin bir tarafı ise 20x22,9 cm boyutunda yumuşak bir bez (albahealth®) ile çevrelenmiştir (Şekil 3.6A). Erginlerin beslenmesi için Shorey ve Hale (1965) tarafından da belirtildiği üzere, %10 ballı

su + %10 şekerli su pamuklara emdirilmiş ve petrilere konularak kafeslere yerleştirilmiştir (Şekil 3.6B). Ballı su içeren pamuklar iki günde bir yenilenmiştir.



Şekil 3.6. Ergin kafesinin dış görünümü (A) ve ballı su ile beslenen ergin bireyler (B)

Dişiler yumurtalarını konukçusu olan bitkinin yapraklarına bırakır. Laboratuvarda ergin dişi bireylerin yumurta bırakmasını sağlamak için domates yaprakları kullanılmıştır. Taze domates dalları sap kısmı su içinde kalacak şekilde erlen içine konulmuş ve kenarları parafilm ile sarılarak kafesin içine yerleştirilmiştir (Şekil 3.7A ve B).



Şekil 3.7. Ergin yetişme kafesinin içeriden (A) ve dışarıdan (B) görünümü

Ergin kafeslerinde bulunan dişi ve erkek bireyler çiftleştikten sonra (Şekil 3.8A ve B) domates yapraklarına bıraktıkları yumurtalar (Şekil 3.9A ve B) larvaların beslenmesi için oluşturulan kültür kaplarına alınmıştır. Burada yumurtadan çıkan larvalar nemlendirilmiş 00 yumuşak uçlu fırça ile alınarak domates meyvesine transfer edilmiştir. Kültür kaplarında beslenmesini tamamlayan larvalar pupa olmuştur. Pupaların açılmasıyla

ergin bireyler elde edilerek, ergin yetiştirme kafesine aktarılmış ve yeşil kurdun laboratuvar kolonisi oluşturulmuştur.



Şekil 3.8. Çiftleşen ergin bireylerin A) uzaktan ve B) mikroskop altında görünümü



Şekil 3.9. Domates yaprağının üst kısmına (A) ve alt kısmına (B) bırakılan yumurtalar

3.2.2.4. Müze Materyalinin Oluşturulması

Yeşil kurt ergin kelebeklerinin kanatları öldürüldükten sonra thorax kısmının üst tarafında kalacak şekilde katlanarak glassine zarflara konulmuştur. Zarflar bireylerin zarar görmemesi için -20˚C'de muhafaza edilmiştir. Örnekler, germe işleminin gerçekleştirilmesi için -20˚C'den çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığında 5-10 dk kadar bekletilerek nemlendirilmiştir. Ergin kelebeklerin gerilmesinde koleksiyon malzemeleri uygun hale getirilmiştir. Bunun için, koleksiyon iğneleri (00-1 numara arası), toplu iğne, yumuşak ve sert pens (BioQuip), glassine zarf, yağlı kağıt vb. kullanılmıştır.

Erginlerin germe işleminde özel straform (köpük) kullanılmıştır (Şekil 3.10). Ergin bireyler thoraxın tam orta kısmından çelik böcek iğneleri batırılarak (BioQuip) köpük üzerinde sabitlenmiştir. Ardından, erginlerin kanatları kaide kısmından titizlikle 90˚ olacak şekilde açılmıştır. Kanatların üzerindeki pulların zarar görmemesi için gerilen kanatlar yağlı kağıt ile kapatılmıştır ve kanatlarının gerilmesi sağlanmıştır. Germe işleminin

ardından, örnekler köpük üzerinde 7 gün boyunca kurutulmaya bırakılmıştır. Kuruyan erginler etiket bilgileriyle ÇOMÜ, Ziraat Fakültesi, Böcek Moleküler Biyolojisi Laboratuvarında bulunan koleksiyon dolabına dahil edilmiştir.



Şekil 3.10. Köpük üzerinde gerilmiş ve kurumaya bırakılmış yeşil kurt ergin kelebeklerin görünümü

3.2.3. Yeşil Kurdun Doğal Konukçusu Olan Domates Üzerinde Biyolojik Dönemlerinin İncelenmesi

Yeşil kurdun farklı biyolojik dönemlerinin tespit edilmesi laboratuvarda 24 ± 1 ˚C sıcaklık, % 65 oransal nem ve 16:8 saat fotoperiyotta gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1. Yumurta Döneminin İncelenmesi

Yumurta döneminin incelenmesinde, laboratuvar kolonisinin bıraktığı yumurtalar kullanılarak yeşil kurdun embriyonal gelişme süresi ve yumurta açılma oranları tespit edilmiştir.

Öncelikle, kafeslerin içinde günlük konulan taze domates dallarının yapraklarına bırakılan yumurtalar belirlenmiştir (Şekil 3.11A). Yumurtalar, nemlendirilmiş yumuşak uçlu fırça ile içinde %0,3'lük propionik asit ile nemlendirilen petri kapları içindeki siyah filtre kağıtlarının üzerine aktarılmıştır.

Yumurtaların eni ve boyunun belirlenmesinde okülerinde mikrometre bulunan stereozoom mikroskop kullanılmıştır. Yumurtaların eni ve boyu mikrometre cinsinden ölçülerek kayıt edilmiştir. Elde edilen değer, milimetreye çevrilmiştir. Yumurtaların ağırlıklarının belirlenmesinde ise hassas terazi kullanılmıştır (n=50). Yumurtaların morfolojik özellikleri mikroskop altında incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

Yeşil kurdun yumurta açılma süresi, yumurta açılma oranı ve embriyonal gelişme süresini tespit etmek amacıyla, her petride 100 yumurta olmak üzere toplamda 500 yumurta ile deneme 5 tekerrürlü olarak yürütülmüştür (Şekil 3.11B). Yumurtalar günde iki kez kontrol edilerek açılan yumurtalar kayıt edilmiş olup, yumurta açılma süreleri (gün) belirlenmiştir.



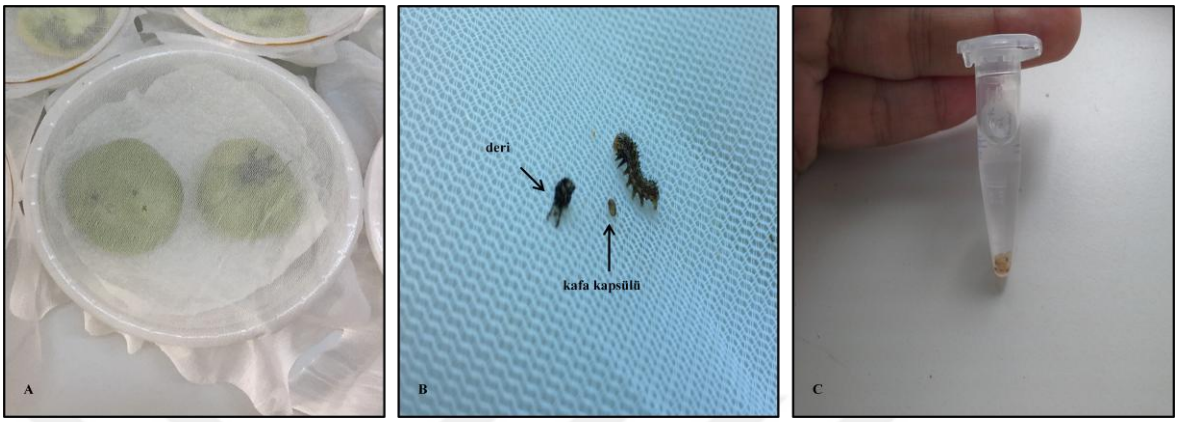
Şekil 3.11. Domates yapraklarına bırakılan yumurtaların görünümü (A) ve yumurtaların petri kabına toplanılması (B)

3.2.3.2. Larva Döneminin İncelenmesi

Yeşil kurt larvalarının gelişmeleri süresince kaç larva dönemi geçirdiğinin belirlenmesinde, Nasreen ve Mustafa (2000), Rabari ve ark. (2017a) ve Rabari ve ark. (2017b) tarafından belirtilen yöntem kullanılmıştır. Burada, yumurtadan yeni çıkan I. dönem larvalar (n=20) nemlendirilmiş yumuşak uçlu fırça ile III. döneme kadar içerisinde dilimlenmiş domates meyvesi bulunan kültür kutularına tek tek transfer edilmiş olup, III. dönemden itibaren ise domates meyvesi bütün olarak kullanılmıştır (Şekil 3.12A). Her bir kültür kabı günlük yapılan gözlemlerle kontrol edilerek larvalar takip edilmiştir. Domates gerektiğinde (çürümenin ve bozulmanın oluştuğu durumlarda) yenisi ile değiştirilmiştir. Larvaların kaç dönem geçirdiği mikroskop altında kafa kapsülleri ölçülerek belirlenmiştir (Şekil 3.12B). Larva gelişme kapları kontrol edilerek, bırakılan kafa kapsülleri yumuşak uçlu fırça ile %70'lik etil alkol bulunan 1.5 ml'lik eppendorf tüplere aktarılmış ve kafa kapsülü ölçümleri gerçekleştirilene kadar bu tüplerde muhafaza edilmiştir (Şekil 3.12C). Her bir kültür kabındaki larvalar pupa dönemine kadar günlük takip edilerek larva gelişme süresi belirlenmiştir.

Günlük olarak yapılan gözlemlerle, kafa kapsülünü yeni değiştirmiş larvaların eni ve boyu stereozoom mikroskop kullanılarak ölçülmüştür. Larva dönemlerine ait morfolojik

karakter özellikleri incelenerek fotoğraflanmıştır. Larvaların ağırlıkları terazi ile günlük olarak tartılmıştır (n=20). Kafa kapsüllerinin eni stereozoom mikroskopta mikrometre yardımı ile hesaplanmıştır. Her bir döneme ait kafa kapsülü ölçülerek fotoğraflanmıştır.



Şekil 3.12. Laboratuvarda yeşil kurt larvalarının yetiştirilmesinde kullanılan kültür kabı (A), larvaya ait kafa kapsülü ve atılan deri (B), kafa kapsülünün saklanması (C)

3.2.3.3. Prepupa ve Pupa Döneminin İncelenmesi

Olgun larvalar (n=25) steril deniz kumu bulunan petri kaplarına konulmuştur. Günlük olarak yapılan gözlemler sonucunda yeşil kurdun prepupa gelişme süresi tespit edilmiştir.

Elde edilen pupaların en, boy ve cinsiyetlerine ait özellikler mikroskop altında incelenerek mikrometre yardımıyla ölçülmüştür. Pupaların ağırlıkları ise hassas terazide tartılmıştır.

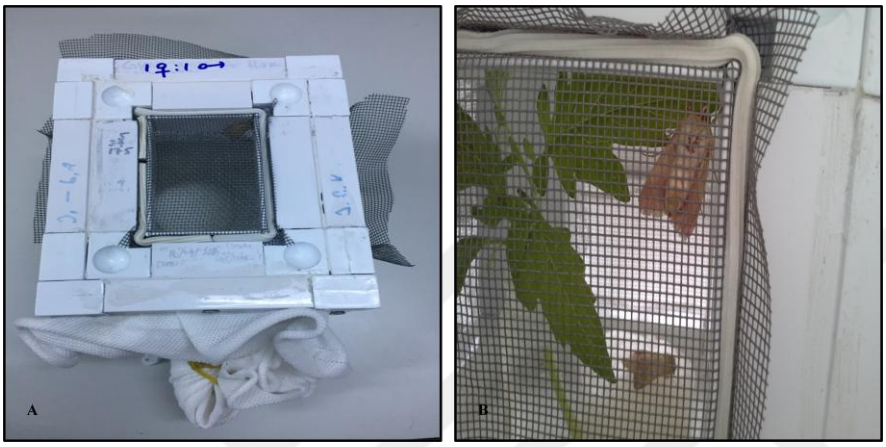
Pupaların abdomenlerindeki morfolojik farklılıklar Genç (2005), Genç (2015) ve Genç (2016)'da ifade edilen teşhis karakter yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bu teşhis yöntemine göre, dişi ve erkek bireylerin ayrımı pupaların abdomenlerinin 8. ve 9. segmentlerinin ventralinde yer alan farklılıklara göre yapılmış ve fotoğraflanmıştır (n=50).

Pupa gelişme süresi ve pupa açılma oranının belirlenmesinde ise deneme, 5 tekerrürlü ve her bir tekerrürde 10 pupa olacak şekilde yapılmıştır. Petri kaplarında pupa olan bireyler tespit edilerek, pupa olma tarihleri not edilmiş ve ergin çıkışına kadar izlenmiştir.

3.2.3.4. Ergin Döneminin İncelenmesi

Yeşil kurdun erginlerinin ömür uzunluğu, dişilerin preovipozisyon, ovipozisyon ve post ovipozisyon süreleri ile birlikte dış morfolojik özellikleri belirlenmiştir. Bunun için

daha önce belirtilen 13x15,5 cm boyutta olan ergin kafesleri kullanılmıştır (Şekil 3.13A). Her kafese 1♀ ve 1♂ ergin konulmuştur (Şekil 3.13B). Erginlerin beslenmesi için %10 ballı su emdirilen pamuklar petri kabı içine kafeslere alınmıştır. Ergin besin ortamları günlük olarak yenilenmiştir. Kafesler günlük kontrol edilerek ölen erginler kafeslerden uzaklaştırılmış ve cinsiyetlerine bakılarak not edilmiştir. Dişi ve erkek bireyin ergin ömrü (gün) hesaplanmıştır. Deneme 10 tekerrürlü olarak yürütülmüştür.



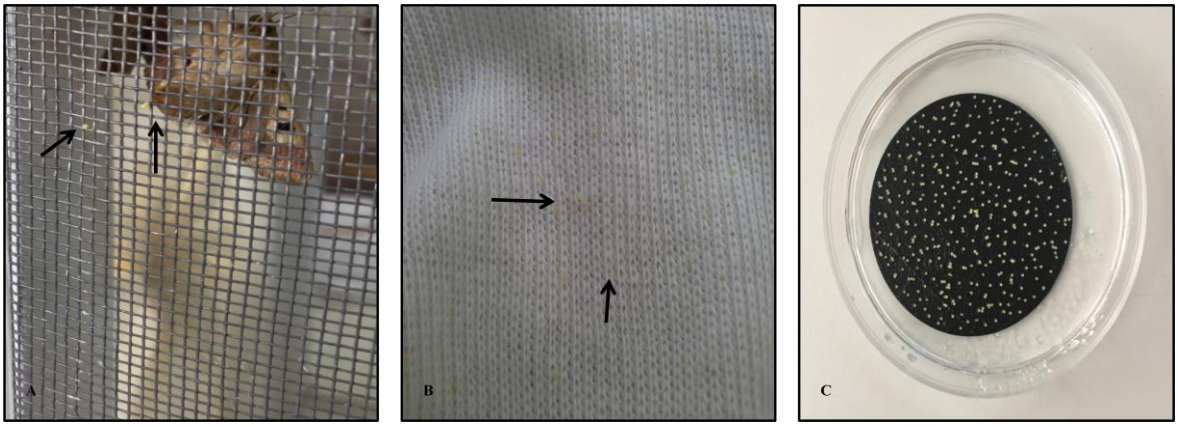
Şekil 3.13. Laboratuvarda 1♀:1♂ çiftleştirme kafesinin görünümü (A) ve erginlerin kafeste dışarıdan görünümü (B)

3.2.3.5. Bırakılan Yumurta Sayısının Belirlenmesi

Bir dişi bireyin bıraktığı yumurta sayısını belirlemek için, denemenin bir önceki adımında çiftleştirme kafeslerinin içine bırakılan erginler kullanılmıştır. Dişi bireylerin yumurta bırakmasını sağlamak amacıyla taze domates yaprakları kullanılmıştır. Yumurta sayıları günlük yapılan kontrollerle domatesin yaprak ve dal gibi kısımları gözle dikkatli bir şekilde kontrol edilerek belirlenmiştir.

Yeşil kurdun dişileri yumurtalarını genellikle bitkinin farklı kısımlarına bırakmasının yanı sıra, abdomenlerinin sonunu ergin kafes tellerin dışına çıkararak, tellerin dış kısmına ve yumuşak beze bıraktığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.14A ve B). Bu nedenle, domates bitkisi ile birlikte kafes teline ve yumuşak beze bırakılan yumurtalar da tek tek sayılarak not edilmiştir. Yumurtalar, nemlendirilmiş siyah filtre kağıdı bulunan petri kabına dikkatli bir şekilde yerleştirilmiştir (Şekil 3.14C). Günlük yapılan kontrollerle dişilerin ilk yumurta bıraktıkları zaman, günlük bırakılan yumurta sayısı ve toplam bırakılan yumurta sayısı belirlenmiştir. Aynı zamanda, dişi bireyin çiftleştikten sonra ilk yumurta bırakma süresi ile

pre ovipozisyon, ilk ve son bırakılan yumurtaların tarihleri ile ovipozisyon, yumurta bırakımından sonraki ergin ömrü ile de post ovipozisyon süresi hesaplanmıştır (n=10).



Şekil 3.14. Dişinin ergin kafesinin teline yumurta bırakması (A), yumuşak beze bırakılan yumurta (B), yumurtaların petri kabında görünümü (C)

3.2.4. Yeşil Kurdun Yapay Diyetlerinin Hazırlanması

Literatürde daha önce belirtilen yapay diyet formülasyonları kullanılarak, yeşil kurdun laboratuvarda yetiştirilmesi, beslenme fizyolojisi ve adaptasyon süreci incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, altı farklı yapay diyet (Poitout ve Bues, 1970; Ivaldi-Sender, 1974; Daguang ve ark., 2002; Hamed ve Nadeem, 2008; Jha ve ark., 2012 ve https://www.mpbio.com; MP #960293) yeşil kurdun beslenmesi için test edilmiştir.

3.2.4.1. Yapay Diyet I ve Hazırlanması

Orijinal olarak *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera:Tortricidae) için geliştirilen ve Ivaldi-Sender diyeti (Ivaldi-Sender, 1974; Bathon ve ark., 1991) olarak bilinen diyet ve formülasyon bu çalışmada diyet I olarak belirtilmiştir. Diyetin hazırlanmasında agar (10 g), mısır irmiği (25 g), buğday ruşeymi (25 g), Brewer's mayası (25 g), askorbik asit (2,25 g), benzoik asit (0,9 g), nipagin (0,9 g) ve saf su (390 ml) kullanılmıştır (Çizelge 3.2).

Diyet malzemeleri tartıldıktan sonra 390 ml kaynar saf su ve agar beher içinde 5 dk karıştırılarak kaynatılmıştır. Besin içerisindeki proteinlerin yüksek sıcaklıkta denatüre olmaması için hazırlanan karışım 60˚C soğutmaya bırakılmıştır. Ardından, mısır irmiği, maya ve buğday ruşeymi karışıma ilave edilerek homojenize olması sağlanmıştır. Daha sonra, askorbik asit ve %96'lık alkol içerisinde çözünmüş benzoik asit ve nipagin ilave edilmiştir. Diyet karışımı, el mikseri yardımı ile homojen hale gelene kadar iyice

karıştırılmıştır. Hazırlanan yapay diyet plastik saklama kutusuna aktarılarak kullanılıncaya kadar +4˚C'de saklanmıştır (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Yapay diyetin aktarılan kaptaki görünümü ve saklanması

3.2.4.2. Yapay Diyet II ve Hazırlanması

Poitout ve Bues (1970) tarafından geliştirilen yapay diyet ortamı bu çalışmada diyet II olarak test edilmiştir. Yapay diyetin formülasyonunda, saf su (340 ml), agar (10 g), mısır unu (56 g), buğday ruşeymi (14 g), torula mayası (15 g), askorbik asit (2 g), nipagin (0,5 g) ve benzoik asit (0,4 g) kullanılmıştır (Çizelge 3.2).

Hazırlanmasında ilk olarak, 340 ml kaynayan saf suya agar ilave edilerek 5 dk karıştırılmış ve daha sonra mısır unu ilave edilmiştir. Ardından torula mayası ve buğday ruşeymi ilave edilerek sıcaklık 56˚C'ye ulaşıncaya kadar manyetik ısıtıcı-karıştırıcıda homojenize olana kadar karıştırılmıştır. Son aşamada askorbik asit, benzoik asit ve nipagin eklenmiş ve yaklaşık 5 dk mikser ile karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım, plastik kutulara aktarılarak kullanılıncaya kadar +4˚C'de saklanmıştır (Şekil 3.15).

3.2.4.3. Yapay Diyet III ve Hazırlanması

Ticari olarak satılan ve *Lymantria dispar* için geliştirilen hazır yapay besin ortamı bu çalışmada diyet III olarak test edilmiştir (https://www.mpbio.com; MP #960293). Diyetin hazırlanması prosedüründe belirtilen şekilde yapılmıştır (Çizelge 3.2). Bunun için ilk olarak 400 ml kaynar saf su ile 6 g agar homojenize edilerek 5 dk kaynatılmıştır. Ardından,

hazır diyet karışımından 66,4 g tartılmıştır. Agarlı su ılıtıldıktan sonra hazır diyet karışımı ilave edilerek homojenize sağlanana kadar karıştırılmıştır. Elde edilen besiyeri, plastik saklama kutularına alınarak kullanılıncaya kadar +4˚C'de bekletilmiştir (Şekil 3.15).

3.2.4.4. Yapay Diyet IV ve Hazırlanması

Hamed ve Nadeem (2008) tarafından kullanılan yapay diyet bu çalışmada diyet IV olarak test edilmiştir. Yapay diyetin içeriği brewer's mayası (6 g), sükroz (6 g), %10 formaldehit (1,5 ml), %20 kolin klorit (3 ml), askorbik asit (1,2 g), metil paraben (0,75 g), sorbik asit (0,45 g), streptomisin (0,01 g), kolesterol (0,06 g), buğday ruşeymi yağı yerine zeytinyağı (0,06 ml), USDA vitamin mix (0,12 g), agar (4,5 g) ve saf sudan (220 ml) oluşmuştur. Bu diyet üç aşamada hazırlanmıştır (Çizelge 3.2).

Birinci aşamada, beherde 100 ml saf suda 4,5 g agar homojenize edilecek bir şekilde karıştırılıp 5 dk kaynatılmıştır. İkinci aşamada, ayrı bir beherde 120 ml kaynatılmış saf suyun içine kuru maddeler olan brewer's mayası, sükroz ve buğday ruşeymi eklenerek iyice karıştırılmıştır. Üzerine formaldehit ve kolin klorit de eklenmiştir. Hazırlanan bu karışım ile agarlı su karıştırılmıştır. Üçüncü aşamada ise, askorbik asit, metil paraben, sorbik asit, streptomisin, kolesterol, vitamin mix ve zeytinyağı karışıma ilave edilerek el mikseri ile 5 dk boyunca homojenize edilmiştir. Hazırlanan yapay diyet plastik kaplara aktarılarak +4˚C'de kullanılıncaya kadar saklanmıştır (Şekil 3.15).

3.2.4.5. Yapay Diyet V ve Hazırlanması

Daguang ve ark. (2002) tarafından geliştirilen ve bu çalışmada modifiye edilen yapay besin ortamı bu çalışmada diyet V olarak test edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda, yapay besinin bileşiminde soya unu (50 g) yerine; pepton (25 g) ve barbunya unu (25 g), mısır unu (100 g), Brewer's mayası (45 g), sükroz (20 g), agar (6 g), sorbik asit (1 g), nipagin (3 g), %37 formaldehit (1 ml), Vanderzant vitamin mix (2 g), pamuk yağı yerine zeytinyağı (2 ml) ve saf su (650 ml) kullanılmıştır (Çizelge 3.2).

Besinin hazırlanmasında, 650 ml kaynayan saf su içerisine agar ilave edilmiş ve 5 dk karıştırılarak kaynatılmıştır. Daha sonra sükroz, mısır unu, pepton, barbunya unu ve brewer's mayası ilave edilerek elde edilen karışım el mikseri yardımı ile karıştırılarak, karışım 75˚C'ye soğutulmaya bırakılmıştır. En son olarak sorbik asit, nipagin, vitamin mix, formaldehit ve zeytinyağı eklenerek mikser ile 5 dk karıştırılmıştır. Yapay diyet plastik kaplara aktarılarak kullanılıncaya kadar +4˚C'de bekletilmiştir (Şekil 3.15).

3.2.4.6. Yapay Diyet VI ve Hazırlanması

Jha ve ark. (2012) tarafından belirtilen formülasyon modifiye edilerek diyet VI olarak test edilmiştir. Barbunya unu (75 g) yerine; nohut unu (37,5 g) ve kuru fasulye unu (37,5 g), buğday ruşeymi (27,5 g), hidrolize brewer's mayası (30 g), L-sistin (0,3 g), askorbik asit (3 g), sorbik asit (0,75 g), nipagin (0,875 g), agar (18,75 g) ve saf su (650 ml) kullanılarak hazırlanmıştır (Çizelge 3.2).

Besin ortamının hazırlanmasında, 650 ml saf suya 18,75 g agar ilave edilerek karıştırılmış ve 5 dk kaynatılmıştır. Üzerine nohut unut, kuru fasulye unu, buğday ruşeymi ve hidrolize brewer's mayası eklenerek 2-3 dk el mikseri ile karıştırılmıştır. En son olarak diğer malzemeler olan L-sistin, askorbik asit, sorbik asit ve nipagin karışıma dahil edilmiştir. Karışım tekrar mikser ile 5 dk homojenize edilmiştir. Yapay diyet, plastik kutulara aktarılmış ve +4˚C'de kullanılıncaya kadar bekletilmiştir (Şekil 3.15).

