



***Neodiprion sertifer* (GEOFFR) (HYMENOPTERA:
DİPRİONİDAE)'İN BAKTERİYEL FLORASININ ARAŞTIRILMASI**

Başak YILDIRIM

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Nurcan ALBAYRAK İSKENDER
2018**

Artvin

T.C.
ARTVİN ÇORUH ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Neodiprion sertifer (GEOFFR) (HYMENOPTERA:
DİPRİONİDAE)'İN BAKTERİYEL FLORASININ ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Başak YILDIRIM

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Nurcan ALBAYRAK İSKENDER

Artvin-2008

TEZ BEYANNAMESİ

Artvin Çoruh Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Neodiprion sertifer* (geoffr) (Hymenoptera: Diprionidae)’in bakteriyel florasının araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nurcan ALBAYRAK İSKENDER’in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 01/06/2018

Başak YILDIRIM

T.C.
ARTVİN ÇORUH ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Neodiprion sertifer (GEOFFR) (HYMENOPTERA:
DİPRİONİDAE)'İN BAKTERİYEL FLORASININ ARAŞTIRILMASI

Başak YILDIRIM

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 23/05/2018

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 01/06/2018

Tez Danışmanı : Dr.Öğr. Üyesi Nurcan ALBAYRAK İSKENDER

Jüri Üyesi : Dr.Öğr. Üyesi Hazan ALKAN AKINCI

Jüri Üyesi : Dr.Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ

ONAY:

Bu Yüksek Lisans Tezi, Artvin Çoruh Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından .../06/2018 tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun .../06/2018 tarih vesayılı kararıyla kabul edilmiştir.

.../06/2018

Doç. Dr. Hilal TURGUT

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“*Neodiprion sertifer* (Geoffr) (Hymenoptera: Diprionidae)’in bakteriyel florasının araştırılması” konusunda yapılan bu çalışma; Artvin Çoruh Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışmalarında her türlü desteği sağlayan, görüş ve bilgi birikiminden sürekli yararlandığım değerli Danışman Hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nurcan ALBAYRAK İSKENDER’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını gördüğüm Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül SARAL hocama, arazi çalışmalarının yürütülmesinde yardımcı olan Sayın Biyolog Yaşar AKSU ve Sayın Öğr. Görev. Ömer İSKENDER’e içtenlikle teşekkür ederim.

Bu çalışma Artvin Çoruh Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimince 2016.M80.02.07 kod nolu projeyle desteklenmiştir. Çalışmamın yürütülmesine maddi destek sağlayan Artvin Çoruh Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğüne teşekkürlerimi sunar, araştırmamın bilim dünyasına yararlı olmasını dilerim.

Başak YILDIRIM
Artvin - 2018

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TEZ BEYANNAMESİ	I
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET	IV
SUMMARY	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
TABLolar DİZİNİ.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
1. GİRİŞ	1
1.1. Böcek Bakteriyel Florası	1
1.2. Bakteriyel Tanılama	3
1.3. <i>Neodiprion sertifer</i> (Geoffroy, 1785)	6
1.3.1. <i>Neodiprion sertifer</i> 'in Biyolojik Gelişim Evreleri	6
1.3.2. <i>Neodiprion sertifer</i> 'in Zararı	8
1.3.3. <i>Neodiprion sertifer</i> 'in Yayılışı	10
1.3.4. <i>Neodiprion sertifer</i> 'in Zarar Yaptığı Bitkiler	12
1.3.5. <i>Neodiprion sertifer</i> 'in Biyolojisi	12
1.3.6. <i>Neodiprion sertifer</i> 'in Parazitoit ve Avcıları	12
1.3.7. <i>Neodiprion sertifer</i> 'le Mücadele Yöntemleri	13
2. MATERYAL VE YÖNTEM	17
2.1. Materyal	17
2.1.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar	17
2.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar	18
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Bakterial İzolatlar	18
2.1.4. İzolasyon İşlemlerinde Kullanılan Böcek Türü	18
2.2. Yöntem	18
2.2.1. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması	18
2.2.2. Örneklerinin Toplanması	20

2.2.3.	Bakterilerin İzolasyonu ve Stoklanması	20
2.2.4.	Bakterilerin Karakterizasyonu	21
2.2.5.	Bakteriyel İzolatların 16S rRNA Dizi Analizi ile Tanınması	24
3.	BULGULAR	28
3.1.	<i>N. sertifer</i> 'den İzole Edilen Bakteriler.....	28
3.2.	İzolatların Morfolojik Özellikleri	28
3.3.	İzolatların Biyokimyasal Karakteristikleri	30
3.4.	Bakteriyel İzolatların 16S rRNA Dizi Analizi Sonuçları ve Filogenetik Ağaç	37
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ	40
	KAYNAKLAR	45
	EKLER	54
	ÖZGEÇMİŞ	61

ÖZET

Neodiprion sertifer (GEOFFR) (HYMENOPTERA: DIPRIONIDAE)'İN BAKTERİYEL FLORASININ ARAŞTIRILMASI

Kırmızımtrak sarı çalı antenli yaprakarı *Neodiprion sertifer* (Geoffr) (Hymenoptera: Diprionidae) çam ormanlarının en önemli zararlılarından biridir. Bu çalışmada, yeni biyolojik kontrol ajanları geliştirebilmek için zararlının bakteriyel florası araştırıldı. *N. sertifer*'den 7 cinse ait toplam 13 bakteri izole edildi. Bakteriyel izolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri (API 20 E, API 50 CH kitleriyle) konvensiyonel ve rutin tekniklerle belirlendi. Ayrıca, 16S rRNA gen sekans analizi izolatları moleküler seviyede tanımlamak için kullanıldı. Yapılan çalışmalara ve 16S rRNA gen sekans analizi verilerine dayanılarak izolatlar; *Pseudomonas* sp. (Ns1), *Staphylococcus* sp. (Ns2), *Bacillus megaterium* (Ns3), *Klebsiella oxytoca* (Ns4), *Klebsiella oxytoca* (Ns5), *Staphylococcus* sp. (Ns6), *Klebsiella oxytoca* (Ns7), *Raoultella planticola* (Ns8), *Pantoea agglomerans* (Ns9), *Staphylococcus pasteurii* (Ns10), *Pantoea agglomerans* (Ns11), *Acinetobacter lwoffii* (Ns12) ve *Pantoea agglomerans* (Ns13) olarak tanımlandı. Bilgilerimize dayanarak bu çalışma, *N. sertifer*'in bakteriyel florası üzerine yapılmış ilk literatürdür.

Anahtar Kelimeler: *Neodiprion sertifer*, çam, bakteriyel flora, 16S rRNA.

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE BACTERIAL FLORA OF *Neodiprion sertifer* (GEOFFR) (HYMENOPTERA: DIPRIONIDAE)

The European pine sawfly *Neodiprion sertifer* (Geoffr) (Hymenoptera: Diprionidae) is one of the most pest for pine forest. In this study, bacterial flora of the pest was investigated to develop a new biological control agent. A total 13 bacteria species belonging to 7 genera were isolated from *N. sertifer*. Morphological and biochemical characteristics of bacterial isolates were determined by conventional (with API 20E and API 50CH strips) and routine techniques. Additionally, a 16S rRNA gene sequence analysis was performed to identify the isolates at the molecular level. Based on these studies and 16S rRNA gene sequence analysis