Çizelge 3.2. Yeşil kurt için test edilen yapay diyetlerin bileşenleri

Diyet İçerikleri	**Diyet I** (Ivaldi-Sender, 1974)	**Diyet II** (Poitout ve Bues 1970)	**Diyet III** (MP #960293)	**Diyet IV** (Hamed ve Nadeem 2008)	**Diyet V** (Daguang ve ark., 2002)	**Diyet VI** (Jha ve ark., 2012)
Barbunya Unu	-	-	-	-	25 g	-
Soya Unu	-	-	-	-	-	-
Fasulye Unu	-	-	-	-	-	37,5 g
Mısır Unu	-	56 g	-	-	100 g	-
Mısır İrmiği	25 g	-	-	-	-	-
Nohut Unu	-	-	-	-	-	37,5 g
Pepton	-	-	-	-	25 g	-
Brewer's Mayası	25 g	-	-	6 g	45 g	30 g
Agar	10 g	10 g	6 g	4,5 g	6 g	18,75 g
Buğday Ruşeymi	25 g	14 g	-	6 g	-	27,5 g
Torula Mayası	-	15 g	-	-	-	-
Sükroz	-	-	-	6 g	20 g	-
Sorbik Asit	-	-	-	0,45 g	1 g	0,75 g
Kolesterol	-	-	-	0,06 g	-	-
Askorbik Asit	2,25 g	2 g	-	1,2 g	-	3 g
Benzoik Asit	0,9 g	0,4 g	-	-	-	-
Streptomisin	-	-	-	0,01 g	-	-
Formaldehit (%10)	-	-	-	1,5 ml	-	-
Formaldehit (%37)	-	-	-	-	1 ml	
Vitamin Mix USDA	-	-	-	0,12 g	-	-
Kolin Klorit (%20)	-	-	-	3 ml	-	-
Vanderzant Vitamin Mixture	-	-	-	-	2 g	-

Çizelge 3.2.'nin devamı

Zeytinyağı	-	-	-	0,06 ml	2 ml	-
Nipagin	0,9 g	0,5 g	-	0,75 g	3 g	0,875 g
L-sistin	-	-	-	-	-	0,3 g
Lymantria dispar (MP #960293)	-	-	66,4 g	-	-	-
Su	390 ml	340 ml	400 ml	220 ml	650 ml	650 ml

3.2.4.7. Yapay Diyet Denemelerinin Oluşturulması ve İzlenmesi

Yapay diyet çalışmaları I. dönem larvalar kullanılarak test edilmiştir (Şekil 3.16A). Denemeler, laboratuvarda kontrollü koşullar altında 24 ± 1 ˚C sıcaklık, % 65 oransal nem ve 16:8 saatte yürütülmüştür. Hazırlanan yapay diyetler +4˚C'den çıkarılarak 3x3 cm boyutlarında küçük parçalar halinde dilimlenmiş ve 20-25 g olacak şekilde tartılmıştır.

Diyet parçaları beyaz kurutma kağıdı bulunan petri kaplarına (9 cm) yerleştirilmiştir (Şekil 3.16B). Yapay diyet denemeleri 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 10 larva olacak şekilde yürütülmüştür. I. dönem yeşil kurt larvaları (n=10) petri kabı içinde bulunan diyet parçası üzerine transfer edilmiştir. Ardından, petri kapları kenarları hava almayacak şekilde 1-2 cm kalınlığında kesilmiş olan parafilm ile kaplanmış ve böylece diyetin kuruması önlenmiştir. Petri kapları her gün havalandırılarak larvaların hava alması sağlanmıştır. Larvalar III. döneme kadar petri kabında yetiştirilmiştir. III. dönemden sonra larvalar 12x8,5 cm boyutunda ve 0,74 L hacminde, içerisinde yapay diyet ve petri kabında steril deniz kumu bulunan saydam plastik kaplara alınarak yetiştirilmiş ve bu kaplarda pupa olması sağlanmıştır (Şekil 3.16C). Ayrıca, pozitif kontrol olarak domates meyvesi üzerinde larva gelişmesi de izlenerek yapay diyet denemeleri yürütülmüştür. Diyetler iki günde bir havalandırılarak yerine taze diyet konulmuş ve larvalar bu yeni diyete transfer edilmiştir. Larvaların diyetler üzerinde gelişme süresi, deri değiştirme sayısı ve kafa kapsülleri günlük olarak yapılan gözlemlerle izlenmiş ve fotoğraflanmıştır. Yapay diyette ölen larvalar petri kabından uzaklaştırılarak kayıt altına alınmıştır. Diyet üzerinde beslenmesini tamamlayan larvalar pupa olduktan sonra prepupa süresi, pupa gelişme süresi, pupaların açılma oranı, pupa eni, boyu ve ağırlığı, erginlerin açılma oranı ve kafa kapsülü eni hesaplanarak belirlenmiştir.



Şekil 3.16. Biyoloji çalışmalarında kullanılan I. dönem larva (A), test edilen yapay diyetlerin petri kabında görünümü (B), olgun larva (C)

3.2.4.8. İstatistik Analizler

Çalışma sonuçlarının değerlendirilmesinde ve analizlerinde kaydedilen veriler tek yönlü ANOVA varyans analizine tabi tutulmuştur. Ortalamalar arasındaki farklılık $P \leq 0,05$ önem seviyesine göre TUKEY çoklu karşılaştırma testiyle belirlenmiştir. Verilerin analizi Minitab 17 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Yapay diyet çalışma sonuçlarının analizinde, farklı diyetlerin yeşil kurdun biyolojik parametreleri üzerine etkisi ve farklı diyetlerin larva gelişme üzerine etkisinin belirlenmesinde faktöriyel düzende varyans analiz tekniği kullanılmıştır. Elde edilen değerler Minitab 17 paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Farklılıkların karşılaştırılmasında parametrik çoklu karşılaştırma testi olan TUKEY testinden yararlanılmıştır ve 0,05 önemlilik seviyeleri kullanılarak ortalamalar arasındaki farklılıkların önemliliği belirlenmiştir.

3.2.5. Yeşil Kurdun Protein Analizi

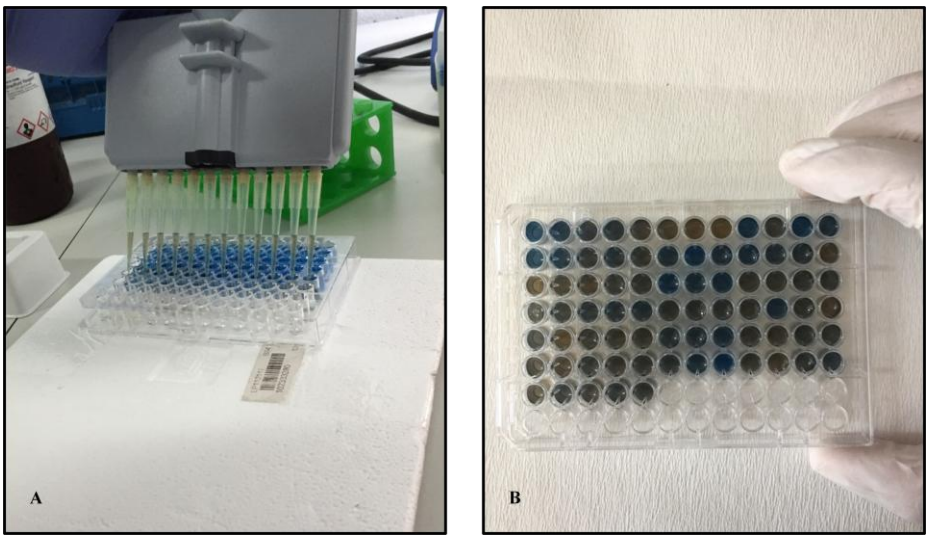
Yeşil kurdun doğadan toplanan olgun larva, laboratuvarda doğal konukçusu üzerinde beslenen olgun larva, pupa ve ergin bireyleri ile yapay diyet üzerinde yetiştirilen ergin bireylerin gerekli ve temel olan proteinleri yapay diyetten sağlayabildiklerinin tespit edilmesi amacıyla toplam protein miktarının belirlenmesine yönelik olarak protein analizi yapılmıştır.

Çalışmada Bradford metodu (Bradford, 1976)'na göre protein analizi yapılmıştır. Bunun için yeşil kurdun farklı biyolojik dönemleri ile birlikte yapay diyetlerden elde edilen örnekler kullanılmıştır. Protein ekstraksiyonu yapılacak örnekler hassas terazide tartılmış (25-75 mg arası) ve değerler not edilmiştir. Analizde kullanılacak olan doğadan toplanan son dönem larva, yeşil kurt laboratuvar kolonisinden elde edilen son dönem larva, pupa, ergin ve yapay diyetlerden elde edilen ergin bireyler hassas terazide tartıldıktan

sonra 2 ml'lik kilitli kapaklı eppendorf tüpler içerisine yerleştirilerek analizlere kadar -20˚C'de bekletilmiştir.

Protein analizine tabi tutulacak örneklerin homojenizasyonu için 1X PBS Buffer (Sodyum Fosfat Tamponu) hazırlanmıştır. Hassas terazide NaCI (8 g), KCI (2 g), Na_2HPO4 (1,15 g) ve KH_2PO4 (0,2 g) tartılmıştır. Tartımı yapılan kimyasalların üzerine ağırlık/hacimce (w/v) 1 litre olacak şekilde saf su ilave edilmiştir. PBS buffer pHmetre yardımıyla pH 7,2 olarak ayarlanmış ve +4˚C'de muhafaza edilmiştir.

Eppendorf tüp içinde bulunan örneklerin üzerine 600 µl soğuk PBS buffer eklenilmiştir. Ardından örnekler mikropestil ile dikkatli bir şekilde ezilmiştir. Ezilen örneklerin üzerine tekrar 600 µl soğuk PBS buffer ilave edilmiştir. Bu şekilde dokuların parçalanması sağlanmıştır. Örnekler 10-15 sn vorteks edilmiş ve daha sonra -20˚C'de 30 dk bekletilmiştir. Buzdolabından çıkarılan homojenantlar tekrar vorteks yapılmış ve +4˚C'de 5000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Örneklerin süpernatant kısmı (üst faz kısmı alınarak) etiketlenen yeni eppendorf tüplere transfer edilmiştir. Örneklere ait homojenattan 5 µl alınarak mikroplaka üzerine yükleme yapılmış ve üzerlerine Comassie Brillant Blue içeren hazır Bradford solüsyonundan (Sigma-Aldrich) 250 µl eklenilmiştir (Şekil 3.17A). Boyanın örneklere iyi bir şekilde bağlanması amacıyla mikroplaka oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir (Şekil 3.17B). Son aşamada, örneklerin mikroplaka okuyucuda (Epoch) spektrofotometrik olarak 595 nm dalga boyunda absorbans değerlerinin okumaları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.17. Örneklere Bradford solüsyonu ilave edilmesi (A) ve boyanın mikroplaka üzerinde örneklere bağlanması (B)

Örneklerin protein miktarının belirlenmesinde, farklı oranlarda proteine sahip 2 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında 8 farklı konsantrasyonda (0 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml, 2000 µg/ml) seri hazırlanmıştır. Standardın hazırlanmasında 1 ml Standart Assay (Quick Start™ Bradford Protein Assay)'den yararlanılmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Protein standardının (BSA) hazırlanması

Tüp No	Standart hacim (µl)	Standart kaynağı	Seyreltici hacim (PBS) (µl)	Final protein miktarı (µg/ml)
1	100	2 mg/ml stok	0	2000
2	150	2 mg/ml stok	50	1500
3	100	2 mg/ml stok	100	1000
4	100	Tüp 2	100	750
5	100	Tüp 3	100	500
6	100	Tüp 5	100	250
7	100	Tüp 6	100	125
8	0	-	100	0

3.2.6. Yeşil Kurdun Moleküler Çeşitliliğinin Belirlenmesi

3.2.6.1. Genomik DNA İzolasyonu

Yeşil kurdun genomik DNA izolasyonu GeneJET Genomic DNA Purification Kit (50) (Thermo Scientific) kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla, her bir lokasyonu temsil eden yeşil kurt larvalarının ağırlıkları tartılarak eppendorf tüplere (2.0 ml) konulmuştur. Protokole göre, her bir tüpün içerisine dokuların parçalanması için 180 µl digestion solüsyon eklenilmiştir. Ardından, yeşil kurt larvaları ezici çubuklar (mikropestil) yardımıyla ezilmiştir (Şekil 3.18A). Homojenizasyon işleminin ardından 20 µl Proteinaz K eklenerek proteinlerin parçalanması ve böylelikle DNA'nın serbest kalması sağlanmıştır (Şekil 3.18B). Ardından örnekler kısa vorteks uygulaması ile karıştırılmıştır. Eppendorf tüpler 56˚C'de sıcak su banyosunda 2 saat bekletilmiştir (Şekil 3.18C). Tüpler 30 dk'da bir çıkartılarak 5-6 sn vorteks edilmiştir (Şekil 3.18D). Daha sonra örneklere 20 µl RNase A ilave edilerek RNA'nın parçalanması sağlanmıştır. Ardından örnekler tekrar kısa vorteks işlemine tabi tutulmuş olup, 25˚C'de 10 dk bekletilmiştir. Örneklerin üzerine 200 µl lysis solüsyon eklenilerek tüplere 15 sn vorteks uygulanmıştır. Bu işlemin ardından örnekler sıcak su banyosunda 70˚C'de 10 dk boyunca bekletilmiştir. Sıcak su banyosundan çıkarılan örneklerin içine 200 µl etanol (%96-100) eklenerek DNA'nın açığa çıkması sağlanmıştır (Şekil 3.18E). Örnekler kısa vorteksin ardından kitte bulunan spin columna

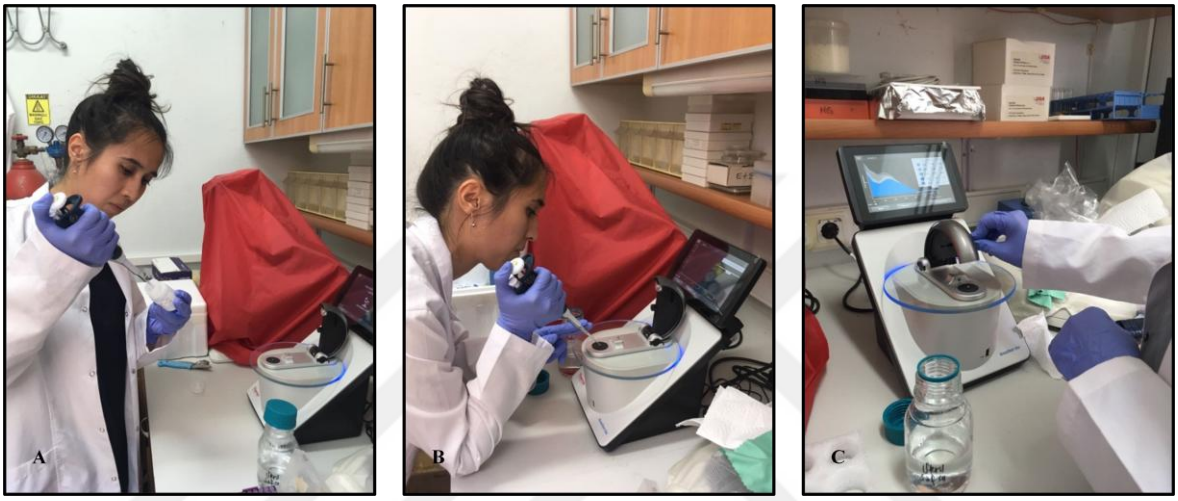
hazırlanmıştır (Şekil 3.18F). Tüplerdeki üst faz kısmı alınarak (yaklaşık 750 µl) etiketlenen spin column'a aktarılmıştır. Örnekler 1 dk 8000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Santrifüj ile dibe çöktürülen kısım tüp ile beraber atılarak spin column yeni tüplere yerleştirilmiştir. Üzerine 500 µl Wash buffer I ilave edilerek DNA yıkanmıştır. Daha sonra tüpler 1 dk 8000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası örneklerin altındaki tüpler değiştirilmiştir. Spin column içine 500 µl Wash buffer II eklenilmiştir. Tüpler 3 dk 14,000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından spin column altında bulunan tüpler atılmış ve yerine yeni etiketlenen eppendorf tüp yerleştirilerek spin columna 200 µl elution buffer eklenerek örnekler 25˚C'de 1 dk boyunca bekletilmiştir. Örnekler daha sonra 1 dk 8000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Elde edilen DNA kullanılıncaya kadar -20˚C'de bekletilmiştir.



Şekil 3.18. DNA izolasyonu aşamaları. Örneklerin mikropestil ile ezilmesi (A), tüplere Proteinaz K ilave edilmesi (B), tüplerin sıcak su banyosuna yerleştirilmesi (C), örneklere vorteks uygulanması (D), tüplere etanol eklenilmesi (E), spin column hazırlanması (F)

3.2.6.2. DNA Miktarı ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Çalışmada izole edilen DNA örneklerinin, DNA miktarı ve konsantrasyonunun belirlenmesi için Nanodrop™ (One Microvolume UV-Vis spectrophotometer, Thermo Scientific™) cihazından yararlanılmıştır. Öncelikli olarak, elution buffer solüsyonundan 1 µl alınarak cihazda blank uygulanmıştır (Şekil 3.19A). Ardından, genomik DNA örneklerinden 1 µl cihaza yüklenmiştir (Şekil 3.19B) ve cihazın kapağı kapatılarak DNA miktarı ve saflık okumaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.19C).



Şekil 3.19. Nanodrop ile DNA tayini. Elution buffer solüsyonu ile blank alınması (A), gDNA örneklerinin cihaza yüklenilmesi (B) ve cihazda okumanın gerçekleştirilmesi (C)

3.2.6.3. Agaroz Jel Elektroforezi

gDNA örnekleri %0,7'lik agaroz jelde koşturulmuştur. %0,7'lik agaroz jel hazırlanması için, 0,28 g agaroz (Prona agarose) tartılmış olup, bir erlen içerisine konulmuştur (Şekil 3.20A). Üzerine 40 ml saf su ilave edilerek çalkalanmıştır. Agarozun saf su içinde homojen bir şekilde çözünmesi için agaroz mikrodalga fırında eritilmiştir. Mikrodalga fırından çıkarılan agaroz ılık hale getirildikten sonra içine 800 µl TAE buffer (50X) ve 3 µl ethidium bromide ilave edilmiştir (Şekil 3.20B). Erlen, kabarcık oluşturmadan tekrar çalkalanmıştır. Hazırlanan agaroz elektroforez aparatına yavaş bir şekilde dökülmüştür. Jelin polimerize olması için 25˚C'de yaklaşık yarım saat bekletilmiştir. Jel, elektroforez tankına yerleştirilerek tankın içine 1X TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM asetik asit, 1 mM EDTA) ilave edilmiştir (Şekil 3.20C). Parafilm üzerinde örnek sayısı kadar 2 µl 6X loading dye (Fermentas) hazırlanmıştır. gDNA örneklerinden 5 µl, 6X loading dye ile karıştırılmıştır. Jel üzerinde bulunan ilk kuyucuğa 3 µl 1-kb DNA

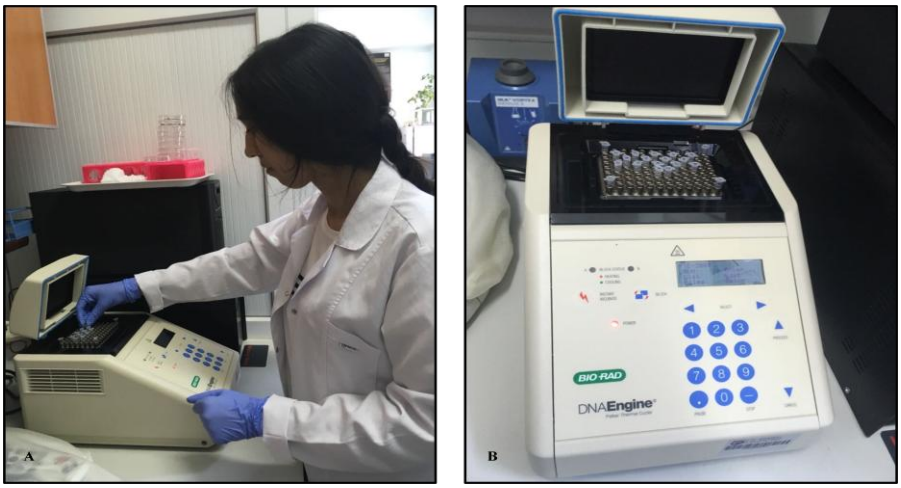
ladder (Fermentas International Inc.,) ve yanındaki kuyucuklara ise genomik DNA örnekleri yüklenmiştir. Jel 120 volt, 200 A akımda, 30 dk yürütülmüştür. Yürütülen örneklerin görüntüleri UVP Transilluminator altında görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.



Şekil 3.20. Agarozun tartılması (A), agaroz jele ethidium bromide ilave edilmesi (B) ve agaroz jelin elektroforez aparatına dökülmesi (C)

3.2.6.4. Hedef mtDNA Bölgesinin PCR Amplifikasyonu ve Optimizasyonu

Çalışmada, moleküler belirteç olarak mtDNA COI gen bölgesinin çoğaltılması için LCO1490 (F) (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') ve HCO2198 (R) (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') universal primer çifti (Folmer ve ark., 1994) kullanılmıştır. PCR işlemi için ise Bio-Rad S1000TM Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.21).



Şekil 3.21. Tüplerin PCR makinesine yerleştirilmesi (A) ve çalışmada kullanılan PCR cihazı (B)

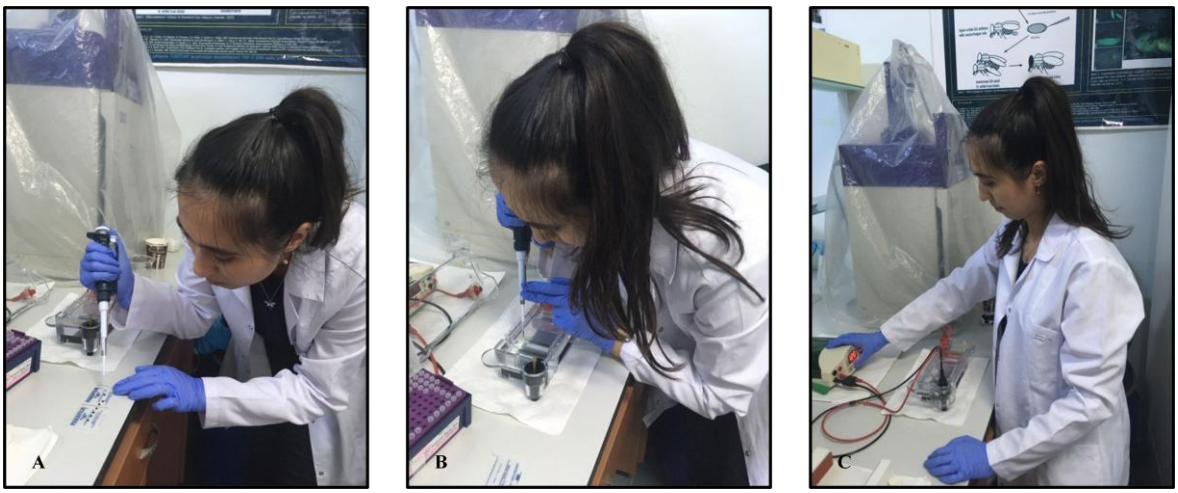
Çalışmada, PCR reaksiyonu 2,5 µl 10X PCR buffer (Ampliqon), 1 µl $MgCI_2$ (Ampliqon), 0,5 µl dNTPs, 0,5 µl F primer, 0,5 µl R primer, 1 µl template DNA, 0,1 µl Taq polimeraz enzimi (Ampliqon) ve 18,9 µl grade su (Ampliqon) olmak üzere toplam 25 µl hacim olarak hazırlanmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. PCR'da kullanılan kimyasalların konsantrasyonları ve miktarları

Kimyasallar	Konsantrasyon	Miktarı
PCR reaksiyon buffer	10X	2,5 µl
$MgCI_2$	25 mM	1 µl
dNTPs	10 mM	0,5 µl
Forward primer	10 pmol/µl	0,5 µl
Reverse primer	10 pmol/µl	0,5 µl
DNA	20-30 ng/µl	1 µl
Taq polimeraz	1 U	0,1 µl
PCR grade su	-	18,9 µl
Toplam	-	25 µl

PCR döngü programı; 94˚C'de 4 dk ilk denatürasyon, 94˚C'de 40 sn denatürasyon, 48˚C'de 1 dk bağlanma ve 72˚C'de 45 sn uzama olarak toplamda 35 döngü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Ardından örnekler 72˚C'de 10 dk bekletilerek final uzaması ile sonlandırılmıştır.

Elde edilen PCR ürünlerinden 3 µl alınarak 2 µl loading dye ile karıştırılmıştır (Şekil 3.22A). Jeldeki ilk kuyucuğa marker, diğer kuyucuklara ise PCR ürünleri yüklenmiştir (Şekil 3.22B). Örnekler %1'lik (w/v) agaroz jelde 120 V'da 30 dk boyunca elektroforeze tabi tutulmuştur (Şekil 3.22C).



Şekil 3.22. Örneklerin loading dye ile karıştırılması (A), örneklerin kuyucuklara yüklenmesi (B) ve elektroforez düzeneğinin çalıştırılması (C)

3.2.6.5. DNA Dizi Analizi

Elde edilen PCR ürünleri çalışmada kullanılan forward primer ile birlikte MedsanTek San. Ltd. Co. firmasına (İstanbul) gönderilmiş ve BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 ile ABI (Applied Biosystems) cihazında dizi analizine tabi tutulmuştur.

3.2.6.6. Filogenetik Analizler

Çalışmada DNA dizisine ait ham veriler FASTA formatına dönüştürülmüştür. DNA dizisinin benzerlik analizleri için NCBI'da (www.ncbi.nlm.nih.gov) bulunan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı kullanılmıştır. Primer dizileri MEGA X paket programında manuel olarak bir araya getirilmiş ve kesilmiştir. Kesimi yapılan diziler GenBank veri tabanında MN132887-MN132931 aksesyon numaraları ile kaydedilmiştir. Ardından, diziler Clustal W (1.6) (Thompson ve ark., 1994) programı ile hizalanmıştır. mtDNA COI bölgesinin dizi analizindeki ortalama transition (pürin-pürin veya pirimidin-pirimidin dönüşümleri) ve transversion (pürin-pirimidin veya pirimidin-pürin dönüşümleri) oranı ile beraber nükleotid frekansı hesaplanmıştır.

Popülasyonlar arası genetik uzaklıkları saptamak ve filogenetik ilişkilerini belirlemek için Komşu Birleştirme Metodu (Neighbour Joining Method; Saitou ve Nei, 1987) kullanılmıştır. Bu metot, Kimura (1980) tarafından önerilen "İki-Parametre Metodu" (Kimura's Two-Parameter Method) seçilerek MEGA X paket programında gerçekleştirilmiştir (Kumar ve ark., 2018). Bu modelde, önemliliğin tahmini için 1000 bootstrap tekerrürü uygulanmıştır.

Genetik çeşitlilik analizleri DnaSP v6 (Rozas ve ark., 2017) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu programda, popülasyonlar için polimorfik alan sayısı (S), haplotip sayısı (N_h) ve nükleotid farklılığı (k) (Tajima, 1983) analiz edilmiştir. Elde edilen haplotiplerden haplotip çeşitliliği (h), nükleotid çeşitliliği (π) (Nei, 1987) ve gen akışı parametreleri (F_{st}) değeri hesaplanmıştır. Bununla birlikte, popülasyon genetiği analizleri için çift nükleotid farklılıkları matrisine dayanan haplotipler arasındaki genetik mesafeler p-distance modeli ile hesaplanmıştır.

Popülasyonlardaki haplotip gruplarının demografik geçmişlerine ait farklılıkların hesaplanmasındaki Uyumsuzluk (Mismatch) Dağılım Analizi, DnaSP v6 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Rozas ve ark., 2017).

Çalışmada, popülasyon içinde seçilim olup olmadığını belirleyen nötralite testinden yararlanılmıştır. Bu test, rekombinasyon infinite modeline dayalı bir testtir. Burada Tajima

D (Tajima's *D* test; Tajima, 1989) değeri ve Fu F_s (Fu's F_s test; Fu, 1997) değeri DnaSP v6 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Bu testin istatistikleri, elde edilen sonuçların negatif veya pozitif olma durumuna göre değerlendirilmiştir.

Türler arasındaki genetik akrabalıklar dendogramı UPGMA (Unweighted Pair Group Cluster Analysis) metoduna göre MEGA X programının Tamura (1992) tarafından önerilen "Üç-Parametre Metodu" (Tamura 3-parameter method) modülü seçilerek analiz edilmiştir. Dendogram 1000 bootstrap tekrarlı olarak yapılmıştır. Burada, GenBank ulaşım kodu numarası (GU439148) olan *Spodoptera frugiperda* dış grup olarak kullanılmıştır.

Her bir lokasyondaki haplotiplerin dağılımlarının gösterilmesinde ve birbirlerine yakın konumda bulunan bu haplotiplerin mutasyonları baz alınarak elde edilen değerlerin şematize edilmesinde Medyan Birleştirme Ağı (Median Joining Network; Bandelt ve ark., 1991), PopART v1.7 programı kullanılarak çizilmiş ve görsel hale getirilmiştir (Leigh ve Bryant, 2015).

.

BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

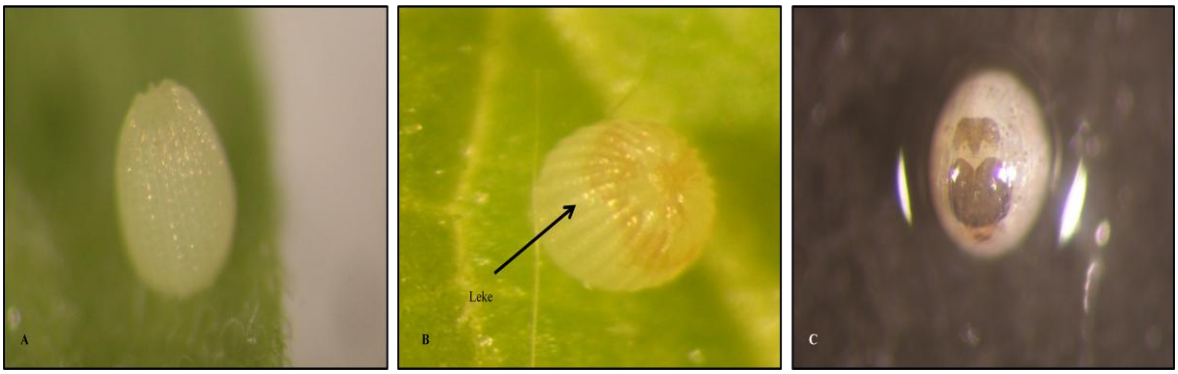
4.1. Yeşil Kurdun Domates Üzerindeki Biyolojik Dönemlerinin Belirlenmesi

4.1.1. Yumurta Dönemi

Yeşil kurdun yumurtaları sarımsı krem renginde, hafifçe basık küre şeklinde olup, eni ortalama 0,50±0,03 mm ve boyu 0,61±0,03 mm uzunluğundadır. Yumurtaların ağırlığı ise ortalama 0,0001 g'dır (n=50).

Yeşil kurt erginleri yumurtalarını domates bitkisinin yapraklarının üst kısmına, alt kısmına ve sapına tek tek ya da gruplar halinde bırakmaktadır. Yumurtaların üzerinde uzunlamasına 20-23 adet çizgiler ve bunların arasında da enine küçük çizgiler bulunmaktadır (Şekil 4.1A). Yumurtanın rengi, embriyonik gelişme döneminin ilerlemesine bağlı olarak değişmektedir. Yumurta bırakıldıktan yaklaşık iki gün sonra anterior kısmında turuncu renkli dairesel lekeler meydana gelmiştir (Şekil 4.1B). Bununla birlikte, yumurta içinde gelişen larvayı dışarıdan görmek mümkün olmaktadır. Larvaların başı ile birlikte, ağız parçalarına ait kısımlarının, gözlerinin ve vücudunda bulunan kılların belirgin bir şekilde meydana geldiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.1C). Yumurtaların gelişme süresi 24±1˚C'de, %65 oransal nemde ve 16:8 fotoperiyotta ortalama 2,6±0,54 gün olarak tespit edilmiştir.

Yeşil kurdun yumurtalarının açılma oranı incelendiğinde ise, 100 adet yumurtadan ortalama %85,83±7,05 yumurtanın açıldığı tespit edilmiştir (n=5).



Şekil 4.1. Yeşil kurt yumurta dönemi A) yeni bırakılan yumurta, B) iki gün yaşta yumurta, C) açılmak üzere olan yumurtanın görünümü

4.1.2. Larva Dönemi

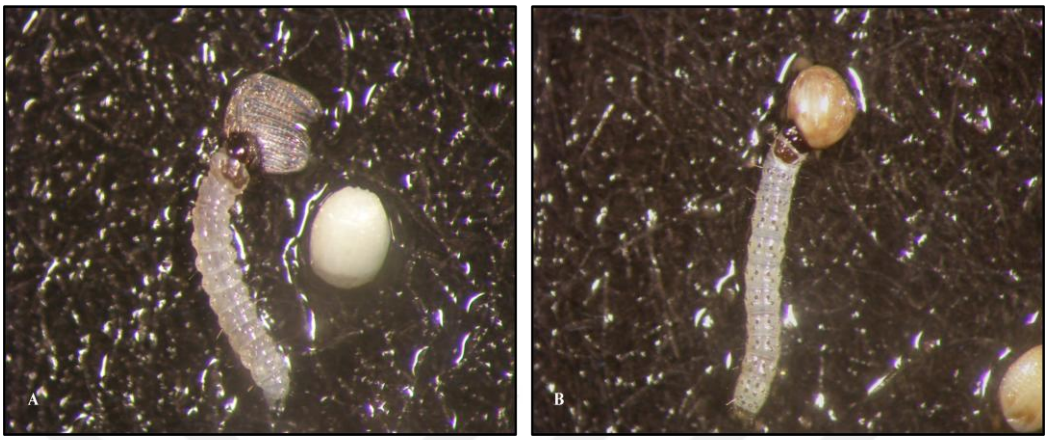
Bu çalışmada, yeşil kurdun larva dönemi sayısı, larva kafa kapsülleri ölçülerek ve deri değiştirme sayılarına göre toplamda 6 larva dönemine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Yeşil kurt larvalarının morfolojik özellikleri incelendiğinde, I. larva döneminin genel görünümü, kirli soluk beyaz-sarımsı renkte ve vücudun tamamı uzun siyah kıllarla kaplıdır. Vücut üzerinde bulunan kılların çıkış yerleri koyu kahverengi-siyah olup belirgindir. Larvaların baş kısmı oldukça belirgin ve koyu kahverengi-siyahtır. Ağız parçaları koyu kahverengidir. Pronotumda dorsal olarak dağılan kahverengimsi-siyah lekeler bulunur. Thoraks bacakları kahverengidir (Şekil 4.2A). II. larva döneminin genel görünüşü I. larva dönemine benzerdir. Vücut açık kahverengidir ve baş kısmı vücuda göre daha koyudur. Larvaların dorsalinde uzunlamasına kahverengi çizgiler dikkat çekmektedir. Kılların çıkış noktası olan yerler daha belirgindir (Şekil 4.2B). III. dönemde baş açık kahverengidir ve epicranial suture kısmında küçük noktasal lekeler bulunur. Siyah noktalar üzerinden çıkan kıllar daha uzun hal almıştır. Dorsalde kahverengi bantlar bulunmakta, yanlarda da açık sarımsı uzunlamasına bir bant görülmektedir (Şekil 4.2C). IV. dönem larvada vücut kahverengi ve açık kahverengi çizgilere sahiptir. Aynı zamanda dördüncü dönem larvanın üçüncü döneme göre daha koyu kahverengine sahip olduğu görülmüştür. Thoraks bacaklarının tamamı siyahtır. Anal plate koyu kahverengindedir ve burada açık kahverengi lekeler bulunmaktadır (Şekil 4.2D). V. dönemde thoraks bacakları koyu kahverengi, abdomen bacakları ise açık kahverengindedir. Bu dönemde larva vücudunun dorsalinde yeşil, kahverengi ve sarımsı bantlar görülmektedir. Thoraks bacakları açık kahverengindedir (Şekil 4.2E). VI. dönemde ise vücudun genel rengi kahverengimsi, sarımsı-yeşilimsi veya turuncudur. Thoraks ve abdomen bacakları açık yeşildir. Vücudun sağ ve sol kısımlarında abdomen sonuna kadar uzanan açık renkte iki uzun bant bulunmaktadır. Ayrıca, dorsalde bütün vücut boyunca uzanan üçüncü ayrı bir uzun bant da bulunmaktadır. Başın genel görünüşü açık kahverengidir. Prothoraks üzerinde açık kahverengi leke bulunur. Bu dönemde vücutta bulunan kıllar uzundur (Şekil 4.2F).



Şekil 4.2. Yeşil kurdun larva dönemleri A) I. larva dönemi, B) II. larva dönemi, C) III. larva dönemi, D) IV. larva dönemi, E) V. larva dönemi, F) VI. larva dönemi

Ayrıca yumurtadan yeni çıkan I. dönem larvanın, yumurtanın dış kısmında bulunan yumurta kabuğu ve açılmamış diğer yumurtalar ile de beslendiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. I. dönem larva A) açılan yumurta kabuğu ve B) açılmamış yumurta ile beslenmesi

Yeşil kurdun kafa kapsülünün I. larva döneminde 0,25±0,05 mm eninde ve 0,24±0,04 mm boyunda, II. larva döneminde 0,42±0,02 mm eninde ve 0,45±0,05 mm boyunda, III. larva döneminde 1,00±0,12 mm eninde ve 1,03±0,13 mm boyunda, IV. larva döneminde 1,48±0,13 mm eninde ve 1,60±0,20 mm boyunda, V. larva döneminde 1,85±0,10 mm eninde ve 1,97±0,05 mm boyunda, VI. larva döneminde ise 3,06±0,40 mm eninde ve 2,84±0,44 mm boyunda olduğu belirlenmiştir (n=14) (Çizelge 4.1).

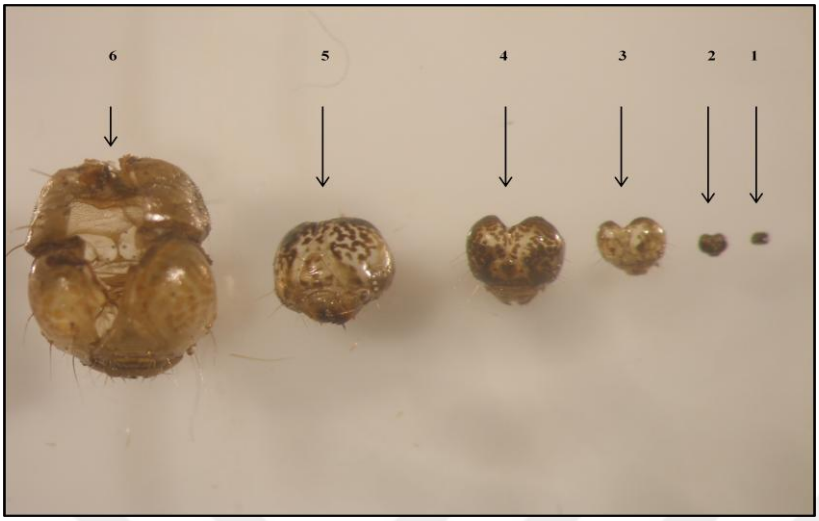
Çizelge 4.1. Yeşil kurdun larva dönemlerine ait kafa kapsülü eni ve boyu (Ort±SH, n=14)

Larva Dönemleri	Kafa Kapsülü Eni (mm)	Kafa Kapsülü Boyu (mm)
I. dönem	0,25±0,05 A	0,24±0,04 A
II. dönem	0,42±0,02 B	0,45±0,05 B
III. dönem	1,00±0,12 C	1,03±0,13 C
IV. dönem	1,48±0,13 D	1,60±0,20 D
V. dönem	1,85±0,10 E	1,97±0,05 E
VI. dönem	3,06±0,40 F	2,84±0,44 F

Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P≤0,05).

SH: standart hata

Yeşil kurdun larva dönemlerine ait kafa kapsülü eni ve boyu mikroskop altında ölçülerek kayıt edilmiş ve fotoğraflanmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Yeşil kurdun larva dönemlerinin kafa kapsülleri

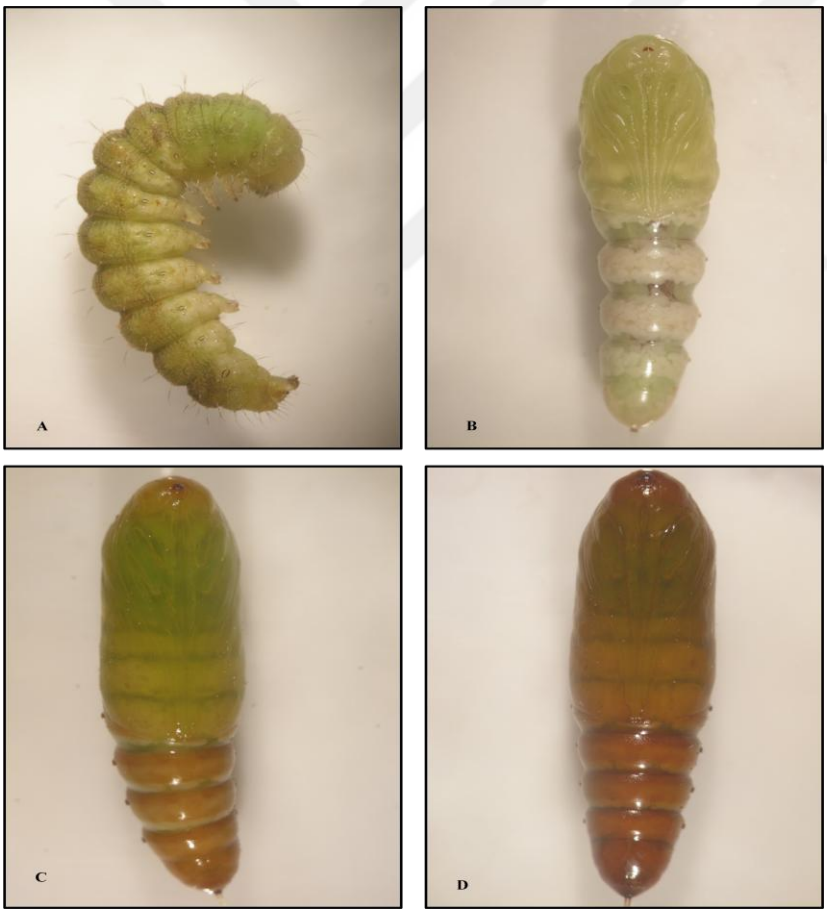
Yeşil kurt larvalarının gelişme dönemlerine ait en, boy, ağırlık ve larva gelişme süresi gibi biyolojik parametreleri belirlenmiştir. Buna göre, I. dönem larvanın 0,26±0,04 mm eninde, 1,84±0,12 mm boyunda ve 0,10±0,00 mg ağırlıkta; II. dönem larvanın 0,52±0,07 mm eninde, 4,07±0,27 mm boyunda ve 1,03±0,19 mg ağırlıkta; III. dönem larvanın 1,72±0,11 mm eninde, 8,71±0,53 mm boyunda ve 4,67±2,71 mg ağırlıkta; IV. dönem larvanın 1,97±0,07 mm eninde, 11,12±0,60 mm boyunda ve 35,13±12,41 mg ağırlıkta; V. dönem larvanın 2,97±0,20 mm eninde, 19,63±2,24 mm boyunda ve 390,77±46,37 mg ağırlıkta; VI. dönem larvanın ise 3,31±0,42 mm eninde, 26,88±3,06 mm boyunda ve 489,79±26,89 mg ağırlıkta olduğu tespit edilmiştir. Yeşil kurdun larva gelişme süresinin ise 18,2±0,83 gün olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Yeşil kurdun larva gelişme dönemlerindeki eni, boyu, ağırlığı ve gelişme süreleri (Ort±SH, n=14)

Larva Dönemleri	Eni (mm)	Boyu (mm)	Ağırlığı (mg)	Larva Gelişme Süresi (Gün)
I. dönem	0,26±0,04	1,84±0,12	0,10±0,00	2,23±0,42
II. dönem	0,52±0,07	4,07±0,27	1,03±0,19	3,07±1,15
III. dönem	1,72±0,11	8,71±0,53	4,67±2,71	3,10±0,73
IV. dönem	1,97±0,07	11,12±0,60	35,13±12,41	3,22±0,63
V. dönem	2,97±0,20	19,63±2,24	390,77±46,37	3,81±0,91
VI. dönem	3,31±0,42	26,88±3,06	489,79±26,89	4,30±1,05

4.1.3. Pupa Dönemi

Yeşil kurdun olgun larvasının bulunduğu yerde prepupa dönemine girdiği belirlenmiştir. Bu dönemde larva yarı uyuşuk dönemdedir. Olgun larvanın rengi daha soluktur ve larva boyu kısalarak segmentler boğum şeklini almaktadır (Şekil 4.5A). Larvaların prepupa gelişme süresinin 2,33±1,03 gün olduğu tespit edilmiştir. Olgun larva kum içine girerek baş kısmından pupa oluşumuna başlamaktadır. Yeni oluşan pupa açık sarımsı yeşil renktedir ve her bir segment belirgindir (Şekil 4.5B). Pupalara ventralden bakıldığında, hypopharynx, labial palpus, ergine ait anten izleri, hortum ve kanatlar belirgin olarak görülmektedir. Bununla birlikte, pupaların son segmentinde iki adet birbirine paralel uzanan cremaster net bir şekilde görülmektedir. Pupa gelişme süresinin ilerlemesi ile birlikte pupaların yeşilimsi-kahverengiye dönüştüğü belirlenmiştir (Şekil 4.5C ve D).



Şekil 4.5. Yeşil kurdun prepupa ve pupa dönemi A) pre pupa, B) yeni oluşan pupa, C) bir saat yaşında pupa, D) üç saat yaşında pupa görünümü

Pupaların morfolojik özellikleri incelendiğinde, yeşil kurdun cremaster ve anal açıklık da dahil olmak üzere toplamda 10 abdominal segmentten oluştuğu, abdomenlerinin 10. segmentindeki anal açıklığın dişi ve erkek bireyde aynı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.6A). Cinsiyet ayrımının yapılmasında, pupaların abdomenlerinin 8. ve 9. segmentteki farklılıklar göz önünde bulundurulmuştur. Buna göre, dişi bireylerde genital açıklığın tüberkül arasında ve 8. abdominal segmentin ortasında uzunlamasına bir dikiş şeklinde bulunduğu belirlenmiştir. Erkek bireylerde ise bu dikişin 9. abdominal segmentinin ortasında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.6B) (n=50).



Şekil 4.6. Yeşil kurdun pupalarının cinsiyetleri (A ve B)

Yeşil kurdun pupalarına ait en, boy ve ağırlık verileri cinsiyetlerine göre ayrılarak not edilmiştir. Dişi bireye ait pupanın en, boy ve ağırlık ortalamaları sırasıyla 5,62±0,17 mm, 18,63±0,87 mm ve 321,19±26,59 mg olarak, erkek bireye ait pupanın ise 5,32±0,26 mm, 17,98±0,74 mm ve 267,77±33,11 mg olarak tespit edilmiştir.

Pupaların gelişme süresi 24±1˚C'de, %65 oransal nemde ve 16:8 fotoperiyotta 9,31±0,79 gün olarak belirlenmiştir. Pupaların açılma oranının ise %88,4 olduğu tespit edilmiştir.

4.1.4. Ergin Dönemi

Yeşil kurt dişi ve erkek bireylerin ergin ömürleri, ovipozisyon süreleri ve bir dişinin bıraktığı yumurta sayısı belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Deneme sonuçlarına göre, dişi bireyin ortalama ömrünün 24±1˚C'de, %65 oransal nemde ve 16:8 fotoperiyotta 23±3,05 gün ve erkek bireyin ortalama ömrünün 20,8±5,78 gün olduğu belirlenmiştir. Dişi bireyin en uzun

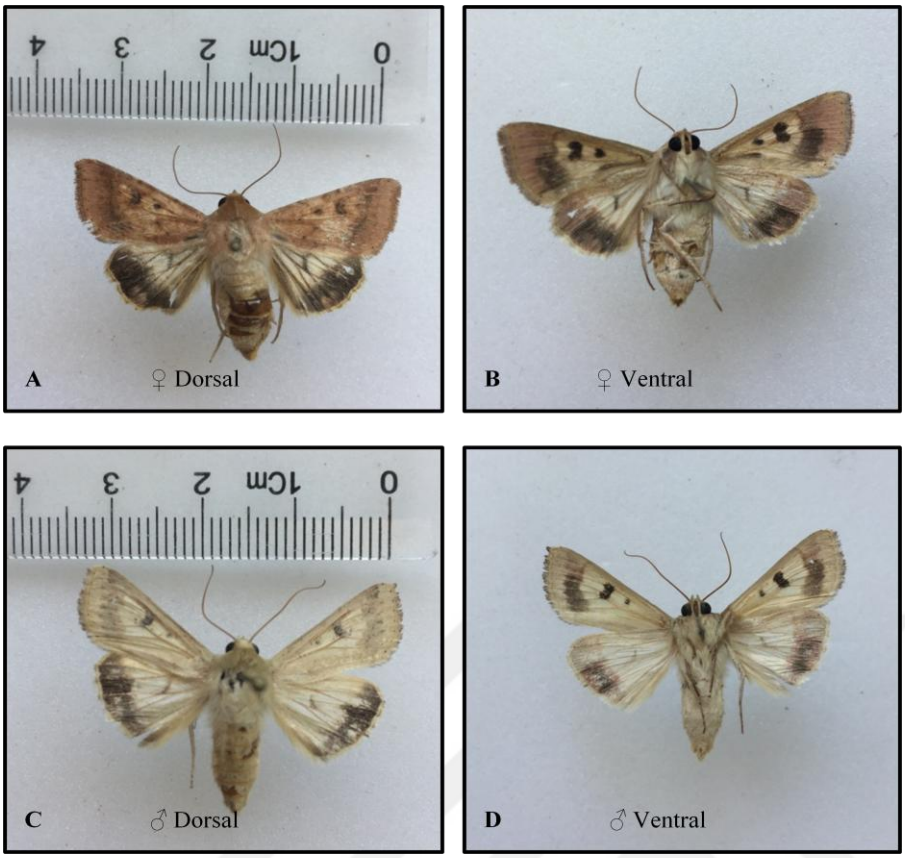
ömrü 28 gün, en kısa 19 gün, erkek bireyin ise en uzun ömrü 27 gün, en kısa 10 gün olduğu gözlemlenmiştir. Dişi bireyin ovipozisyon süreleri incelendiğinde, preovipozisyon süresinin ortalama 2,8±1,03 gün, ovipozisyon süresinin 12,6±2,45 gün ve post ovipozisyon süresinin ise 6,7±2,31 gün olduğu belirlenmiştir. En uzun preovipozisyon süresinin 4 gün, en kısa ise 1 gün olduğu saptanmıştır. Ovipozisyon süresinin en uzun 15 gün, en kısa 8 gün olduğu ve post ovipozisyon süresinin ise en uzun 10 gün, en kısa 4 gün olduğu saptanarak not edilmiştir. Bir dişinin bıraktığı yumurta sayısı ise ortalama 1096,3±105,56 adet olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.3. Yeşil kurt bir dişi erginin bıraktığı yumurta sayısı (adet), ovipozisyon süreleri (gün) ve ergin ömürleri (gün) (Ort±SH, n=10)

Tekerrür	Bir dişinin bıraktığı yumurta sayısı (adet)	Ovipozisyon süreleri (gün)			Ergin ömürleri (gün)	
		Preovipozisyon	Ovipozisyon	Post ovipozisyon	♀ birey	♂ birey
1	1341	4	13	5	23	10
2	1068	3	14	10	28	19
3	1200	3	14	4	21	27
4	1032	2	11	7	21	22
5	1027	2	14	10	27	25
6	1006	1	9	9	19	12
7	1073	4	15	4	24	22
8	994	4	13	6	24	25
9	1098	3	15	5	24	20
10	1124	2	8	7	19	26
Ort±SH	1096,3±105,56	2,8±1,03	12,6±2,45	6,7±2,31	23±3,05	20,8±5,78

Yeşil kurt ergin bireylerinin dişi kanat açıklığı ortalama 34,5±0,57 mm ve erkek kanat açıklığı ise ortalama 32,62±1,76 mm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7). Dişi ergin bireyin eni ortalama 6,37±0,47 mm ve başın ucundan abdomen sonuna kadar olan vücut uzunluğu ise ortalama 18±1,41 mm olarak ölçülmüştür. Erkek ergin bireyde ise vücut eni ortalama 5,37±0,44 mm ve ergin boyu ortalama 17,81±0,65 mm olduğu belirlenmiştir (n=25).

Yeşil kurt ergin bireylerinde başın üzeri bejimsi-kahverengimsi tüyler ile kaplı olup, antenler ip şeklindedir. Thoraksın üzeri açık kahverengimsi uzun tüyler ile örtülüdür. Üst kanatlarda iki adet böbrek şeklinde leke bulunur. Kanatların alt kısmı saçaklıdır ve kızılımsı kahverengimsi bir renge sahiptir. Alt kanatların damar araları belirgindir ve koyu bej rengindedir. Ayrıca, dişi erginlerin abdomen sonu erkek erginlere göre daha kalın sonlanmakta ve dişilerde abdomenin uç kısmında tüyler daha azken, erkeklerde ise bu tüylerin uzun saçak şeklinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Yeşil kurt erginlerinin dorsal ve ventralden görünümü; A) dişi bireyin dorsal görünümü, B) dişi bireyin ventral görünümü, C) erkek bireyin dorsal görünümü, D) erkek bireyin ventral görünümü

4.2. Yeşil Kurdun Yapay Diyet Ortamlarında Yetiştirilmesi

Yeşil kurt larvalarının yapay diyet üzerinde laboratuvarda yetiştirilmesi ve adaptasyonuna yönelik 6 farklı yapay diyet hazırlanarak test edilmiştir.

Çalışmada, yeşil kurt larvalarının yapay diyet I, III ve VI'da başarılı bir şekilde 5 larva dönemi geçirdiği, yapay diyet II ve V'de 6 larva dönemi geçirdiği belirlenmiştir. Yapay diyet IV'de ise yeşil kurt larvalarının sadece 3. döneme kadar yaşadıkları gözlemlenmiştir.

Yapay diyetler ve domates üzerinde yetiştirilen yeşil kurdun larva ve pupa gelişme süresi, pre-pupa gelişme süresi, pupa olma ve ergin çıkış oranı, pupa en, boy ve ağırlık değerleri Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

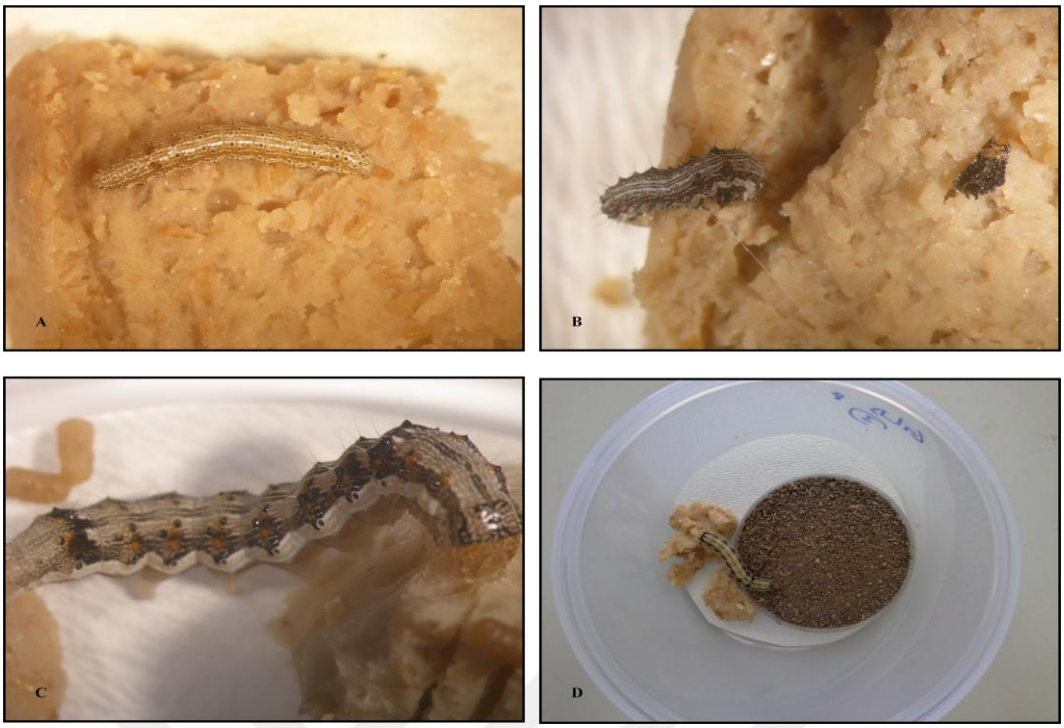
Çizelge 4.4. Yapay diyetler ve doğal konukçu üzerinde yetiştirilen yeşil kurdun biyolojik parametreleri (Ort±SH, n=30)

Parametreler	**Diyet Çeşitleri**					
	Diyet I	**Diyet II**	**Diyet III**	**Diyet V**	**Diyet VI**	**Kontrol (domates)**
Larva süresi (gün)	11,6 ± 1,5 e	16,6 ± 1,4 d	25,1 ± 0,9 a	25,5 ± 3,2 a	22,1 ± 1,7 b	18,2 ± 0,8 c
Pupa süresi (gün)	9,1 ± 0,5 c	10,1 ± 1,6 c	31,2 ± 4,2 a	29,5 ± 4,8 a	19,9 ± 4,1 b	9,3 ± 0,4 c
Pre-pupa süresi (gün)	2,1 ± 0,3 b	2,2 ± 0,7 b	3,3 ± 0,5 a	3,4 ± 0,7 a	3,5 ± 0,9 a	2,3 ± 1,1 b
Pupa olma oranı (%)	76,6 ± 2,1 c	80,1 ± 1,1 b	76,6 ± 1,5 c	83,3 ± 1,5 b	83,3 ± 2,8 b	90,1 ± 1,1 a
Ergin çıkış oranı (%)	85,9 ± 2,7 a	86,2 ± 5,4 a	73,3 ± 2,8 b	66,6 ± 1,2 c	83,3 ± 2,8 a	88,4 ± 11,1 a
Pupa ağırlığı (g)	0,33 ± 0,04 b	0,31 ± 0,03 ab	0,26 ± 0,04 c	0,35 ± 0,08 ab	0,34 ± 0,04 ab	0,36 ± 0,05 a
Pupa eni (mm)	5,72 ± 0,21 ab	5,62 ± 0,27 b	5,5 ± 0,34 b	5,85 ± 0,44 ab	5,77 ± 0,31 ab	6,05 ± 0,3 a
Pupa boyu (mm)	19,45 ± 1,02 ab	19,2 ± 1,12 ab	18,8 ± 1,29 b	18,62 ± 1,34 b	18,97 ± 1,35 b	19,97 ± 0,58 a

* Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P≤0,05).

* SH: standart hata

Deneme sonuçlarına göre, yeşil kurt larvaları yapay diyet I'de beş larva dönemi geçirerek gelişmesini başarılı bir şekilde tamamlamıştır (Şekil 4.8). Bu diyette larva gelişme süresinin ortalama 11,6±1,5 gün, pupa gelişme süresinin 9,1±0,5 gün ve pre-pupa süresinin ise 2,1±0,3 gün olduğu tespit edilmiştir. Pupa eni ortalama 5,72±0,21 mm, boyu 19,45±1,02 mm ve ağırlığı ise 0,33±0,04 g olarak hesaplanmıştır. Pupa olma oranı %76,6±2,1 ve ergin çıkış oranı %85,9±2,7 olarak ve belirlenmiştir. Açılan ergin sayısının ise 21 (11♀:10♂) olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.4).



Şekil 4.8. Yeşil kurdun yapay diyet I'de beslenmesi; A) II. dönem larva, B) III. dönem larva, C) IV. dönem larva, D) olgun larvanın kuma girmesi

Test edilen yapay diyet II'de larvaların 6 larva dönemi geçirdiği tespit edilmiştir. Diyet II'de yeşil kurt larvalarının biyolojik parametreleri incelendiğinde ise, larva gelişme süresi ortalama 16,6±1,4 gün, pupa gelişme süresi 10,1±1,6 gün ve pre-pupa süresi ise 2,2±0,7 gün olarak belirlenmiştir. Pupa eninin ortalama 5,62±0,27 mm, boyunun 19,2±1,12 mm ve ağırlığının ise 0,31±0,03 g olduğu tespit edilmiştir. Pupa olma oranının %80,1±1,1 ve ergin çıkış oranının %86,2±5,4 olduğu hesaplanmıştır. Açılan ergin sayısı 21 (11♀:10♂) olarak not edilmiştir (Çizelge 4.4) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Yeşil kurdun yapay diyet II'de beslenmesi; A) IV. dönem larva, B) V. dönem larva, C) diyette kafa kapsülü ile birlikte bulunan pupa

Yapay diyet III'de larva gelişme süresinin ortalama 11,6±1,5 gün, pupa gelişme süresinin 9,1±0,5 gün ve pre-pupa süresinin ise 2,1±0,3 gün olduğu saptanmıştır. Pupa eni ortalama 5,72±0,21 mm, boyu 19,45±1,02 mm ve ağırlığı ise 0,33±0,04 g olarak belirlenmiştir. Pupa olma oranının %76,6±1,5 ve ergin çıkış oranının ise %85,9±2,7 olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4).

Yapay diyet V'de larva gelişme süresinin ortalama 25,5±3,2 gün, pupa gelişme süresinin 29,5±4,8 gün ve pre-pupa süresinin ise 3,4±0,7 gün olduğu tespit edilmiştir. Pupa eninin ortalama 5,85±0,44 mm, boyunun 18,62±1,34 mm ve ağırlığının ise 0,35±0,08 g olduğu saptanmıştır. Pupa olma oranı %83,3±1,5 ve ergin çıkış oranı ise %66,6±1,2 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Yapay diyet VI'da larva gelişme süresinin ortalama 22,1±1,7 gün, pupa gelişme süresinin 19,9±4,1 gün ve pre-pupa süresinin ise 3,5±0,9 gün olduğu belirlenmiştir. Pupa eni ortalama 5,77±0,31 mm, boyu 18,97±1,35 mm ve ağırlığı ise 0,34±0,04 g olarak ölçülmüştür. Pupa olma oranının %83,3±2,8 ve ergin çıkış oranının ise %83,3±2,8 olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.4).

Pozitif kontrol olan domates meyvesinde beslenen larvaların gelişme süresinin ortalama 18,2±0,8 gün, pupa gelişme süresinin 9,3±0,4 gün ve pre-pupa süresinin ise 2,3±1,1 gün olduğu tespit edilmiştir. Pupa eninin ortalama 6,05±0,3 mm, boyunun 19,97±0,58 mm ve ağırlığının 0,36±0,05 g olduğu belirlenmiştir. Pupa olma oranı %90,1±1,1 ve ergin çıkış oranı %88,4±11,1 olarak hesap edilmiştir (Çizelge 4.4).

Yapılan istatistik analiz sonucunda elde edilen verilere göre, test edilen yapay diyetlerin larva gelişme sürelerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır (F= 6,11, df=89, P=0,000). Yapay diyet I ve II'de larva gelişme süresinin kontrole göre kısa olduğu belirlenmiştir. Pupa gelişme süresinin yapay diyet I, II ve kontrolde etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür (F= 9,22, df=89, P=0,000). Yapay diyet I ve II'deki yeşil kurt bireylerinin diğer yapay diyetlere göre daha kısa prepupa süresine sahip olduğu tespit edilmiştir. Yine yapay diyet I ve II'nin ergin çıkış oranının kontrolle aynı oranda olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4'te belirtildiği üzere, pupa ağırlığının kontrolden sonra en yüksek değere sahip olduğu yapay diyet II, V ve VI iken, yapay diyet III'de bu değerin en düşük olduğu görülmüştür. Farklı yapay diyetlerin pupa ağırlığına etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir (F= 13,56, df=179, P=0,000). Yapay diyet II ve III'te pupa eninin kontrol ve diğer yapay diyetlere oranla daha küçük olduğu tespit edilmiş olup, test edilen yapay diyetlerin pupa enine etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır (F=

4,05, df=179, P=0,003). Farklı yapay diyetlerin pupa boylarına etkisinin ise istatistik olarak önemli olmadığı belirlenmiştir (F= 2,16, df=179, P=0,069).

Yeşil kurdun farklı yapay diyetlerde larva dönemlerine ait kafa kapsülleri ölçülerek kayıt edilmiş ve yapay diyette deri değiştirme sayısı baz alınarak larva dönemi sayısı ortaya konmuştur (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Yapay diyetlerde ve domateste yetiştirilen yeşil kurt larvalarının kafa kapsülü çapı ölçümleri (Ort±SH, n=15)

Larva dönemleri	**Diyet Tipleri**					
	Diyet I	**Diyet II**	**Diyet III**	**Diyet V**	**Diyet VI**	**Kontrol (domates)**
I. dönem	0,26±0,03 Aab	0,28±0,04 Aab	0,30±0,01 Aa	0,29±0,01 Aa	0,29±0,01 Aa	0,25±0,05 Ab
II. dönem	0,45±0,04 Bbc	0,41±0,03 Bd	0,47±0,03 Bab	0,47±0,03 Bab	0,50±0,01 Ba	0,42±0,02 Acd
III. dönem	0,85±0,05 Cbc	0,77±0,06 Cc	0,82±0,04 Cbc	0,80±0,12 Cbc	0,88±0,03 Cb	1,00±0,12 Ba
IV. dönem	1,52±0,04 Dab	1,63±0,08 Da	1,47±0,08 Db	1,37±0,16 Dc	1,56±0,06 Dab	1,48±0,13 Db
V. dönem	2,96±0,32 Eb	1,85±0,08 Ec	3,13±0,23 Eab	1,81±0,07 Ec	3,27±0,19 Ea	1,85±0,10 Dc
VI. dönem	-	2,82±0,20 Fb	-	3,48±0,12 Fa	-	3,06±0,40 Eb

* Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P≤0,05).

* Aynı sütunda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P≤0,05).

Yapay diyet I'de kafa kapsülü çapının ortalamasının sırasıyla, I. larva döneminde 0,26±0,03 mm, II. larva döneminde 0,45±0,04 mm, III. larva döneminde 0,85±0,05 mm, IV. larva döneminde 1,52±0,04 mm, V. larva döneminde ise 2,96±0,32 mm olduğu tespit edilmiş ve bu yapay diyette larvaların beş larva dönemi geçirdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

Yapay diyet II'de kafa kapsülü çapının ortalaması sırasıyla, I. larva döneminde 0,28±0,04 mm, II. larva döneminde 0,41±0,03 mm, III. larva döneminde 0,77±0,06 mm, IV. larva döneminde 1,63±0,08 mm, V. larva döneminde 1,85±0,08 mm ve VI. larva döneminde ise 2,82±0,20 mm olarak ölçülmüştür. Larvaların altı larva dönemine sahip olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.5).

Yapay diyet III'de kafa kapsülü çapının ortalaması sırasıyla, I. larva döneminde 0,30±0,01 mm, II. larva döneminde 0,47±0,03 mm, III. larva döneminde 0,82±0,04 mm, IV. larva döneminde 1,47±0,08 mm ve V. larva döneminde ise 3,13±0,23 mm olduğu saptanmış ve larvalar beş dönem geçirmiştir (Çizelge 4.5).

Yapay diyet V'de kafa kapsülü çapının ortalaması sırasıyla, I. larva döneminde 0,29±0,01 mm, II. larva döneminde 0,47±0,03 mm, III. larva döneminde 0,80±0,12 mm,

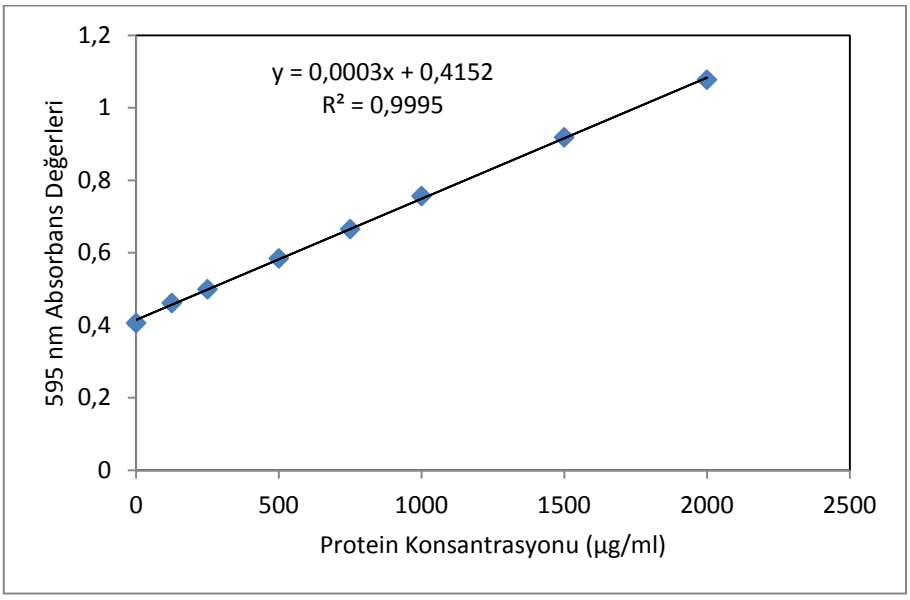
IV. larva döneminde 1,37±0,16 mm, V. larva döneminde 1,81±0,07 mm ve VI. larva döneminde 3,48±0,12 mm olarak belirlenmiştir. Bu diyette larvaların altı dönem geçirdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).

Yapay diyet VI'da kafa kapsülü çapı ortalaması sırasıyla, I. larva döneminde 0,29±0,01 mm, II. larva döneminde 0,50±0,01 mm, III. larva döneminde 0,88±0,03 mm, IV. larva döneminde 1,56±0,06 mm ve V. larva döneminde 3,27±0,19 mm tespit edilmiş olup, larvaların beş larva dönemi geçirdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

Pozitif kontrol olan domates meyvesi üzerinde beslenen larvaların kafa kapsülleri çapının ise, I. larva döneminde 0,25±0,05 mm, II. larva döneminde 0,42±0,02 mm, III. larva döneminde 1,00±0,12 mm, IV. larva döneminde 1,48±0,13 mm, V. larva döneminde 1,85±0,10 mm ve VI. larva döneminde ise 3,06±0,40 mm olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda, larva biyolojik dönemlerinin kafa kapsülü çapına etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($P<0,05$).

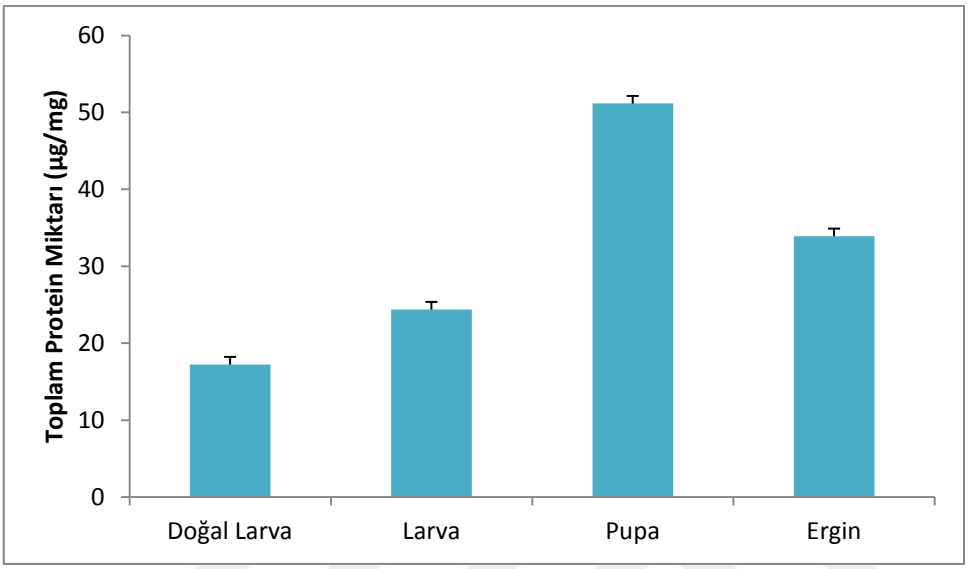
4.3. Yeşil Kurt Bireylerinin Protein İçeriklerinin Belirlenmesi

Yeşil kurdun doğadan toplanan olgun larva, laboratuvarda domates üzerinde yetiştirilen olgun larva, pupa, ergin bireyleri ile laboratuvarda farklı yapay diyetler üzerinde yetiştirilen ergin bireylerinin toplam protein miktarları araştırılmıştır. Örneklerin konsantrasyonları BSA standart aracılığıyla kalibrasyon eğrisi grafiği oluşturularak hesaplanmıştır (Şekil 4.10). Elde edilen protein miktarları µg/ml cinsinden µg/mg olarak çevrilerek not edilmiştir.



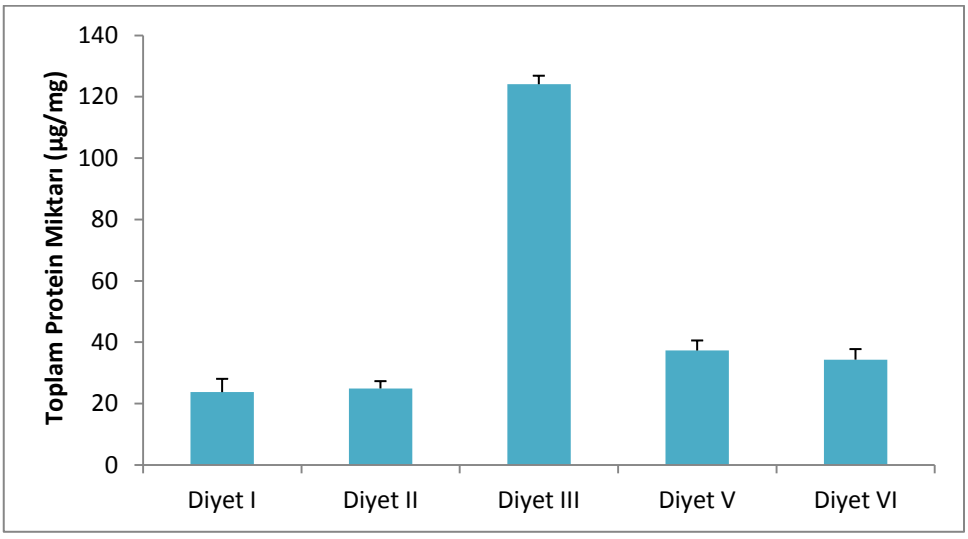
Şekil 4.10. 595 nm dalga boyundaki BSA protein standart eğrisi

Yapılan hesaplamalar sonrasında yeşil kurt bireylerinin doğal popülasyonundan elde edilen olgun larvalarda ortalama 17,22±2,16 µg/mg protein içeriği, laboratuvar kolonisi olgun larvalarında ortalama 24,37±2,63 µg/mg protein içeriği, pupalarında ortalama 51,14±2,66 µg/mg protein içeriği ve erginlerinde ise ortalama 33,91±4,86 µg/mg protein içeriği tespit edilmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Farklı biyolojik dönemlerdeki yeşil kurdun protein miktarları

Farklı diyetlerde beslenen yeşil kurt erginlerinin toplam protein miktarları sırasıyla diyet I'de ortalama 23,72±4,33 µg/mg protein, diyet II'de ortalama 24,92±2,39 µg/mg protein, diyet III'de ortalama 124,07±2,77 µg/mg protein, diyet V'de ortalama 37,29±3,27 µg/mg protein ve diyet VI'da ise ortalama 34,32±3,44 µg/mg protein olarak belirlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Farklı yapay diyet üzerinde beslenen yeşil kurt erginlerinin protein içerikleri

4.4. Yeşil Kurdun Moleküler Çeşitliliğinin Belirlenmesi

4.4.1. Yeşil Kurt DNA Miktarı ve Konsantrasyonu Ölçümleri

Denemede, yeşil kurt bireylerinin DNA miktarı ve saflığı belirlenmiştir. Larva ve ergin dokulardan izole edilen DNA miktarlarının 12,4 ng/µl ile 74,0 ng/µl arasında değiştiği belirlenmiştir. DNA konsantrasyonun 1,61 ile 2,07 arasında olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. *H. armigera* örneklerinin gDNA miktarı ve konsantrasyonu

	Örnekleme yeri	**Biyolojik dönem**	**Ağırlık (mg)**	**ng/µL***	**A_{260}/A_{280}***
Biga	Örtülüce-1	Larva	22,3	37,5	1,89
	Örtülüce-2	Larva	26,5	28,7	1,96
	Örtülüce-3	Larva	44,6	45,4	1,68
Ayvacık	Ayvacık-1	Larva	22,6	29,7	1,67
	Ayvacık-2	Larva	16,0	19,4	1,96
	Ayvacık-3	Larva	17,0	46,6	1,67
	Kösedere-1	Larva	22,7	38,7	1,90
	Kösedere-2	Larva	24,6	35,1	1,84
	Kösedere-3	Larva	21,7	35,2	1,92
Ezine	Çamoba-1	Larva	26,3	62,8	2,02
	Çamoba-2	Larva	21,2	24,7	2,03
	Çamoba-3	Larva	25,7	31,2	1,93
	Yenioba-1	Larva	36,9	23,9	1,70
	Yenioba-2	Larva	17,4	17,0	1,88
Çanakkale (Merkez)	Dümrek-1	Ergin	24,0	24,8	1,88
	Dümrek-2	Ergin	21,2	16,6	1,86
	Dümrek-3	Ergin	14,4	27,9	1,61
	Tevfikiye-1	Larva	13,9	74,0	1,61
	Tevfikiye-2	Larva	16,6	25,2	2,02
	Tevfikiye-3	Larva	24,5	32,2	1,85
	Batakovası-1	Larva	16,1	41,9	1,84
	Batakovası-2	Larva	27,6	44,0	1,85
	Batakovası-3	Larva	26,6	34,0	2,00
Bayramiç	Nebiler-1	Larva	5,6	57,7	2,00
	Nebiler-2	Larva	10,1	14,4	2,07
	Nebiler-3	Larva	15,2	14,4	1,97
Geyikli	Geyikli-1	Ergin	19,5	39,2	1,94
	Geyikli-2	Ergin	20,8	61,8	1,92
	Geyikli-3	Ergin	21,1	37,2	1,84
Eceabat	Bigalı-1	Larva	24,4	30,1	2,01
	Bigalı-2	Larva	34,6	34,7	1,92
	Bigalı-3	Larva	32,2	27,5	1,91
Bozcaada	Bozcaada-1	Larva	14,5	12,4	1,66
	Bozcaada-2	Larva	14,7	26,0	1,83
	Bozcaada-3	Larva	15,6	15,8	1,75
Lapseki	Umurbey-1	Larva	12,9	22,1	1,76
	Umurbey-2	Larva	17,6	21,4	1,96
	Umurbey-3	Larva	16,3	25,3	2,02

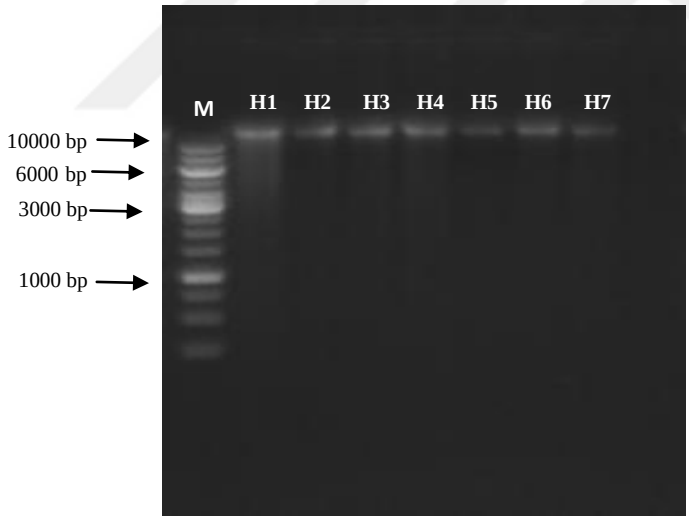
Çizelge 4.6.'nın devamı

Gökçeada	Eşelek-1	Larva	38,2	63,6	1,97
	Eşelek-2	Larva	17,3	19,6	1,73
	Eşelek-3	Larva	25,1	43,1	1,80
Bursa	Orhaneli-1	Larva	13,0	40,7	2,03
	Orhaneli-2	Larva	14,7	41,2	1,98
Balıkesir	İvrindi-1	Larva	23,6	20,4	1,81
	İvrindi-2	Larva	26,4	29,5	1,82

* 1 µl'deki ng cinsinden DNA miktarı

** Nanodropta 260/280 nm'de okunan DNA'nın saflık derecesi

Yeşil kurdun gDNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü Şekil 4.13'te verilmiştir. Burada, yalnızca 3 lokasyondan elde edilen örneklerin jel görüntüleri gösterilmiş olup, diğer lokasyonlarda da aynı şekilde bant desenleri elde edilmiştir. Elektroforez uygulamalarında ilk kuyucuğa 1 kb markır yüklenilmiş olup, yeşil kurt gDNA'ları markırın yanında bulunan diğer kuyucuklara yüklenmiştir. Yeşil kurt gDNA bant deseni analizi yapılan toplam 45 örnekte pozitif olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.13).

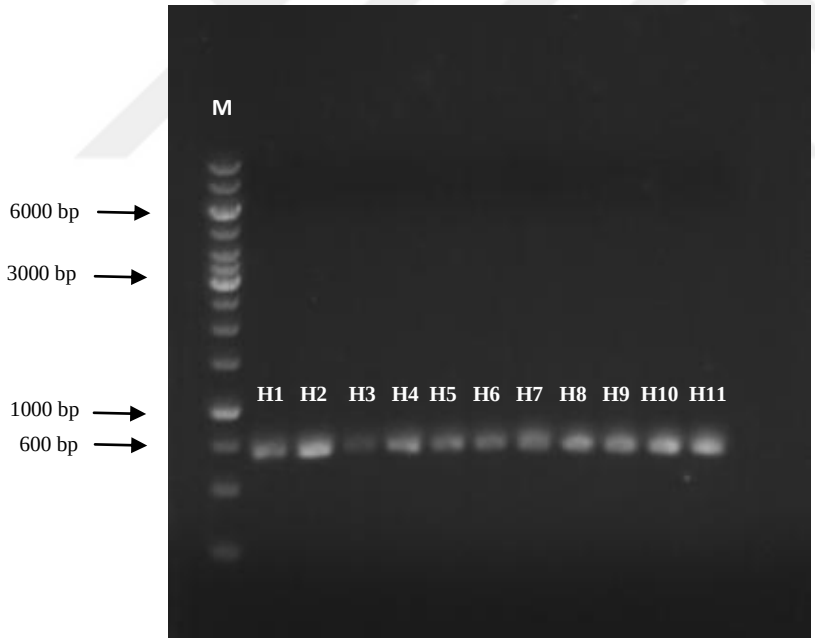


Şekil 4.13. Farklı lokasyonlardan izole edilen yeşil kurt gDNA örneklerinin %0,7'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü (M: markır; 1-kb DNA ladder, Fermentas, H1: Eşelek/Gökçeada, H2: Eşelek/Gökçeada, H3: Eşelek/Gökçeada, H4: Umurbey/Lapseki, H5: Umurbey/Lapseki, H6: Umurbey/Lapseki, H7: İvrindi/Balıkesir)

4.4.2. Yeşil Kurt mtDNA COI Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyonları ve Dizi Analizleri

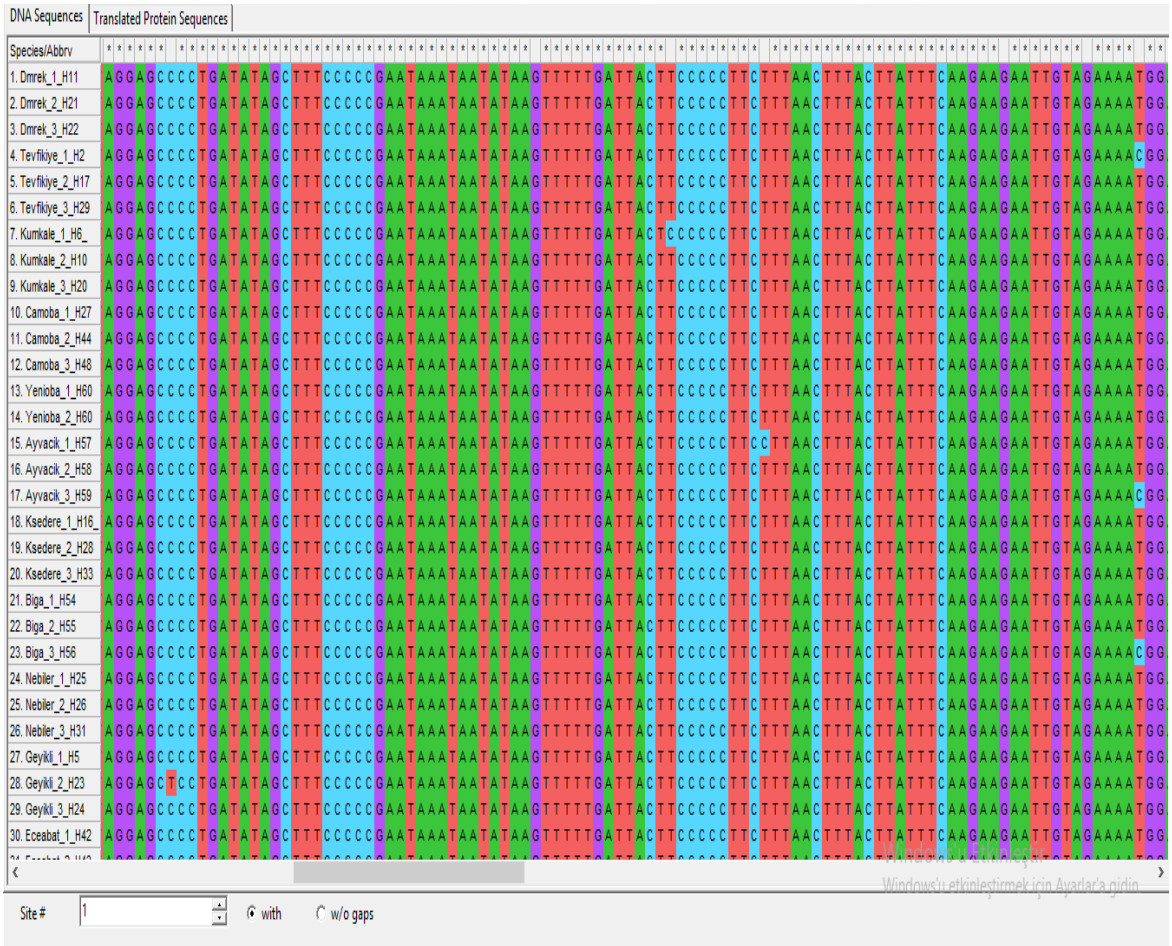
Yeşil kurdun mtDNA COI gen bölgesinin PCR amplifikasyon sonuçları Şekil 4.14'te verilmiştir. Burada, sadece 11 lokasyondan elde edilen örneklerin jel elektroforez görüntüleri gösterilmiş olup, diğer lokasyonlardan da aynı şekilde bantlar elde edilmiştir.

Çalışmada, Çanakkale ve çevresinden elde edilen toplam 16 popülasyonu temsilen 45 örnek test edilmiştir. PCR uygulamasından önce gDNA'nın miktarı ve konsantrasyonu nanodrop cihazıyla ölçüldükten sonra çalışmalara devam edilmiştir. Bu uygulama diğer tüm popülasyonlar için yapılmıştır. Universal primer çifti (LCO1490-F ve HCO2198-R) kullanılarak *H. armigera*'nın mtDNA COI gen bölgesi test edilen tüm 45 örnekte pozitif olarak elde edilmiştir. Elektroforez uygulamalarında 1 kb markır kullanılmış ve bunun sonucunda 45 örneğin tümünde beklenen yaklaşık 613 bp'de bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.14). mtDNA COI bölgesinden elde edilen PCR örnekleri (613 bp) dizi analizi için firmaya gönderilmiştir.



Şekil 4.14. Farklı lokasyonlardan izole edilen yeşil kurdun mtDNA COI PCR amplifikasyon ürünlerinin %1'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü (M: markır; 1-kb DNA ladder, Fermentas, H1: Çamoba/Ezine, H2: Tevfikiye/Çanakkale, H3: Kösedere/Ayvacık, H4: Nebiler/Bayramiç, H5: Geyikli/Geyikli, H6: Batakovası/Çanakkale, H7: Kösedere/Ayvacık, H8: Çamoba/Ezine, H9: Orhaneli/Bursa, H10: Batakovası/Çanakkale, H11: Dümrek/Çanakkale)

Yeşil kurdun genetik çeşitliliğinin belirlenmesi için analiz edilen 45 örneğin mtDNA COI bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır. PCR çalışmaları sonucunda, 45 örnekten pozitif sonuç elde edilmesinin ardından örnekler gen dizilemesi için ilgili firmaya gönderilmiştir. Dizilemeden kaynaklanan hataların elimine edilmesi için, dizilerin başlangıç ve bitiş noktaları çıkarılmıştır. Firmadan elde edilen DNA dizi sonuçları dendogramdaki pikler ile incelenmiştir. Ardından, yeşil kurdun mtDNA COI bölgesi için 536 bp elde edilmiştir (Şekil 4.15). Elde edilen veriler GenBank veri tabanında MN132887-MN132931 aksesyon numaraları ile kaydedilmiştir (Çizelge 4.7). Ardından veriler GenBank'ta (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) Blast edilmiş ve sonuç olarak 45 örneğin GenBank'ta bulunan *H. armigera* dizilimleri ile %99-100 oranında eşleştiği belirlenmiştir.



Şekil 4.15. 45 adet yeşil kurt örneğine ait mtDNA COI gen bölgesinin MEGA X programında hizalama görünümü

Çizelge 4.7. Test edilen 45 yeşil kurt bireyinin aksesyon numaraları

	Örnekleme yeri	**Aksesyon numaraları**
Biga	Örtülüce-1	MN132924
	Örtülüce-2	MN132925
	Örtülüce-3	MN132926
Ayvacık	Ayvacık-1	MN132915
	Ayvacık-2	MN132916
	Ayvacık-3	MN132917
	Kösedere-1	MN132899
	Kösedere-2	MN132900
	Kösedere-3	MN132901
Ezine	Çamoba-1	MN132896
	Çamoba-2	MN132897
	Çamoba-3	MN132898
	Yenioba-1	MN132910
	Yenioba-2	MN132911
Çanakkale (Merkez)	Dümrek-1	MN132887
	Dümrek-2	MN132888
	Dümrek-3	MN132889
	Tevfikiye-1	MN132890
	Tevfikiye-2	MN132891
	Tevfikiye-3	MN132892
	Batakovası-1	MN132893
	Batakovası-2	MN132894
	Batakovası-3	MN132895
Bayramiç	Nebiler-1	MN132902
	Nebiler-2	MN132903
	Nebiler-3	MN132904
Geyikli	Geyikli-1	MN132905
	Geyikli-2	MN132906
	Geyikli-3	MN132907
Eceabat	Bigalı-1	MN132912
	Bigalı-2	MN132913
	Bigalı-3	MN132914
Bozcaada	Bozcaada-1	MN132918
	Bozcaada-2	MN132919
	Bozcaada-3	MN132920
Lapseki	Umurbey-1	MN132927
	Umurbey-2	MN132928
	Umurbey-3	MN132929
Gökçeada	Eşelek-1	MN132921
	Eşelek-2	MN132922
	Eşelek-3	MN132923

Çizelge 4.7.'nin devamı

Bursa	Orhaneli-1 Orhaneli-2	MN132908 MN132909
Balıkesir	İvrindi-1 İvrindi-2	MN132930 MN132931

Elde edilen toplam 536 bp konsensus diziden 523'ünün konstant alan ve 13'ünün ise polimorfik alan olduğu, bu 13 polimorfik bölgenin ise 6'sının singletons (186, 195, 304, 310, 384 ve 534. nükleotid) ve 7'sinin parsimoni informatif (138, 173, 218, 226, 231, 303 ve 414. nükleotid) olduğu tespit edilmiştir. Sekiz nükleotid dönüşümünün (substitution) üçüncü kodon pozisyonunda (%61,5), iki nükleotid dönüşümünün ikinci kodon pozisyonunda (%15,4) ve dört nükleotid dönüşümünün ise birinci kodon pozisyonunda (%23,1) meydana geldiği belirlenmiştir. Ortalama baz frekansının %30,70 (A), %40,30 (T), %15,86 (C) ve %13,14 (G) olduğu ve AT oranının %71 ile yüksek orana sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum mitokondriyal genlerinde yaygındır ve nükleusta mitokondriyalDNA benzeri diziler gözlemlenmemiştir (Zhang ve Hewitt, 1996). Transition/transversion (Ts/Tv) oranı k_1= 111.26 (pürin için) ve k_2= 51.401 (pirimidin için) bulunmuştur. 310. nükleotid pozisyonunda yalnızca bir transversion ve diğer tüm nükleotid dönüşümlerinin olduğu yerde (substitution) ise 12 transition olduğu saptanmıştır. Ortalama nükleotid farklılığı (k) 1.448 olarak hesaplanmıştır.

Analizi yapılan toplam 45 adet *H. armigera* haplotipleri arasındaki dizi farklılıklarının karşılaştırılması için uygulanan ikili matris sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir. İkili matris sonuçlarına göre, haplotipler arasındaki p-mesafeleri modelinin sırasıyla %0,18 ile %0,93 (1-5 bp) arasında değiştiği belirlenmiştir. Nükleotid farkının 1 baz çifti olduğu 12 durum bulunurken, 5 baz çifti olduğu ise 7 durum tespit edilmiştir. En yüksek nükleotid farkının 6 tane 5 baz çifti bulunması ile H12 haplotipinde olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.8. Yeşil kurt haplotipleri arasındaki ikili baz çifti karşılaştırmaları

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13
H1		1	2	2	1	1	3	1	2	1	1	4	1
H2	0,002		3	3	2	2	4	2	3	2	2	5	2
H3	0,004	0,006		2	1	3	3	3	2	3	3	4	3
H4	0,004	0,006	0,004		1	3	1	3	2	3	3	4	3
H5	0,002	0,004	0,002	0,002		2	2	2	1	2	2	3	2
H6	0,002	0,004	0,006	0,006	0,004		4	2	3	2	2	5	2
H7	0,006	0,007	0,006	0,002	0,004	0,007		4	3	4	4	5	4
H8	0,002	0,004	0,006	0,006	0,004	0,004	0,007		3	2	2	5	2
H9	0,004	0,006	0,004	0,004	0,002	0,006	0,006	0,006		1	3	4	3
H10	0,002	0,004	0,006	0,006	0,004	0,004	0,007	0,004	0,002		2	5	2
H11	0,002	0,004	0,006	0,006	0,004	0,004	0,007	0,004	0,006	0,004		5	2
H12	0,007	0,009	0,007	0,007	0,006	0,009	0,009	0,009	0,007	0,009	0,009		5
H13	0,002	0,004	0,006	0,006	0,004	0,004	0,007	0,004	0,006	0,004	0,004	0,009	

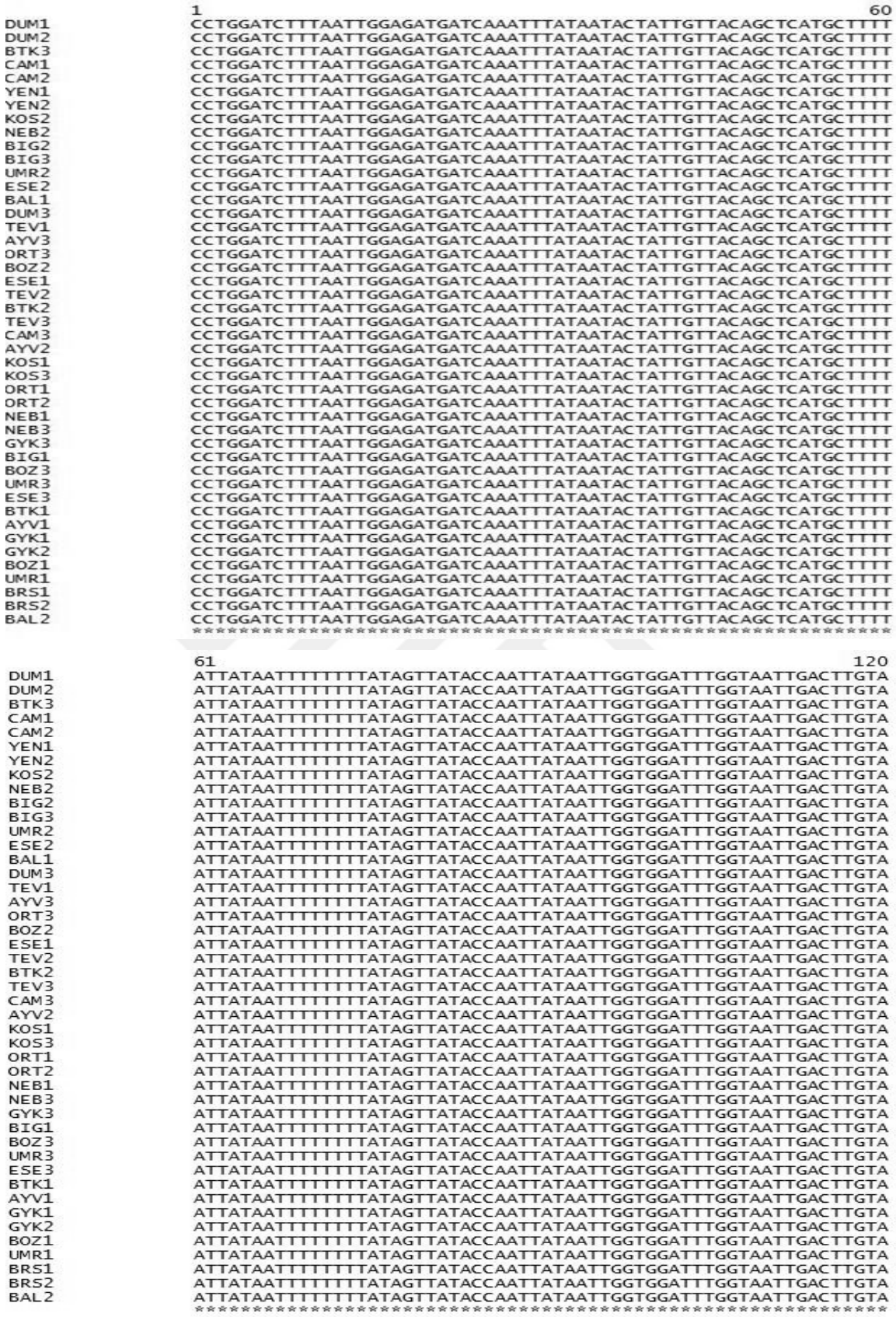
* Yüzde farklılıklar köşegenin alt kısmında gösterilmiştir ve net nükleotid farklılıklar köşegenin üst kısmında gösterilmiştir

Popülasyonların ikili karşılaştırılması sonucu elde edilen ikili genetik uzaklık (F_{st}) değerlerinin 0 ile 1 arasında olduğu belirlenmiştir. İkili genetik uzaklık (F_{st}) değerinin özellikle Bursa popülasyonunda, Çamoba, Dümrek, Bigalı, Geyikli, Eşelek, Kösedere, Batakovası, Nebiler, Tevfikiye ve Umurbey popülasyonlarından farklı olduğu tespit edilmiştir (F_{st}>0,75). Balıkesir popülasyonu ve Bursa popülasyonunun 0,89 ölçeğinde genetik farklılaşma gösterdiği belirlenmiştir. F_{st} değerinin Bursa ve Yenioba popülasyonu arasında en yüksek olduğu saptanmıştır (F_{st}=1). Bursa popülasyonundan elde edilen haplotipin, diğer popülasyonlardan elde edilen haplotiplere göre oldukça farklı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.9).

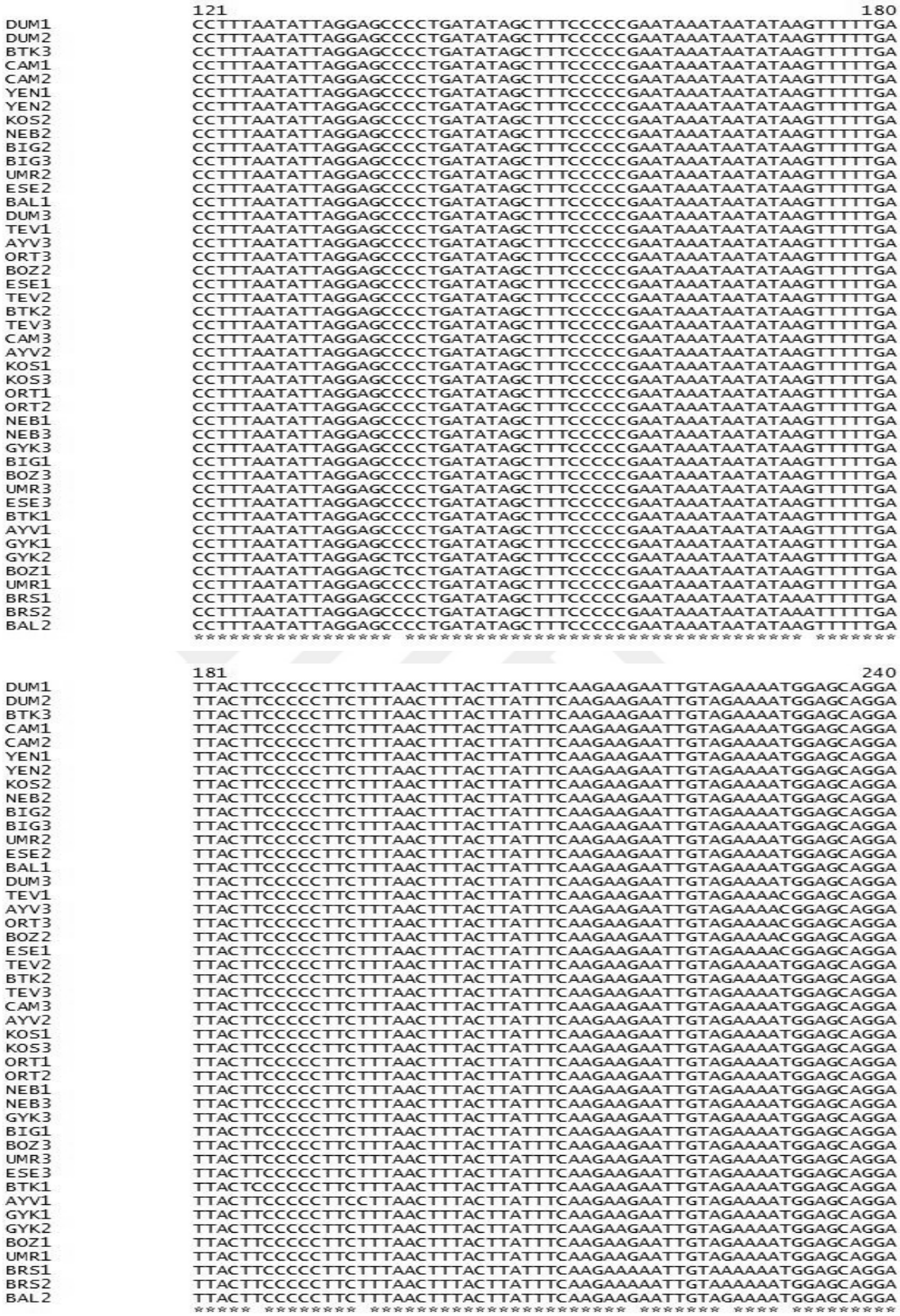
Çizelge 4.9. Yeşil kurt popülasyonları arasındaki ikili genetik uzaklık (F_{st}) değerleri

	AYV	BAL	ORT	BOZ	BRS	CAM	DUM	BIG	GYK	ESE	KOS	BTK	NEB	TEV	UMR
AYV															
BAL	0,40														
ORT	0	0,55													
BOZ	0	0,18	0												
BRS	0,75	0,89	0,9	0,75											
CAM	0,20	0	0,33	0	0,91										
DUM	0,43	0	0,6	0,2	0,92	0									
BIG	0,2	0	0,33	0	0,91	0	0								
GYK	0	0,18	0	0	0,75	0	0,2	0							
ESE	0	0,22	0	0	0,82	0	0,25	0	0						
KOS	0	0,29	0	0	0,9	0	0,33	0	0	0					
BTK	0,05	0	0,2	0	0,77	0	0	0	0	0	0				
NEB	0	0,29	0	0	0,9	0	0,33	0	0	0	0	0			
TEV	0	0,46	0	0	0,82	0,25	0,5	0,25	0	0	0	0,06	0		
UMR	0,17	0	0,25	0	0,83	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	
YEN	0,5	0	0,75	0,25	1	0	0	0	0,25	0,33	0,5	0	0,5	0,6	0

COI gen bölgesinde dizi analizine tabi tutulan toplam 45 örneğin haplotiplerinin mutasyon bölgeleri ve nükleotid değişimleri Şekil 4.16'da verilmiştir. Dizi analiz sonuçlarına göre, H1 haplotipinde herhangi bir nükleotid değişimi gözlenmemiştir. H2 haplotipinde 534. pozisyonda C→T şeklinde, H3 haplotipinde 231. pozisyonda T→C ve 414. pozisyonda A→G şeklinde, H4 haplotipinde 303. pozisyonda C→T ve 414. pozisyonda A→G şeklinde, H5 haplotipinde 414. pozisyonda A→G şeklinde, H6 haplotipinde 186. pozisyonda T→C şeklinde, H7 haplotipinde 195. pozisyonda T→C şeklinde, H8 haplotipinde 304. pozisyonda C→T şeklinde, H9 haplotipinde 138. pozisyonda C→T ve 414. pozisyonda A→G şeklinde, H10 haplotipinde 138. pozisyonda C→T şeklinde, H11 haplotipinde 384. pozisyonda A→G şeklinde, H12 haplotipinde 173. pozisyonda G→A, 218. pozisyonda G→A, 226. pozisyonda G→A ve 414. pozisyonda A→G şeklinde, H13 haplotipinde ise 310. pozisyonda A→T şeklinde nükleotid dönüşümleri tespit edilmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Test edilen 45 yeşil kurt bireyindeki COI geninin farklı haplotiplere ait gen dizileri

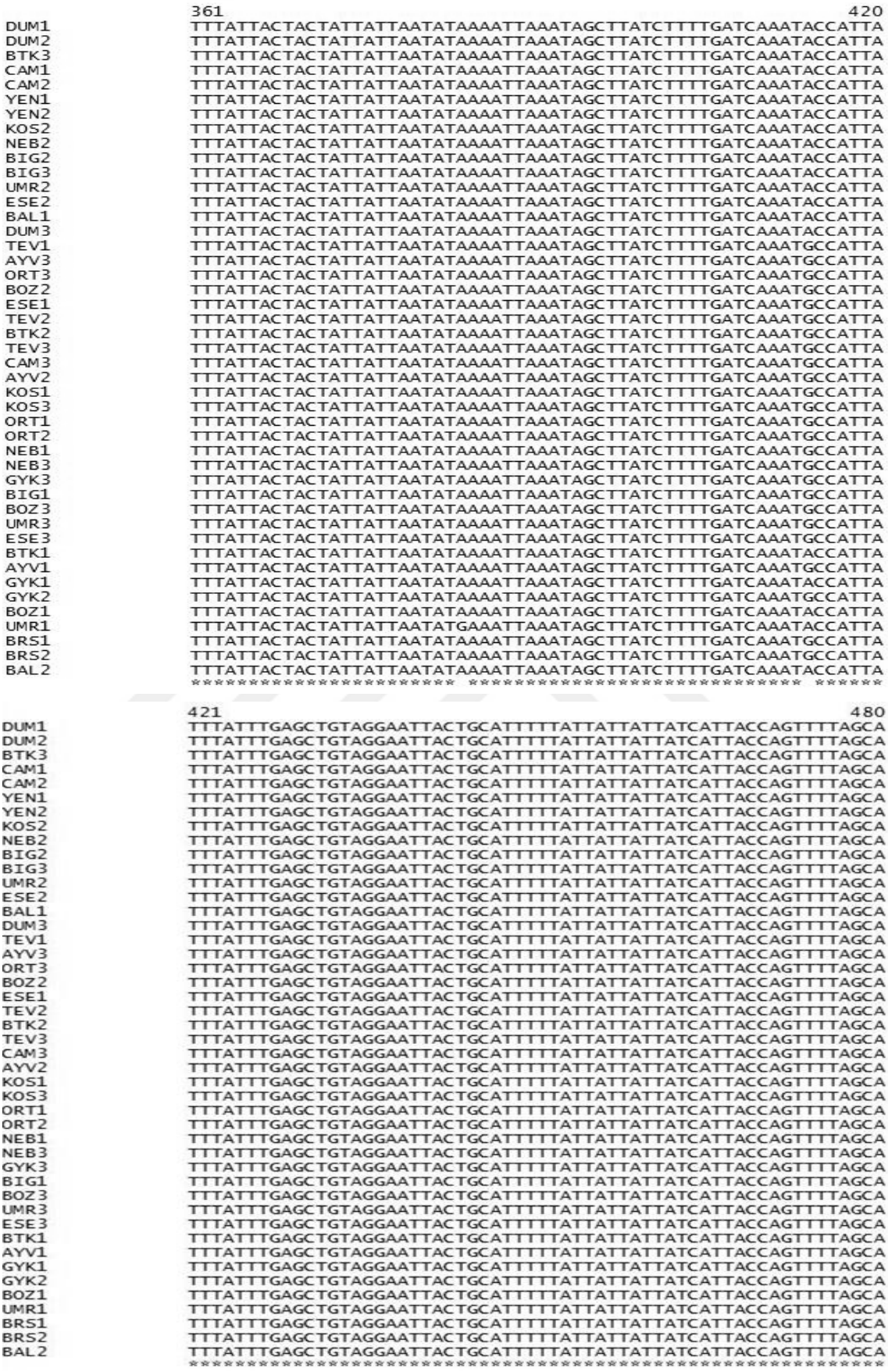


Şekil 4.16.'nın devamı

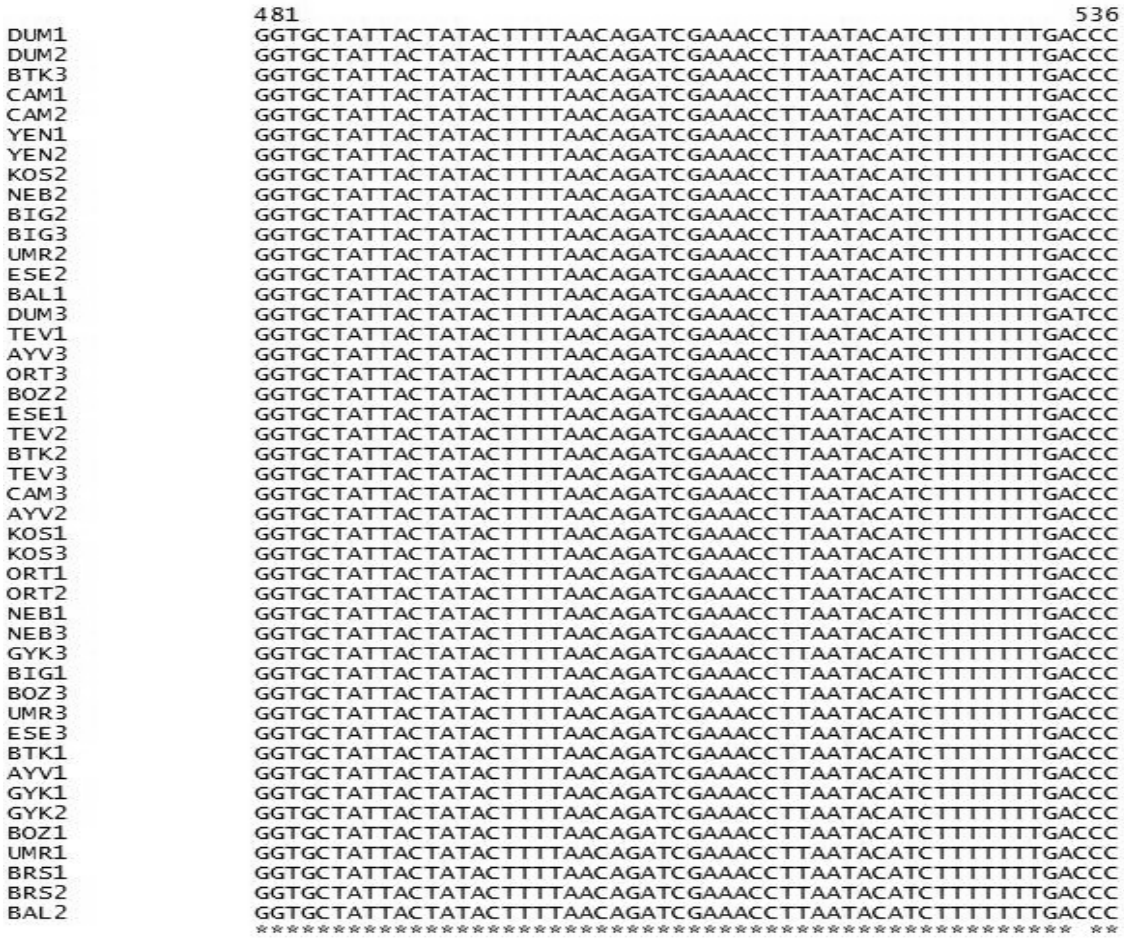
```
                241                                                       300
DUM1            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
DUM2            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
BTK3            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
CAM1            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
CAM2            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
YEN1            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
YEN2            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
KOS2            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
NEB2            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
BIG2            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
BIG3            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
UMR2            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
ESE2            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
BAL1            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
DUM3            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
TEV1            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
AYV3            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
ORT3            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
BOZ2            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
ESE1            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
TEV2            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
BTK2            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
TEV3            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
CAM3            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
AYV2            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
KOS1            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
KOS3            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
ORT1            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
ORT2            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
NEB1            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
NEB3            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
GYK3            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
BIG1            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
BOZ3            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
UMR3            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
ESE3            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
BTK1            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
AYV1            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
GYK1            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
GYK2            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
BOZ1            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
UMR1            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
BRS1            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
BRS2            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
BAL2            ACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTTTCATCTAATATTGCACATGGAGGAAGATCAGTA
                ************************************************************

                301                                                       360
DUM1            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
DUM2            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
BTK3            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
CAM1            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
CAM2            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
YEN1            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
YEN2            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
KOS2            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
NEB2            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
BIG2            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
BIG3            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
UMR2            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
ESE2            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
BAL1            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
DUM3            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
TEV1            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
AYV3            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
ORT3            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
BOZ2            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
ESE1            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
TEV2            GATCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
BTK2            GATCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
TEV3            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
CAM3            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
AYV2            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
KOS1            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
KOS3            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
ORT1            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
ORT2            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
NEB1            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
NEB3            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
GYK3            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
BIG1            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
BOZ3            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
UMR3            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
ESE3            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
BTK1            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
AYV1            GATCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
GYK1            GACTTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
GYK2            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
BOZ1            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
UMR1            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
BRS1            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
BRS2            GACCTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
BAL2            GACCTAGCTTTTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATCTCATCTATTTTAGGAGCAATTAAT
                **  ***** ************************************************
```

Şekil 4.16.'nın devamı



Şekil 4.16.'nın devamı



Şekil 4.16.'nın devamı

Çalışmada haplotip çeşitliliği (*h*) ortalama %0,804±0,040 ve nükleotid çeşitliliği (π) ise %0,270±0,037 olarak hesaplanmıştır. Haplotip çeşitliliğinin %1,000±0,500 ile 0,000 arasında yer aldığı belirlenmiştir. En yüksek haplotip çeşitliliği İvrindi (Balıkesir) popülasyonunda (*h*=1,000±0,500) görülmüştür. Bu değeri Tevfikiye, Batakovası, Ayvacık, Geyikli, Bozcaada, Umurbey ve Eşelek popülasyonları takip etmiştir (*h*=1,000±0,272). En düşük haplotip çeşitliliğinin ise Yenioba (*h*=0,000) popülasyonunda olduğu saptanmıştır. Diğer taraftan, nükleotid çeşitliliğinin %0,373±0,131 ile 0,000 arasında bir değerde bulunduğu tespit edilmiştir. En yüksek nükleotid çeşitliliği Batakovası, Ayvacık, Geyikli ve Bozcaada popülasyonlarında (π=0,373±0,131) görülmüştür. İkinci yüksek değere sahip popülasyonlar ise Tevfikiye, Umurbey ve Eşelek popülasyonlarında tespit edilmiştir (π=0,249±0,083). En düşük nükleotid çeşitliliği ise Bursa ve Yenioba (π=0,000) popülasyonlarında belirlenmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Test edilen yeşil kurt popülasyonlarının genetik varyasyonları

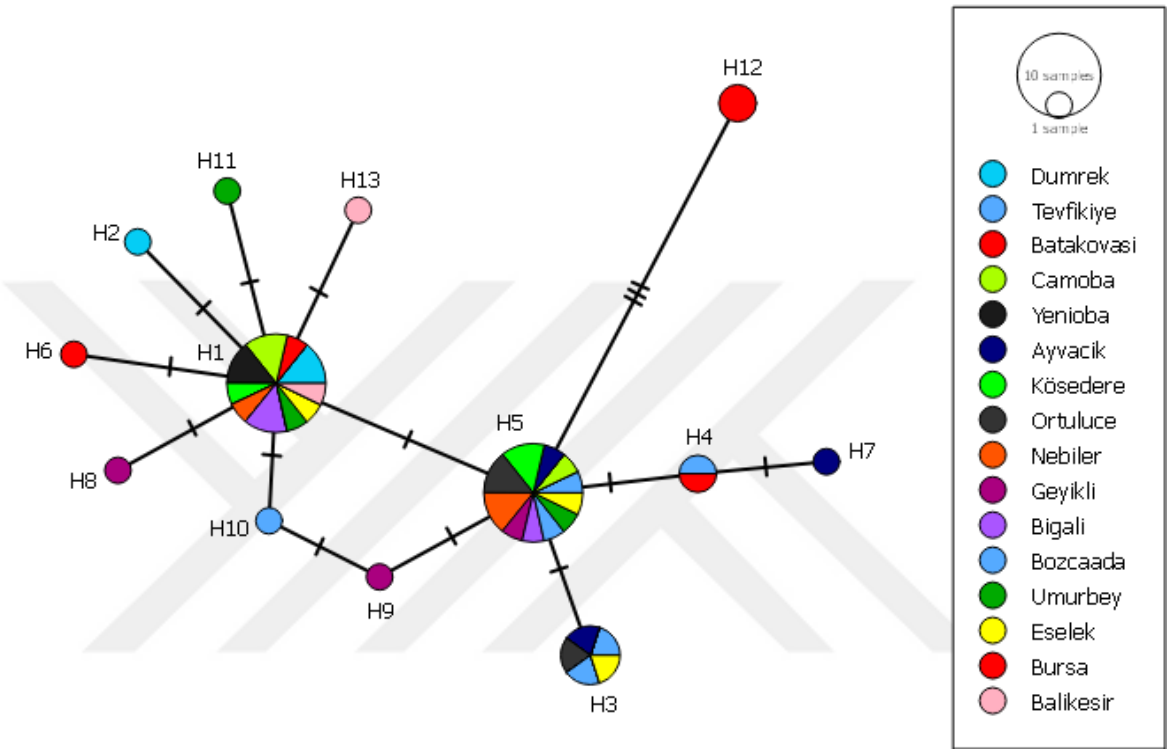
Popülasyon	Lokasyon	N		COI			
			S	N_h	Özgün N_h	h	π (%)
Çanakkale	Dümrek	3	1	2	1	0,667±0,314	0,124±0,059
	Tevfikiye	3	2	3	-	1,000±0,272	0,249±0,083
	Batakovası	3	3	3	1	1,000±0,272	0,373±0,131
	Çamoba	3	1	2	-	0,667±0,314	0,124±0,059
	Yenioba	2	0	1	-	0,000±0,000	0,000±0,000
	Ayvacık	3	3	1	1	1,000±0,272	0,373±0,131
	Kösedere	3	1	2	-	0,667±0,314	0,124±0,059
	Örtülüce	3	1	2	-	0,667±0,314	0,124±0,059
	Nebiler	3	1	2	-	0,667±0,314	0,124±0,059
	Geyikli	3	3	3	2	1,000±0,272	0,373±0,131
	Bigalı	3	1	2	-	0,667±0,314	0,124±0,059
	Bozcaada	3	3	1	1	1,000±0,272	0,373±0,131
	Umurbey	3	2	3	1	1,000±0,272	0,249±0,083
	Eşelek	3	2	3	-	1,000±0,272	0,249±0,083
Bursa	Orhaneli	2	0	1	1	0,000±0,000	0,000±0,000
Balıkesir	İvrindi	2	1	2	1	1,000±0,500	0,187±0,093
Ortalama	-	45	13	13	9	0,804±0,040	0,270±0,037

N: her bir popülasyonun dizi sayısı; S: ayrılmış bölgelerin sayısı; N_h: haplotip sayısı; h: haplotip çeşitliliği, π: nükleotid çeşitliliği

Çizelge 4.10'da belirtildiği gibi toplamda 45 örnekten elde edilen dizi analizlerine göre, *H. armigera* popülasyonları arasında 13 haplotip ve 13 mutasyon belirlenmiştir. Tevfikiye, Batakovası, Geyikli, Umurbey ve Eşelek popülasyonlarında 3 haplotip; Dümrek, Çamoba, Kösedere, Örtülüce, Nebiler, Bigalı ve Balıkesir popülasyonlarında 2 haplotip; Yenioba, Ayvacık, Bozcaada ve Bursa popülasyonlarında 1 haplotip belirlenmiştir. Ayrıca, bu popülasyonlarda 9 özel haplotip de tespit edilmiştir. Haplotipler arasında en fazla özgün haplotip sayısına sahip olan popülasyonun Geyikli popülasyonu olduğu belirlenmiştir. Dümrek, Batakovası, Ayvacık, Bozcaada, Umurbey, Bursa ve Balıkesir popülasyonlarında 1 özgün haplotip saptanmıştır. Tevfikiye, Çamoba, Yenioba, Kösedere, Örtülüce, Nebiler, Bigalı ve Eşelek popülasyonlarında özgün haplotipe rastlanılmamıştır.

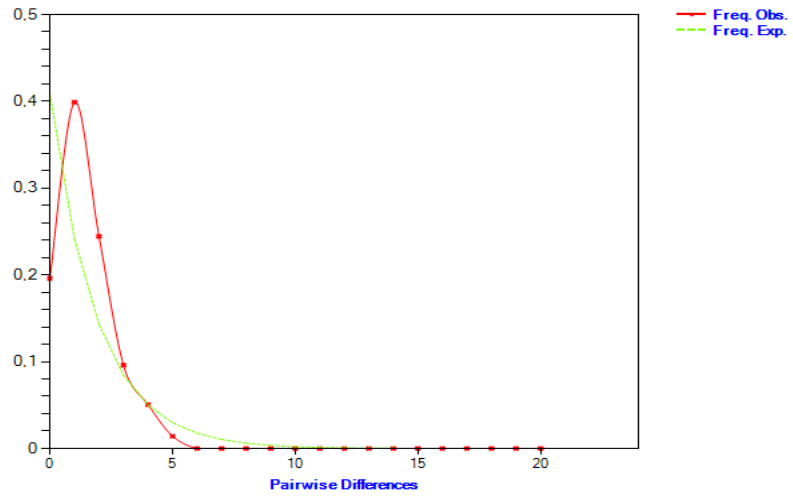
Analizi yapılan toplam 45 adet *H. armigera* örneği için şematize edilen Median-Joining Network haplotip ağına göre, H1 ve H5 haplotipinin merkezi bir haplotip olduğu görülmüştür. H5 haplotipinde toplamda 11 lokasyon (Tevfikiye, Çamoba, Ayvacık, Kösedere, Örtülüce, Nebiler, Geyikli, Bigalı, Bozcaada, Umurbey ve Eşelek) bulunurken, H1 haplotipinde ise 10 lokasyon (Dümrek, Batakovası, Çamoba, Yenioba, Kösedere, Nebiler, Bigalı, Umurbey, Eşelek ve Balıkesir) belirlenmiştir. H1 ve H5 haplotipi toplam örneğin yaklaşık % 63'ünü (28/45) oluşturmuştur. Haplotip H3, 5 lokasyondan (Tevfikiye,

Ayvacık, Örtülüce, Bozcaada ve Eşelek), haplotip H4 ise Tevfikiye ve Batakovası olmak üzere toplamda 2 lokasyondan meydana gelmiştir. Haplotip H3'ün toplamdaki örnek sayısının yaklaşık olarak % 12'sini oluşturduğu tespit edilmiştir. Kalan 9 haplotipin (H2, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12 ve H13) ise tek lokasyondan meydana geldiği görülmüştür (Şekil 4.17).



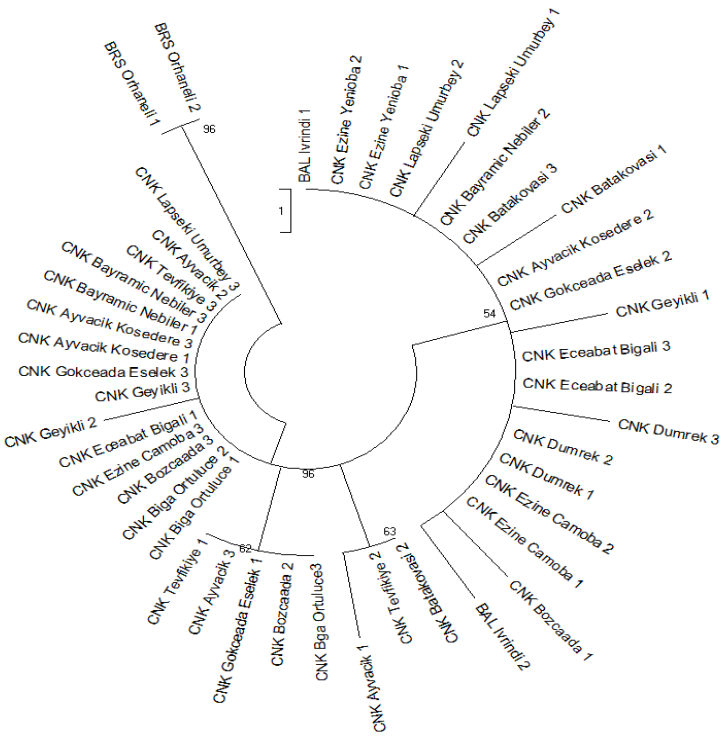
Şekil 4.17. Yeşil kurt COI haplotiplerinin ağ modeli (Median-Joining Network)

Çalışmada, uyumsuzluk (Mismatch) dağılım analizi, unimodal (tek tepeli) bir dağılım göstermiştir (Şekil 4.18). Bu dağılım modeline göre, yeşil kurt popülasyonlarının yakın geçmişte demografik genişleme yaşadığı veya göç olayı etkisi altında kalmadan ani popülasyon genişlemesi yaşadığını göstermektedir. Bununla birlikte, nötralite testlerinden Tajima's *D* değeri -1.56598 bulunmuş olup, bu değerin istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir (P>0,10). Diğer bir nötralite testi olan Fu's F_s değeri -7.423 olarak hesaplanmış ve istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir (P<0,001).



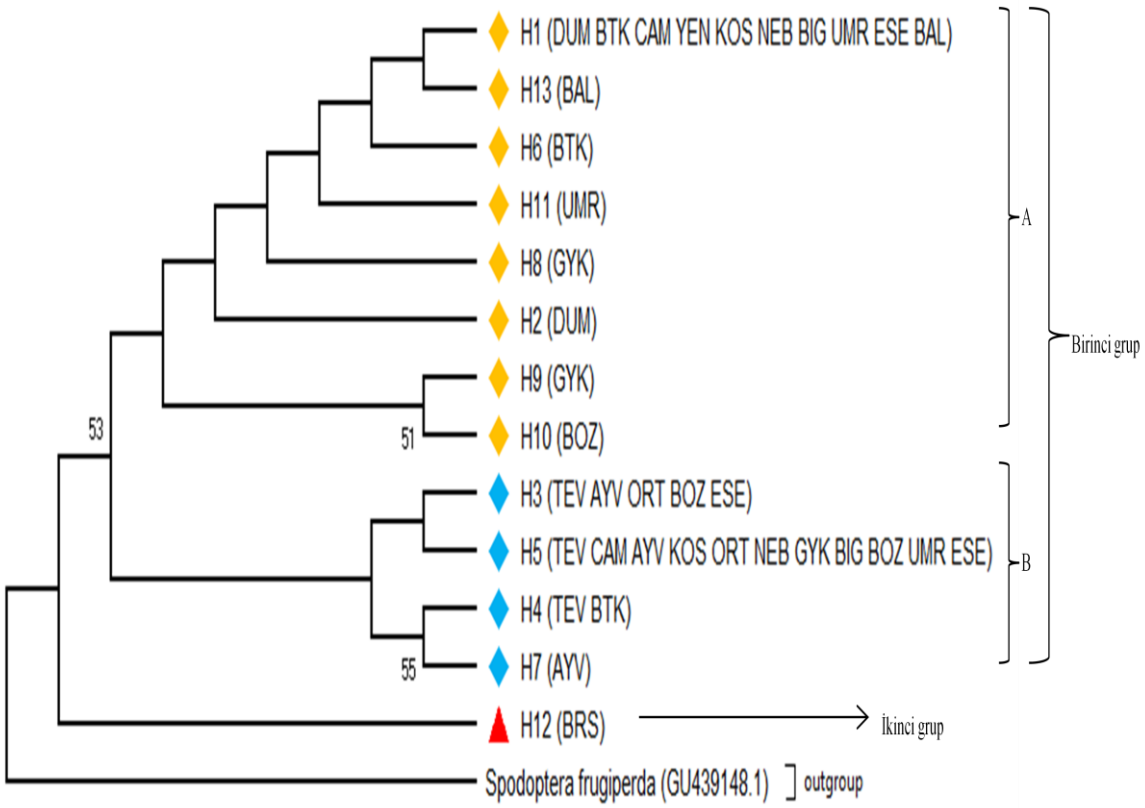
Şekil 4.18. Yeşil kurt bireylerinin uyumsuzluk (Mismatch) dağılım analizi

Genetik uzaklıkların görsel olarak belirtilmesi amacıyla, K2 parametresi kullanılarak komşu birleştirme metodu (Neighbour Joining Method)'na göre, 2 bireyin Bursa popülasyonu ve 8 bireyin Çanakkale ve Balıkesir popülasyonu olarak ayrı bir ağ üzerinde konumlandığı, test edilen popülasyondaki diğer 35 bireyin ise % 96 oranında bağlanan bir ağ ile ayrıldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Yeşil kurt bireyleri arasındaki COI genine dayalı filogenetik ilişki (536 bp; NJ modeli)

Popülasyonlar arası filogenetik ağaçtan elde edilen UPGMA dendogramı Şekil 4.20'de verilmiştir. Çalışmada, *Spodoptera frugiperda* (GU439148) dış grup olarak kullanılmıştır. Dendograma göre, birinci grupta 12 popülasyonun bulunduğu, ikinci grupta ise yalnızca Bursa popülasyonunun yer aldığı iki ana majör küme oluşmuştur. Birinci grup kendi arasında A ve B olarak iki alt kümeye ayrılmıştır. A kümesinde H1, H2, H6, H8, H9, H10, H11 ve H13 haplotiplerinin yer aldığı toplam 8 haplotip bulunmuş olup, yine bu kümede Dümrek, Batakovası, Çamoba, Yenioba, Kösedere, Nebiler, Bigalı, Umurbey, Eşelek, Geyikli, Bozcaada ve Balıkesir popülasyonlarının yer aldığı görülmüştür. B kümesinde ise Tevfikiye, Ayvacık, Örtülüce, Bozcaada, Eşelek, Çamoba, Kösedere, Nebiler, Geyikli, Bigalı Umurbey, Eşelek ve Batakovası popülasyonlarının bulunduğu 4 haplotip (H3, H4, H5 ve H7) belirlenmiştir. Dış grup dendogramda ayrı bir dal üzerinde konumlanmıştır. Dendogram sonucuna göre, Çanakkale ve Balıkesir popülasyonlarının yakın genetik çeşitliliğe sahip olduğu, Bursa popülasyonunun ise Çanakkale ve Balıkesir popülasyonundan farklı ve uzak olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.20. Test edilen 45 yeşil kurt bireyinin UPGMA dendogramı

Elde edilen haplotiplerin mutasyon sayısının, H12 haplotipinde 4 mutasyon, H7 haplotipinde 3 mutasyon, H3, H4 ve H9 haplotipinde 2 mutasyon, H2, H5, H6, H8, H10, H11ve H13 haplotipinde ise 1 mutasyon olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Yeşil kurt popülasyonlarında COI bölgesinde tespit edilen haplotiplerin mutasyon bölgeleri ve nükleotid değişimleri (536 bp) (M: mutasyon sayısı)

Pozisyon	138.	173.	186.	195.	218.	226.	231.	303.	304.	310.	384.	414.	534.	M
Haplotip	C	G	T	T	G	G	T	C	C	A	A	A	C	
H1	C	G	T	T	G	G	T	C	C	A	A	A	C	-
H2	C	G	T	T	G	G	T	C	C	A	A	A	T	1
H3	C	G	T	T	G	G	C	C	C	A	A	G	C	2
H4	C	G	T	T	G	G	T	T	C	A	A	G	C	2
H5	C	G	T	T	G	G	T	C	C	A	A	G	C	1
H6	C	G	C	T	G	G	T	C	C	A	A	A	C	1
H7	C	G	T	C	G	G	T	T	C	A	A	G	C	3
H8	C	G	T	T	G	G	T	C	T	A	A	A	C	1
H9	T	G	T	T	G	G	T	C	C	A	A	G	C	2
H10	T	G	T	T	G	G	T	C	C	A	A	A	C	1
H11	C	G	T	T	G	G	T	C	C	A	G	A	C	1
H12	C	A	T	T	A	A	T	C	C	A	A	G	C	4
H13	C	G	T	T	G	G	T	C	C	T	A	A	C	1

Çalışmanın amacı, yeşil kurdun domates üzerinde beslenebilen laboratuvar kolonisinin oluşturulması, laboratuvar adaptasyonunun sağlanması ve biyolojik özelliklerinin belirlenmesi, yıl boyunca konukçusuna bağlı kalmadan yapay diyet üzerinde beslenebilen yeşil kurdun biyolojik özelliklerinin araştırılması, domates ve yapay diyette beslenen yeşil kurdun toplam protein miktarlarının yapılması ve Çanakkale ve çevresindeki domates üretim alanlarından elde edilen yeşil kurt popülasyonlarının genetik çeşitliliğinin tespit edilmesidir.

Çalışmanın I. aşamasında, yeşil kurdun domates üzerinde beslenme fizyolojisi araştırılmıştır. Yapılan çalışmada, yeşil kurdun domatese bırakılan yumurta eni 0,50±0,03 mm, boyu 0,61±0,03 mm ve ağırlığı ise 0,0001 g olarak tespit edilmiştir. Öngören ve ark. (1977) yaptıkları çalışmada yeşil kurdun yumurta enini ortalama 0,49±0,2 mm bulmuşlardır. Başka bir çalışmada ise yumurta eninin 0,51±0,03 mm olduğu bildirilmiştir (Rabari ve ark., 2017). Çalışma sonucunda elde edilen verilerin önceki çalışmalarda elde edilen veriler ile uyum gösterdiği belirlenmiştir.

Çalışmada 24±1˚C'de, %65 oransal nemde ve 16:8 fotoperiyotta yumurtaların açılma oranı %85,83±7,05 ve inkübasyon süresinin 2,6±0,54 gün belirlenmiştir. Patel ve ark. (2011) yumurtaların açılma oranının %66 ile 96 arasında bir değerde olduğunu ve inkübasyon süresinin ise 3,72±0,79 gün olarak ifade etmişlerdir. Mironidis ve Savopoulou-Soultani (2008) yumurtaların inkübasyon süresini 25˚C'de 3,31±0,02 gün, 20˚C'de

5,12±0,02 gün ve 15˚C'de ise 13,57±0,09 gün gözlemlemişlerdir. Çalışmada inkübasyon süresi ile sıcaklık arasında doğru orantı olduğu görülmüştür.

Larvaların kafa kapsülüne yönelik gerçekleştirilen çalışmada kafa kapsülü çapı sırasıyla ortalama I. larva döneminde 0,25±0,05 mm, II. larva döneminde 0,42±0,02 mm, III. larva döneminde 1,00±0,12 mm, IV. larva döneminde 1,48±0,13 mm, V. larva döneminde 1,85±0,10 mm ve VI. larva döneminde ise 3,06±0,40 mm ölçülmüş ve toplamda 6 larva dönemi olduğu tespit edilmiştir. Öngören ve ark. (1977) larvaların kafa kapsüllerini I. dönemde 0,26±0,1 mm, II. dönemde 0,42±0,3 mm, III. dönemde 0,67±0,4 mm, IV. dönemde 1,10±0,3 mm, V. dönemde 1,81±0,4 mm ve VI. dönemde 2,65±0,4 mm olarak hesaplamışlardır. Elde edilen sonuçlar Öngören ve ark. (1977)'nın çalışmaları ile benzerlik göstermiştir.

Laboratuvarda 24±1˚C'de, %65 oransal nem ve 16:8 fotoperiyotta larvaların domates üzerinde gelişme süreleri ortalama 18,20±0,83 gün olarak hesaplanmıştır. Rabari ve ark. (2017b)'de yaptıkları bir çalışmada, 25,40±2,95˚C sıcaklıkta larva gelişme süresinin 26,97±2,08 gün, 20,73±2,55˚C sıcaklıkta 33,50±2,42 gün ve 27,57±3,48˚C sıcaklıkta ise 23,97±1,96 gün olduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada, larva gelişme süresinin uzun olmasının düşük sıcaklıktan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Kaya ve Kovancı, (2000) 25±1˚C'de larva gelişme süresini 12-18 gün olarak bulmuşlardır. Burada yapılan çalışmada ise elde edilen bulgular Kaya ve Kovancı (2000) ile benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmada domateste üzerinde yetiştirilen yeşil kurt larvaları toplamda 6 larva dönemi geçirmiştir. Çalışmanın sonuçları Rabari ve ark. (2017a) ile beraber Nasreen ve Mustafa (2000) tarafından gerçekleştirilen sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Larva dönemi sayısı konukçuya göre değişmektedir.

Larva dönemlerini domates üzerinde tamamlayan yeşil kurdun laboratuvarda pupa gelişme süreleri incelendiğinde, pupa gelişme süresinin 9,3±0,4 güne sahip olduğu tespit edilmiştir. Öngören ve ark. (1977) tarafından gerçekleştirilen çalışmada 22±1˚C sıcaklık ve %65-70 oransal nemde pupa gelişme süresinin 17-21 günde, 28±1˚C sıcaklık ve %65-70 oransal nemde ise bu sürenin 7-14 gün arasında değiştiği bildirilmiştir. Sıcaklığın pupa gelişme süresi parametresi üzerine etkisinin olduğu gözlemlenmiştir.

Yeşil kurdun ergin dönemine ait pre-ovipozisyon, ovipozisyon ve post-ovipozisyon süreleri sırasıyla 2,8±1,03 gün, 12,6±2,45 gün ve 6,7±2,31 gün olarak saptanmıştır. Yine aynı çalışmada dişi ve erkek erginlerin ömür uzunluğu ile bir dişinin bıraktığı yumurta sayısı (adet) olarak hesaplanmıştır. Dişi erginin ömür uzunluğu ortalama 23±3,05 gün, erkek erginin ömür uzunluğu ise ortalama 20,8±5,78 gün olduğu görülmüştür. Çalışmada,

ergin dişilerin ergin erkeklerden daha uzun yaşadığı gözlemlenmiştir. Bir dişinin bıraktığı yumurta sayısı ise en düşük ortalama 994 adet, en yüksek 1341 adet ile ortalama 1096,3±105,56 adet olduğu tespit edilmiştir. Literatürde *H. armigera* ile ilgili yapılan ergin dönemlerine yönelik çalışmalar incelendiğinde, Mironidis ve Savopoulou-Soultani (2008) sıcaklığın dişi birey üzerinde ovipozisyon süresine etki ettiğini vurgulamıştır. 15˚C'de preovipozisyon süresi 9,60 gün olarak gözlemlenirken, 25˚C'de ise bu sürenin 1,57 gün sürdüğü bildirilmiştir. Bir başka çalışmada ise Hindistan'da dişilerin nohut üzerinde 16,5-18,5 gün, erkeklerin ise 8-12 gün yaşadıklarını ve dişilerin erkeklere oranla daha uzun ergin ömrüne sahip oldukları bildirilmiştir (Tripathi ve Sharma, 1985). Öngören ve ark. (1977) yeşil kurdun biyolojisine yönelik yaptıkları çalışmada, dişilerin ergin ömrünün ortalama 10,6 gün ve erkeklerin ergin ömrünün ise ortalama 6,9 gün sürdüğünü, bir dişinin ortalama 603-1592 yumurta bıraktığını bildirmişlerdir. Rabari ve ark. (2017a) postovipozisyon süresini domateste 0,80 gün (0-2 gün) ve nohutta 0,90 gün (0-2 gün) belirlemiştir. Kaya ve Kovancı (2000) yaptıkları çalışmada, post-ovipozisyon süresini ortalama 0,70±0,64 gün (0-2 gün) bulmuştur. Bu çalışmalara göre, post-ovipozisyon süresinin bulunmaması ergin dişinin ovipozisyon döneminde veya yumurta bıraktıktan sonraki süre zarfında hemen ölmesi ile ilişkilendirilebilir.

Gerçekleştirilen çalışmada yeşil kurt pupaları cinsiyetlerine ayrılarak en, boy ve ağırlıkları hesaplanmıştır. Buna göre, dişi pupanın eni 5,62±0,17 mm, boyu 18,63±0,87 mm ve ağırlığı 321,19±26,59 mg; erkek pupanın eni ise 5,32±0,26 mm, boyu 17,98±0,74 mm ve ağırlığı 267,77±33,11 mg olarak ölçülmüştür. Dişi pupanın erkek pupaya oranla daha büyük olduğu tespit edilmiştir. Literatürde yer alan bununla ilgili çalışmalar incelendiğinde, Rabari ve ark. (2017a) domateste dişi bireyin enini 6,45±0,49 mm, boyunu 20,66±0,97 mm olarak, bu değerin ise erkek bireyde enini 5,81±0,41 mm, boyunu ise 20,14±1,04 olarak hesaplamışlardır. Elde edilen sonuçların, yapılan bu çalışmanın araştırma bulguları ile benzer olduğu görülmüştür. Casimero ve ark. (2000) çalışmalarında, yeşil kurt larvalarını domates yaprakları ve domates meyvesi üzerinde yetiştirmiş ve pupa ağırlıklarını belirlemişlerdir. Sonuç olarak, domates meyvesi üzerinde beslenen pupaların ağırlıklarının (277,93±7,25 mg) domates yapraklarında beslenenlere göre (193,24±6,83 mg) daha ağır olduğunu belirtmişlerdir. Kumar ve ark. (2017) domateste beslenen larvaların pupa döneminde ağırlığını 237,77 mg olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmalara göre, domates meyvesi üzerinde beslenen larvaların pupa ağırlık sonuçları Casimero ve ark. (2000) ile benzerlik göstermiştir.

Çalışmanın II. aşamasında yeşil kurt larvalarının yapay diyet üzerinde beslenme fizyolojisi araştırılmıştır. Literatürde bulunan yapay diyetler test edilerek en iyi larva yapay diyeti belirlenmiştir. Sonuç olarak, yeşil kurt bireyleri hem diyet I hem de diyet II'de devamlı olarak dört generasyon boyunca laboratuvarda yetiştirilmiştir. Aslında *Grapholita molesta* (Lep:Tortricidae) için geliştirilen yapay diyet I, ilk kez laboratuvarda bu çalışmada yeşil kurdun yetiştirilmesinde test edilmiş ve yapay diyetin *H. armigera* için uygun olduğu belirlenmiştir. Larva gelişme süresi, larva dönemleri ve beslenme durumları karşılaştırıldığında, yapay besine herhangi bir bitki materyalinin ilavesinin gerekmediği anlaşılmıştır. Larva ve pupa gelişme süresi ile birlikte ergin çıkış oranı bakımından yapay diyet ve domates üzerinde benzer sonuçlar tespit edilmiştir. Larva gelişme süresi yapay diyet I'de 11,6±1,5 gün, yapay diyet II'de 16,6±1,4 gün ve domateste 18,2±0,8 gün belirlenmiştir. Pupa gelişme süresi yapay diyet I'de 9,1±0,5 gün, yapay diyet II'de 10,1±1,6 gün ve kontrol olan domates üzerinde 9,3±0,4 gün tespit edilmiştir. Ergin çıkış oranlarının ise yapay diyet I'de %85,9, yapay diyet II'de %86,2 ve domateste %88,4 olduğu belirlenmiştir. Yapay diyet bileşeninde bulunan Brewer's mayası, buğday ruşeymi ve mısır irmiğinin larvaların beslenmesinde uygun ve yeterli besine sahip olduğu belirlenmiştir. Yapılan diğer çalışmalara bakıldığında, Nunes ve ark. (2017) yapay diyette nohut unu kullandıklarında larva canlılığını %92,57, barbunya ununun ise larva canlılığına etkisini %89,93 bulmuşlardır. Nohut unu diyeti üzerinde canlılığın barbunya unlu besine göre %3 daha yüksek olduğunu ifade etmişlerdir. Amer ve Sayed (2014) tarafından yapılan çalışmada, içeriğinde fasulye unu ve Brewer's mayası bulunduran yapay diyette *H. armigera* larvalarının laboratuvarda 12 generasyon boyunca yetiştirildiği ve bu yapay besinin yeşil kurdun yetiştirilmesinde yeterli olduğu bildirilmiştir. Tamer (1977), formülasyonunda buğday ruşeyminin ağırlıklı olduğu yapay diyette yetiştirilen *H. armigera* larvalarının, larva ve pupa canlılığının üzerinde pozitif bir etkisi olduğunu belirtmiştir. Buna ek olarak, larvaların gelişmesinde gerekli olan B vitaminini buğday ruşeyminden sağladığını ifade etmiştir.

Çalışmanın III. aşamasında domates üzerinde ve yapay diyette beslenen yeşil kurt bireylerinin beslenme fizyolojisinde önemli parametresi olan protein miktarının tayini yapılmıştır. Çalışmada domateste beslenen yeşil kurdun olgun larva, pupa ve ergin dönemlerinin toplam protein miktarları belirlenmiştir. Denemeler sonucunda toplam protein miktarı *H. armigera* olgun larvalarında ortalama 24,37±2,63 µg/mg, pupalarında 51,14±2,66 µg/mg ve erginlerinde 33,91±4,86 µg/mg olarak tespit edilmiştir. Toplam protein miktarı karşılaştırıldığında, larva dönemindeki protein miktarının pupa ve ergin

dönemine göre düşük olduğu, en yüksek protein oranına sahip dönemin ise pupa dönemi olduğu belirlenmiştir. Farklı yapay diyet üzerinde beslenen yeşil kurt erginlerinin toplam protein miktarı diyet I'de 23,72±4,33 µg/mg, diyet II'de 24,92±2,39 µg/mg, diyet III'de 124,07±2,77 µg/mg, diyet V'de 37,29±3,27 µg/mg ve diyet VI'da 34,32±3,44 µg/mg protein belirlenmiştir. En yüksek protein oranına sahip diyetin ticari olarak satılan, *Lymantria dispar* için geliştirilen (MP #960293) ve bu çalışmada diyet III olarak belirtilen yapay besinde beslenen yeşil kurt erginlerine ait olduğu belirlenmiştir. Proteinin böceklerde büyüme hızı, ergin ömrü, üreme kapasitesi, vücut yapısı, çiftleşme sıklığı ve yumurta verimi gibi bazı biyolojik faktörler üzerinde önemli bir rol oynadığı birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Simpson ve Raubenheimer, 1993; Nijhout, 2003). Bu çalışma kapsamında, yapılan literatür çalışmasında yeşil kurdun protein miktarının tespitine yönelik bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak diğer lepidoptera türlerinin toplam protein miktarına yönelik çalışmalar incelendiğinde, Aksoy ve ark. (2015)'te mısır koçan kurdu *Sesamia nonagrioides* (Lep:Noctuidae) larvalarında 1,96±0,116 mg, pupalarında 1,63±0,103 mg, ergin dişilerde 2,22±0,195 mg ve ergin erkeklerde 3,18±0,301 mg protein içeriği bulmuşlardır. Kuyulu ve ark. (2017) domates yaprak güvesi, *Tuta absoluta* (Lep:Gelechiidae)'nın larva, pupa ve ergin dönemlerinin toplam protein miktarını araştırmışlardır. Sonuç olarak, I. larva döneminde 63,66±1,91 µg/mg, II. larva döneminde 56,19±0,50 µg/mg, III. larva döneminde 63,34±3,76 µg/mg, dişi pupada 79,60±4,06 µg/mg, erkek pupada 85,29±2,21 µg/mg, dişi erginde 93,57±4,17 µg/mg ve erkek erginde 94,10±2,12 µg/mg protein olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmanın IV. aşamasında Çanakkale ve çevresindeki domates üretim alanlarından elde edilen yeşil kurdun genetik çeşitliliği araştırılmıştır. Toplanan *H. armigera* örneklerinin moleküler çeşitliliğinin belirlenmesinde mtDNA COI bölgesi universal primerler ile çoğaltılarak incelenmiştir. Çalışma sonucunda, 45 örneğin mtDNA COI (536 bp) dizileri elde edilmiştir. Toplamda 13 haplotip ve 13 mutasyon tespit edilmiştir. Bununla birlikte, 14 farklı popülasyon arasında 13 polimorfik bölge saptanmıştır. Ortalama haplotip çeşitliliği (h) %0,804±0,040 ve ortalama nükleotid çeşitliliği (π) %0,270±0,037 olarak hesaplanmıştır. Çalışmada yüksek genetik çeşitlilik tespit edilmesinin nedeni, bölgenin coğrafik olarak önemli bir stratejik konuma sahip olması ile birlikte, deniz ulaşımında önemli rol oynaması ve mikroklima alanlarına sahip olması bu bölgeyi dışarıdan gelecek göç alışverişine karşı açık hale getirmektedir. Haplotip çeşitliliği Yenioba (Ezine) popülasyonunda, nükleotid çeşitliliği ise Yenioba (Ezine) ve Bursa popülasyonlarında daha düşük belirlenmiştir. Albernaz ve ark. (2012) tarafından

Brezilya'da yaptıkları çalışmada, 114 *H. virescens* örneğinde yüksek haplotip çeşitliliği (h=0,524±0,056) tespit etmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada ise, Leite ve ark. (2014), *H. armigera* bireylerinin genetik çeşitliliğini araştırmışlardır. Çalışmalarında 139 adet *H. armigera* bireyinde haplotip çeşitliliğini (Hd) 0,821 ve nükleotid çeşitliliğini (Pi) 0,0028 hesaplamışlardır. Yapılan çalışmalarda nükleotid çeşitliliğinin farklı değerlerde çıkmasının, farklı çevresel koşullar ve popülasyon büyüklüğünden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Nötralite testlerinden Tajima's D ve Fu's Fs değeri popülasyonlar arasında negatif olarak belirlenmiştir. Tajima's D değeri (-1.56598) negatif bulunmuş ve istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır (P>0,05). Fu's Fs değeri (-7.423) negatif bulunmuş ve istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir (P<0,001). Leite ve ark. (2014) Brezilya'da *H. armigera* bireyleri üzerinde yaptığı genetik çeşitlilik çalışmalarında, Tajima ve Fu değerinin her ikisini de negatif olarak bulmuşlardır. Tajima's D değerinin istatistiksel olarak önemli olmadığını (P=0,07), Fu's Fs değerinin ise istatistiksel olarak önemli olduğunu (P<0,01) bildirmişlerdir. Elde edilen sonuçlarla Leite ve ark. (2014)'nın elde ettiği sonuçların uyum gösterdiği tespit edilmiştir. Nötralite testlerinin negatif değerde çıkması, popülasyonlarda özgün allellerin bulunduğunu, heterozigotluk oranının az olduğunu ve popülasyonun geçmişte büyüme yaşadığını göstermektedir.

Bu çalışmada Median-Joining Network analizinde, 45 örnekten toplamda 13 haplotip belirlenmiş olup, bu yapıya göre H1 ve H5 haplotipinin en yaygın haplotipler olduğu belirlenmiştir.

Türler arasındaki genetik akrabalıkların şematize edilmesinde kullanılan UPGMA dendogramına göre, Çanakkale ve Balıkesir popülasyonlarından elde edilen örneklerin yakın genetik çeşitliliğe sahip olduğu görülmüştür. Bursa popülasyonundan toplanılan örneklerin ise genetik çeşitliliğinin diğer popülasyonlardan farklı ve uzak olduğu belirlenmiştir.

BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada yeşil kurdun Çanakkale ve çevresindeki domates ekim alanlarında yapılan sörveylerle elde edilen yeşil kurdun laboratuvarda domates üzerinde biyolojik özelliklerinin belirlenmesi, yapay diyet üzerinde beslenebilen laboratuvar kolonisinin oluşturularak yapay diyette biyolojik özelliklerinin araştırılması, yapay diyet ile domates üzerinde beslenen bireylerin protein tayinlerinin yapılması ve özellikle Çanakkale ve çevresindeki domates üretim alanlarından elde edilen yeşil kurdun mitokondriyal DNA analizleri ile genetik çeşitliliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Yeşil kurdun doğal konukçusu olan domates üzerindeki biyolojik dönemleri incelendiğinde, yumurtaların gelişme süresi 2,6±0,54 gün ve açılma oranı %85,83 olarak belirlenmiştir. Larvaların doğal konukçusunda 6 larva dönemi geçirerek larva gelişme sürelerini 18,2±0,83 günde tamamlamıştır. Pupa döneminden önce meydana gelen pre-pupa döneminin ise 2,33±1,03 günde gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Pupa döneminde yapılan araştırmalar sonucunda, pupa gelişme süresinin 9,31±0,79 gün sürdüğü saptanmıştır. Pupa açılma oranı ise %88,4 olarak hesaplanmıştır. Dişi pupaların en, boy ve ağırlık verilerinin erkek pupalardan daha fazla olduğu belirlenmiştir. Ergin döneminde ise dişilerin ortalama 23±3,05 gün yaşadığı, erkeklerin ise 20,8±5,78 gün yaşadığı tespit edilmiştir. Bir dişinin ömrü boyunca 1096,3±105,56 adet yumurta bıraktığı gözlemlenmiştir. Yeşil kurdun yumurta döneminden ergin dönemine kadar olan gelişme süresini 30,11 günde tamamladığı tespit edilmiştir. Erginlerin kanat açıklıkları karşılaştırıldığında, dişilerin kanat açıklığı ortalama 34,5±0,57 mm ve erkeklerin kanat açıklığı ise ortalama 32,62±1,76 mm olduğu bulunmuştur.

Yeşil kurdun yapay diyet üzerinde beslenme durumları karşılaştırıldığında, formülasyonunda mısır irmiği, Brewer's mayası ve buğday ruşeyminden oluşan yapay diyet I'de beslenen larvalar en hızlı larva gelişme süresine sahip olmuştur (11,6±1,5 gün). Larva gelişme süresi en hızlı olan diğer bir yapay diyet ise 16,6±1,4 gün ile diyet II olmuştur. Kontrol olarak domates üzerinde yetiştirilen yeşil kurt larvalarının gelişme süresi 18,2±0,8 gün olarak belirlenmiştir. Yapay diyet I, ilk kez bu çalışmada yeşil kurt larvalarının yetiştirilmesinde denenmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre, yeşil kurt larvaları yapay diyet I ve yapay diyet II'de dört generasyon boyunca laboratuvarda başarılı bir şekilde yetiştirilmiş olup, bu iki yapay diyetin yeşil kurdun laboratuvarda yıl boyunca konukçusuna bağlı kalmadan yetiştirilmesinde ve adaptasyon sürecinde besin olarak uygun bir diyet olduğu belirlenmiştir. Yapay diyet çalışmalarının, yeşil kurdun laboratuvar

koşullarında kitle üretiminin yapılmasında zararlılar ile mücadele yöntemindeki çalışmalara alt yapı oluşturacağı düşünülmektedir.

Yapılan çalışmada Çanakkale (14 lokasyon), Balıkesir (1 lokasyon) ve Bursa (1 lokasyon) popülasyonlarından alınan 45 örneğin ortalama 536 bp'lik mtDNA COI bölgesi dizi analizine tabi tutulmuştur. 536 bp'lik bölgede toplamda 13 haplotip ve 13 mutasyon belirlenmiş olup, haplotipler arasında da toplamda 20 mutasyon tespit edilmiştir. Ayrıca, popülasyonlar arasında 9 özgün haplotip olduğu belirlenmiştir. Geyikli popülasyonu 2 özgün haplotip ile en fazla özgün haplotip sayısına sahip olan popülasyon olmuştur. Dümrek, Batakovası, Ayvacık, Bozcaada, Umurbey, Bursa ve Balıkesir popülasyonlarında 1 özgün haplotip tespit edilmiştir. 13 haplotip arasında en fazla mutasyon oranına sahip popülasyon ise 4 mutasyon ile H12 haplotipinde yer alan Bursa popülasyonu olmuştur. Bu veriler kapsamında, çalışmanın yürütüldüğü Çanakkale, Balıkesir ve Bursa'dan elde edilen *H. armigera* popülasyonlarında genetik çeşitliliğin yüksek olduğu, Bursa popülasyonunun genetik olarak Çanakkale ve Balıkesir popülasyonlarından farklı ve uzak olduğu tespit edilmiştir.

Ülkemizde yeşil kurt popülasyonunun genetik çeşitliliğinin belirlenmesi konusunda yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmanın ülkemizde yeşil kurdun moleküler çeşitliliğinin araştırılmasında ilk olması ile ülkemiz ve dünya literatüründe bilimsel olarak bu açığın kapatılacağı düşünülmektedir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler literatürde yeni sonuçlar olarak bulunmuş olup, özellikle Çanakkale bölgesinde bulunan *H. armigera*'nın genetik çeşitliliği bakımından önem arz etmektedir. Popülasyonlar arasındaki genetik çeşitlilik hakkında daha fazla bilginin açık bir şekilde ortaya konulmasında; örnek sayısının arttırılması, örnek toplanılacak lokasyonların genişletilmesi ve mtDNA'nın farklı gen bölgelerinin kullanılmasının uygun olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmanın sonraki çalışmalara temel alt yapı oluşturmasının teşkil etmesi beklenmektedir.

KAYNAKLAR

Adashkevich B. P., Rashidov M. I., 1989. Biological Control the Cotton Bollworm on Vegetable Crops. Zashchita Rastenii, 6: 51-52.

Ahmad N., Ashraf M., Fatıma B., Nasrullah., 1998. Potential of *Trichogramma chilonis* to Parasitize Eggs of Pink, Spotted and Spinny Bollworms of Cotton. Pakistan Journal of Zoology, 30 (1): 39-40.

Aksoy H. A., Bahadıroğlu C., Toroğlu S., 2015. Mısır Koçan Kurdu *Sesamia nonagrioides* Lefebvre (Lepidoptera: Noctuidae)'in Farklı Gelişme Evrelerinde Toplam Protein, Karbonhidrat ve Lipit Miktarı Üzerine Araştırma. Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, 3: 125-131.

Albernaz K. C., Silva-Brandao K. L., Fresia P., Consoli F. L., Omoto C., 2012. Genetic Variability and Demographic History of *Heliothis virescens* (Lepidoptera:Noctuidae) Populations from Brazil inferred by mtDNA Sequences. Bulletin of Entomological Research, 102: 333-343.

Alkan B., 1948. Orta Anadolu Hububat Zararlıları (Zararlı Hayvan ve Böcekler). A. Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları. Sayı:1, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 71 s.

Amer A. E. A., El-Sayed A. A. A., 2014. Effect of Different Host Plants and Artificial Diet on *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera:Noctuidae) Development and Growth Index. Journal of Entomology, 11 (5): 299-305.

Anonim, 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC

Anonim, 2018. TÜİK verileri. https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr

Arnemann J. A., James W. J., Walsh T. K., Guedes J. V. C., Smagghe G., Castiglioni E., Tay W. T., 2016. Mitochondrial DNA COI Characterization of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:Noctuidae) from Paraguay and Uruguay. Genetics and Molecular Research, 15 (2): 1-8.

Arnó J., Gabarra R., Roig J., Fosch T., 1999. Integrated Pest Management for Processing Tomatoes in the Ebro Delta (Spain). Acta Horticulturae, Leuven, 487 (1): 207-212.

Asokan R., Rebijith K. B., Krishna Kumar N. K., Manamohan M., 2012. Genetic Diversity of Tomato Fruit Borer, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera:Noctuidae) Inferred from Mitochondrial Cytochrome Oxidase-I (mtCO-I). Pest Management in Horticultural Ecosystems, 18 (1): 29-34.

Bandelt H. J., Forster P., Röhl A., 1999. Median-Joining Networks Forinferring Intraspecific Phylogenies. Molecular Biology and Evolution, 16 (1): 37-48.

Bathon H., Singh P., Clare G. K., 1991. Rearing Methods. In L. P. S. van der Geest (Ed.), Tortricid pests: Their Biology, Natural Enemies and Control (pp.283-309). Amsterdam, the Netherlands: Elsevier Science Publishers.

Behura K. S., 2006. Molecular Marker Systems in Insects: Current Trends and Future Avenues. Molecular Ecology, 15: 3087-3113.

Blanco C. A., Portilla M., Abel C. A., Winters H., Ford R., Street D., 2009. Soybean Flour and Wheat Germ Proportions in Artificial Diet and Their Effect on the Growth Rates of the Tobacco Budworm *Heliothis virescens*. Journal of Insect Science, 9 (59): 1-9.

Bradford M. M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry, 72 (1-2): 248-254.

Boore J. L., 1999. Animal Mitochondrial Genome. Nucleic Acids Research, 27: 1767-1780.

Brower A. V. Z., 1994. Phylogeny of *Heliconius* Butterflies Inferred from Mitochondrial DNA Sequences (Lepidoptera:Nymphalidae). Molecular and Phylogenetics Evolution, 3: 159-174.

Bueno A. F., Sosa-Gómez D. R., 2014. The Old World Bollworm in the Neotropical Region:the Experience of Brazilian Growers with *Helicoverpa armigera*. Outlooks on Pest Management, 25: 261-264.

Casimero V., Tsukuda R., Nakasuji F., Fujisaki K., 2000. Effect of Larval Diets on the Survival and Development of Larvae in the Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera:Noctuidae). Applied Entomology and Zoology, 35 (1): 69-74.

Caterino M. S., Reed R. D., Kuo M. M., Sperling F. A. H., 2001. A Partitioned Likelihood

Analysis of Swallowtail Butterfly Phylogeny (Lepidoptera:Papilionidae). Systematic Biology, 50: 106-127.

Chapman R. F., 1998. The Insects: Structure and Function (4th Edition). Cambridge University Press, UK. 770 pp.

Chaudhary J. P., Sharma S. K., 1983. Biology of Gram Pod Borer, *Heliothis armigera* (Hübner) in the Haryana State. Bulletin of Entomology, 50: 487-492.

Chen J., Wu Y. C., Chen X., Ji Y. J., Zhang D. X., 2011. A Simple and Reliable Method for Discriminating between *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera:Noctuidae). Insect Science, 18: 629-634.

Daguang L., Xiaohui L., Jiangguo H., Endong W., Qiulan H., Yongjun L., 2002. Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:Noctuidae): Large Scale Rearing and the Effect of Gamma Radiation on Selected Life History Parameters of This Pest in China. Institute for Application of Atomic Energy. http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/33/018/33018387.pdf?r=1

Daly J. C., 1988. Insecticide Resistance in *Heliothis armigera* in Australia. Pesticide Science, 23: 165-176.

Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R., 1994. DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunit I from Diverse Metazoan Invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 3: 294-299.

Fu Y. X., 1997. Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. Genetics, 147: 915-925.

Genç H., Nation J., Emmel T., 2003. Life History and Biology of *Phyciodes phaon* (Lepidoptera:Nymphalidae). Florida Entomologist, 86 (4): 445-449.

Genç H., 2005. Determination of Sex in Pupae of *Phyciodes phaon* (Lepidoptera:Nymphalidae). Florida Entomologist, 88 (4): 536-537.

Genç H., 2015. Sex Differentiation of Elm Nymphalid (*Nymphalis polychloros* Linnaeus, 1758) on Pupal Stage. International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering, 9 (8): 884-887.

Genç H., 2016. The tomato leafminer, *Tuta absoluta (*Meyrick) (Lepidoptera:Gelechiidae): Pupal Key Characters for Sexing İndividuals. Turkish Journal of Zoology, 40: 801-805.

Greene G. L., Leppla N. C., Dickerson W. A., 1976. Velvet Bean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Diet. Journal of Economic Entomology, 69: 487-488.

Gomes E. S., Santos V., Avila C. J., 2017. Biology and Fertility Life Table of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:Noctuidae) in Different Hosts. Entomological Science, 20: 419-426.

Hamed M., Nadeem S., 2008. Rearing of *Helicoverpa armigera* (Hub.) on Artificial Diets in Laboratory. Pakistan Journal of Zoology, 40 (6): 447-450.

Hebert P. D. N., Penton E. H., Burns J. M., Janzen D. H., Hallwachs W., 2004. Ten species in one: DNA Barcoding Reveals Cryptic Species in the Neotropical Skipper Butterfly Astraptes fulgerator. PNAS. 101: 14812-14817.

Ivaldi-Sender C., 1974. Techniques Simples Pour Élévage Permanent de la Tordeuse Orientale, *Grapholita molesta* (Lep.,Tortricidae), sur Milieu Artificiel. Annales de Zoologie Ecologie Animale., 6: 337-343.

Jalali S. K., Ojha R., Venkatesan T., 2015. DNA Barcoding for Identification of Agriculturally Important Insects. New Horizons in Insect Science: Towards Sustainable Pest Management: Springer, India, 13-23.

Jha R. K., Chi H., Tang L. C., 2012. A Comparison of Artificial Diet and Hybrid Sweet Corn for the Rearing of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae) Based on Life Table Characteristics. Environmental Entomology, 41 (1): 30-39.

Johns C. V., Whitehouse M. E. A., 2004. Mass Rearing of Two Larval Parasitoids of *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera:Noctuidae): *Netelia producta* (Brullé) and *Heteropelma scaposum* (Morley) (Hymenoptera:Ichneumonidae) for Field Release. Australian Journal of Entomology, 43: 83-87.

Kakimoto T., Fujisaki K., Miyatake T., 2003. Egg Laying Preference, Larval Dispersion, and Cannibalism in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:Noctuidae). Annals of the Entomological Society of America, 96 (6): 793-798.

Karaağaç U. S., Konuş M., 2012. *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae)'nın Hassas Popülasyonu Üzerinde Topikal Biyoanaliz Yöntemiyle On İki İnsektisit İçin Lethal Doz (LD_{50}) Değerlerinin Belirlenmesi. Bitki Koruma Bülteni, 52 (3): 289-298.

Kaya M., 2000. Farklı Besinlerin Yeşilkurt, *Helicoverpa armigera* (Hübn.) (Lepidoptera:Noctuidae)'nın Cinsiyet Oranı, Yumurta Verimi ve Ömrü Üzerine Etkileri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi, 10 (1): 31-36.

Kaya M., Kovancı B., 2000. Bursa İlinde Yeşilkurt, *Helicoverpa armigera* (Hübn.) (Lepidoptera:Noctuidae)'nın Biyolojisi Üzerinde Araştırmalar. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi, 10 (1): 37-43.

Kimura M., 1980. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions through Comperative Studies of Nucleotide Sequences. Journal of Molecular Evolution, 16: 111-120.

Knight A. L., Norton G. W., 1990. Economics of Agricultural Pesticide Resistance in Arthropods. Annual Review of Entomology, 34: 293-313.

Knipling E. F., 1979. The Basic Principles of Insect Population Suppresion and Management. USDA Agricultural Handbook. 512 pp.

Koçlu T., Karsavuran Y., 2000. *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae)'nin Manisa İlinde Biyolojisi ve Populasyon Düzeyi. Türkiye Entomoloji Dergisi, 24 (3): 179-194.

Konuş M., Karaağaç S. U., 2014. Adana'da Pamukta Yeşilkurt (*Helicoverpa armigera* (Hübner))'un İnsektisitlere Karşı Dayanıklılık Oranlarının Belirlenmesi. Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi, 29 (2): 106-112.

Kouhi D., Naseri B., Golizadeh A., 2014. Nutritional Performance of the Tomato Fruit Borer, *Helicoverpa armigera,* on Different Tomato Cultivars. Journal of Insect Science, 14 (102): 1-12.

Krishnareddy B., Hanur V. S., 2015. Enhanced Synthetic Diet for Rearing *Helicoverpa armigera* under Laboratory Conditions. Journal of Entomology and Zoology Studies, 3 (1): 165-167.

Krinski D., Godoy A. G., 2015. First Record of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:Noctuidae) Feeding on *Plectranthus neochilus* (Lamiales: Lamiaceae) in Brazil. Florida Entomologist, 98 (4): 1238-1240.

Kumar L., Bisht R. S., Singh H., Kumar M., 2017. Studies on Growth Development of *Helicoverpa armigera* (Hub.) on Various Hosts and Artificial Diet under Laboratory Conditions. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6 (12): 1627-1637.

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, 35: 1547-1549.

Kuyulu A., Genç H., Kahrıman F., 2017. Domates Yaprak Güvesi *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera:Noctuidae)'nin Farklı Biyolojik Dönemlerinde Protein İçeriği ve Protein Fraksiyonlarındaki Değişimin İncelenmesi. ÇOMÜ Zir. Fak. Derg., 5 (1): 79-86.

Lammers J. W., Macleod A., 2007. Report of a Pest Risk Analysis: *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808). Available at: https://secure.fera.defra.gov.uk/phiw/riskRegister/downloadExternalPra.cfm?id=3879

Leigh J. W., Bryant D., 2015. PopART: Full-feature Software for Haplotype Network Construction. Methods in Ecology and Evolution, 6: 1110-1116.

Leite N. A., Alves-Pereira A., Corrêa A. S., Zucchi M. I., Omoto C., 2014. Demographics and Genetic Variability of the New World Bollworm (*Helicoverpa zea*) and the Old World Bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. PLoS One 9:e11328.

Li Q. Q., Li D. Y., Ye H., Liu X. F., Shi W., Cao N., Duan Y. Q. Using COI Gene Sequence to Barcode Two Morphologically Alike Species: The Cotton Bollworm and The Oriental Tobacco Budworm (Lepidoptera:Noctuidae). Molecular Biology Reports, 38: 5107-5113.

Liu Z., Li D., Gong P., Wu K., 2004. Life Table Studies of the Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae), on Different Host Plants. Environmental Entomology, 33 (6): 1570-1576.

Longnecker M. P., Rogan W. J., Lucier G., 1997. The Human Health Effects of DDT (Dichlorodiphenyltrichloroethane) and Pcbs (Polychrorinated Biphenyls) and an Overview of Organochlorines in Public Health. Annual Review of Public Health, 18: 211-244.

Lunt D. H., Zhang D. X., Szymura J. M., Hewitt G. M., 1996. The Insect Cytochrome Oxidase I Gene, Evolutionary Patterns and Conserved Primers for Phylogenetic Studies. Insect Molecular Biology, 5: 153-165.

Ming Q. L., Wang C. Z., 2006. Genetic Differentiation of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *H. assulta* (Guenée) (Lepidoptera:Noctuidae) based on AFLP Markers. Insect Science, 13: 437-444.

McCaffery A. R., 1998. Resistance to Insecticides in Heliothine Lepidoptera. Philosophical Transactions of the Royal Society-Series B, 353: 1735-1750.

McFarlene J. E., 1992. Can Ascorbic Acid or β-carotene Substitute for Vitamin E in Spermiogenesis in the House Cricket. Comparative Biochemistry and Physiology, 103: 179-181.

Mironidis G. K., Savopoulou-Soultani M., 2008. Development, Survivorship and Reproduction of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:Noctuidae) Under Constant and Alternating Temperatures. Environmental Entomology, 37 (1): 16-28.

Murua M. G., Scalora F. S., Navarro F. R., Cazado L. E., Casmuz A., Villagran M. E., Lobos E., Gastaminza G., 2014. First Record of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera:Noctuidae) in Argentina. Florida Entomologist, 97: 854-856.

Naseri B., Fathipour Y., Moharramipour S., Hosseininaveh V., 2010. Nutritional Indicates of the Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera*, on 13 Soybean Varieties. Journal of Insect Science, 10 (151): 1-14.

Nasreen A., Mustafa G., 2000. Biology of *Helicoverpa armigera* (Hübner) Reared in Laboratory on Natural Diet. Pakistan Journal of Biological Sciences, 3 (10): 1668-1669.

Nation J. L., 2015. Insect Physiology and Biochemistry. Third Edition. CRC Press. 78 pp.

Nei M., 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York,

NY. 512 pp.

Nijhout H. F., 2003. The Control of Body Size in Insects. Developmental Biology, 261 (1): 1-9.

Nunes M. L. S., Figueiredo L. L., Andrade R. S., Rezende J. M., Czepak C., Albernaz-Godinho K. C., 2017. Biology of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae) Rearing on Artificial or Natural Diet in Laboratory. Journal of Entomology, 14 (4): 168-175.

Öngören K., Kaya N., Türkmen Ş., 1977. Ege Bölgesinde Zarar Yapan Yeşil Kurt (*Heliothis armigera* Hb.)'un Morfolojisi, Biyoekolojisi ve Mücadelesi Üzerinde Araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni, 17 (1): 3-28.

Patel R. S., Patel K. A., Patil K. S., Toke N. R., 2011. Biology of *Helicoverpa armigera* Hub. on Rose in Laboratory Condition. Pest Management in Horticultural Ecosystems, 17 (2): 144-148.

Poitout S., Bues R., 1970. Elevage de Plusfeurs Especes de Lepidopteres Noctuidae Sur Milieu Artificiel Riche et Sur Milieu Artificiel Simplifie. Annales de Zoologie Ecologie Animale, 2: 79-91.

Rabari G. N., Pareek A., Patel B. R., 2017a. Comparative Biology of *Helicoverpa armigera* (Hübner) Reared on Different Hosts. International Journal of Pure and Applied Bioscience, 5 (1): 849-856.

Rabari G. N., Pareek A., Patel B. R., 2017b. Comparative Biology of *Helicoverpa armigera* (Hübner) Reared on Tomato During Different Seasons. Journal of Entomology and Zoology Studies, 5 (2): 657-663.

Romeis J., Shanower T. G., 1996. Arthropod Natural Enemies of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae) in India. Biocontrol Science and Technology, 6: 481-508.

Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J. C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S. E., Sánchez-Gracia A., 2017. DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. Molecular Biology and Evolution, 34 (12): 3299-3302.

Saitou N., Nei M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing

phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4: 406-425.

Sathe T. V., Bhosle Y. A., 2001. Insect Pest Predators. Daya Publishing House, Delhi. pp. 1-69.

Shaver T. N., Raulston J. R., 1971. A Soybean-Wheat Germ Diet for Rearing the Tobacco Budworm. Annals of the Entomological Society of America, 58: 522-524.

Shorey H. N., Hale R. L., 1965. Mass-Rearing of The Larvae of Nine Noctuid Species on a Simple Artificial Medium. Journal of Economic Entomology, 58: 522-525.

Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P., 1994. Evolution, Weighting, and a Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction. Annals of the Entomological Society of America, 87: 651-701.

Simpson S. J., Raubenheimer D., 1993. A Multi-Level Analysis of Feeding Behaviour: The Geometry of Nutritional Decisions. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 342: 381-402.

Suits R., Reisig D., Burrack H., 2017. Feeding Preference and Performance of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera:Noctuidae) Larvae on Various Soybean Tissue Types. Florida Entomologist, 100 (1): 162-167.

Şimşek M., Kondur Y., Özkan C., 2015. Besin Durumunun *Helicoverpa armigera* (Hüb.) (Lepidoptera:Noctuidae) Üzerinde Yetiştirilen *Hyposoter didymator* (Thun.) (Hymenoptera:Ichneumonidae) Erginlerinin Laboratuvar Koşullarında Yaşam Süresine Etkisi. Anadolu Orman Araştırmaları Dergisi, 1 (1-2): 50-55.

Tahhan O., Hariri G., 1984. Preliminary Study of Trapping *Heliothis armigera* (Hb.) with Pheromones at Icarda, Syria. International Chickpea Newsletter, 6: 19-23.

Tajima F., 1983. Evolutionary Relationship of DNA Sequences in Finite Populations. Genetics, 105: 437-460.

Tajima F., 1989. The Effect of Change in Population Size on DNA Polymorphism. Genetics, 123: 585-595.

Tamer A., 1977. The Development of Tobacco Budworm, *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera:Noctuidae) on Different Artificial Diets. Türkiye Entomoloji Dergisi,

21 (1): 27-36.

Tamura K., 1992. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions when There are Strong Transition-Transversion and G + C-content Biases. Molecular Biology and Evolution, 9: 678-687.

Tay W. T., Behere G. T., Heckel D. G., Lee S. F., Batterham P., 2008. Exon-primed intron-crossing (EPIC) PCR markers of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:Noctuidae). Bulletin of Entomological Research, 98: 509-518.

Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J., 1994. CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. Nucleic Acids Research, 22 (22): 4673-4680.

Tobias V. I., 1995. Keys to Insect of The European Part of U.S.S.R., Ed.; G.S. Medvedev, 3 (4) New Delhi, Baba Barkha Nath, p.900.

Tripathi S. R., Sharma S. K., 1985. Biology of *Heliothis armigera* (Hübner) (Lep.:Noctuidae) in the Treai Belt of eastern Uttar Pradesh, India. Indian Journal of Entomology, 50 (1): 76-81.

Uğurlu S., Gürkan M. O., 2007. Insecticide Resistance in *Helicoverpa armigera* from Cotton Growing Areas in Turkey. Phytoparasitica, 35 (4): 376-379.

Uğurlu S., Konuş M., İşgör B., İşcan M., 2007. Pyrethroid Resistance and Possible Involvement of Glutathione S-transferases in *Helicoverpa armigera* from Turkey. Phytoparasitica, 35 (1): 23-26.

Vanderzant E. S., 1974. Development, Significance and Application of Artificial Diets for Insects. Annual Review of Entomology, 19: 139-160.

Venkatesan T., Sridhar V., Tomason Y. R., Jalali S. K., Behere G. T., Shanthi R. M., Kumar R., Vajja V. G., Nimmakayala P., Reddy U. K., 2016. Use of Expressed Sequence Tag Microsatellite Markers for Population Genetic Research of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:Noctuidae) from India. Entomological Society of Canada, 148: 187-199.

War A. R., Hugar S. V., Rahman S. J., Sharma H. C., 2016. Orientation Behaviour of

Helicoverpa armigera Egg Parasitoid, *Trichogramma chilonis* and The Larval Parasitoid, *Campoletis chlorideae* Towards Different Groundnut Genotypes. Biocontrol Science and Technology, 26 (10): 1420-1431.

Wu K. J., Gong P. Y., 1997. A New and Pratical Artificial Diet for the Cotton Bollworm. Entomologia Sinica, 14 (3): 227-282.

Yabaş M. N., Özer M., 1980. Çukurova Bölgesinde *Helicoverpa armigera* Hbn. ve *Heliothis peltigera* Schiff'nın Işık Tuzakları ile Ergin Populasyon Eğrilerinin Elde Edilmesi ve Ay Fazları ile İlişkileri. Adana, 201 s.

Yenagi B. S., Patil V. C., Biradar D. P., Khadi B. M., 2012. Molecular Diversity of Cotton Bollworm (*Helicoverpa armigera* Hübner) Using Rapd Markers. Middle-East Journal of Scientific Research, 11 (1): 61-65.

Yılmaz Ç., Genç H., 2012. Determination of the Life Cycle of the Olive Fruit Leaf Moth, *Palpita unionalis* (Lepidoptera:Pyralidae) in the Laboratory. Florida Entomologist, 95 (1): 162-170.

You L. S., Lei R. H., Jiang J. X., Bo L. Y., Xiao Z. S., 2002. Bionomic of *Campoletis chlorideae* (Hymenoptera:Ichneumonidae) as a Parasitoid of The Cotton Bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:Noctuidae). Entomologia Sinica, 9: 29-37.

Zhang D. X., Hewitt G. M., 1996. Nuclear Integrations: Challenges for Mitochondrial DNA Markers. Trends in Ecology & Evolution, 11: 247-251.

Zhou X., Faktor O., Applebaum S. W., Coll M., 2000. Population Structure of the Pestiferous Moth *Helicoverpa armigera* in the Eastern Mediterranean using RAPD Analysis. The Genetical Society of Great Britain, Heredity, 85: 251-256.

Zobar D., Genç H., 2008. Biology of the Queen of Spain Fritillary, *Issoria lathonia* (Lepidoptera:Nymphalidae). Florida Entomologist, 91 (2): 237-240.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Seda YÜCEL

Doğum Yeri : Çanakkale

Doğum Tarihi : 02.08.1992

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI -Diğer

Kuyulu A., Yücel S., Genç H., 2019. Molecular Identification of *Zaprionus tuberculatus* (Diptera: Drosophilidae) in Çanakkale, Turkey. Turkish Journal of Zoology, vol. (In Press), pp. (In Press).

Yücel S., Genç H., 2018. Laboratory Rearing of Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) Wild Colony on Different Artificial Diets. Journal of Applied Biological Science, 12: 26-32.

Yücel S., Genç H., 2018. Çanakkale İli Domates Ekim Alanlarındaki Yeşil Kurt, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)'nın Yayılışı ve Bulaşıklık Durumunun Belirlenmesi. ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 6: 115-122.

Genç H., Yücel S., Akçal A., 2017. Observation of *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) Infestation on *Gladiolus grandiflorus* (*Iridaceae*) in Çanakkale. ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 5 (1): 105-114.

Genç H., Yücel S., 2017. Determination of Host Preferences of Medfly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), in the Laboratory. Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences, 4 (3): 292-301.

b) Bildiriler -Uluslararası -Ulusal

Jeke L., Yücel S., Kuyulu A., Genç H., 2019. Comparison of the Laboratory Performance of Two Populations of Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). 1st International Symposium on Biodiversity Research, 2-4 May 2019, Çanakkale, 557-563.

Kuyulu A., Yücel S., Genç H., 2019. Molecular Identification of *Zaprionus tuberculatus* (Diptera: Drosophilidae) in Çanakkale, Turkey. 1st International Symposium on Biodiversity Research, 2-4 May 2019, Çanakkale, 556 pp.

Genç H., Yücel S., Kuyulu A., 2019. Molecular Identification of *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) in Çanakkale. 1st International Molecular Plant Protection Congress, 10-13 April 2019, Adana, 89 pp.

Yücel S., Genç H., 2019. Genetic Diversity of Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) Population in Çanakkale. 1st International Molecular Plant Protection Congress, 10-13 April 2019, Adana, 61 pp.

Yücel S., Genç H., 2017. *Carpophilus hemipterus* (Coleoptera: Nitidulidae)'un Biyolojik Gelişme Dönemlerinin Belirlenmesi. Trakya Üniversiteler Birliği İkinci Lisansüstü Öğrenci Kongresi, 15-16 Mayıs 2017, Edirne, 57 pp.

Yücel S., Genç H., 2017. Yeşil Kurt, *Helicoverpa armigera* (Hübn.) (Lepidoptera: Noctuidae)'un Farklı Yapay Diyetler Üzerinde Beslenmesi. Trakya Üniversiteler Birliği İkinci Lisansüstü Öğrenci Kongresi, 15-16 Mayıs 2017, Edirne, 56 pp.

Yücel S., Genç H., 2017. Pamuklu Bit, *Euphyllura phillyreae* (Hemiptera: Psyllidae)'nin Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi. Trakya Üniversiteler Birliği İkinci Lisansüstü Öğrenci Kongresi, 15-16 Mayıs 2017, Edirne, 55 pp.

Yücel S., Genç H., 2016. Yeşil Kurt, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)'nın Genetik Çeşitliliğinin Belirlenmesi. Trakya Üniversiteler Birliği Lisansüstü Öğrenci Kongresi, 29-30 Nisan 2016, Çanakkale, 42 pp.

Yücel S., Genç H., 2016. Mısırda Tespit Edilen *Cryptophagous* sp. (Coleoptera: Cryptophagidae)'nün Bazı Dış Morfolojik Özelliklerinin Araştırılması. Trakya Üniversiteler Birliği Lisansüstü Öğrenci Kongresi, 29-30 Nisan 2016, Çanakkale, 41 pp.

Yücel S., Genç H., 2016. İki Psocid Türünün, *Liposcelis* sp. (Psocoptera: Liposcelididae) ve *Lachesilla* sp. (Psocoptera: Lachesillidae) Morfolojik Karakterlerinin Belirlenmesi. Trakya Üniversiteler Birliği Lisansüstü Öğrenci Kongresi, 29-30 Nisan 2016, Çanakkale, 40 pp.

Genç H., Yücel S., 2015. Çevre İndikatörü Olan İpek Böceği, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae)'nin Doğal Konukçusu Üzerinde Beslenmesinin ve Üretiminin Arttırılması İçin Yapılan Bir Çalışma. XII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 14-17 Eylül 2015, Muğla, 189 pp.

Genç H., Bayındır A., Yücel S., 2015. 13 Yaş Grubu Öğrencilerinin Böcekleri Tanımaları ve Farkındalık Yaratma Yeteneği Kazanmaları: Yaz Bilim Kampı Örneği. XII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 14-17 Eylül 2015, Muğla, 188 pp.

Yücel S., Genç H., 2015. Farklı Ticari Kitler Kullanılarak Mısır Koçan Kurdu (*Sesamia nonagrioides* (Lef.) (Lepidoptera: Noctuidae)'nun Genomik DNA İzolasyonu. 11. Tarla Bitkileri Kongresi, 7-10 Eylül 2015, Çanakkale, 463-465.

c) Katıldığı Projeler

BAP (Bilimsel Araştırmalar Projesi) "Doğadan Toplanan Akdeniz Meyve Sineği (*Ceratitis capitata* Wiedemann Diptera: Tephritidae)'nin Laboratuvar Koşullarına Adaptasyonu ve Laboratuvar Kolonisinin Elde Edilmesi." FHD-2016-1104 nolu proje (Yardımcı Araştırmacı)

TÜBİTAK "Sihirli Dünyalara Açılan Kapılar ve Bilime Yolculuk Yaz Bilim Kampı" Eğitim Projesi. 2018 (Yardımcı Eğitmen)

BAP (Bilimsel Araştırmalar Projesi) "Yeşil Kurt, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae):Laboratuvar Koşullarında Bazı Biyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Moleküler Karakterizasyonu." FYL-2018-2466 nolu proje (Araştırmacı)

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl :

İLETİŞİM

E-posta Adresi : yucel-seda@hotmail.com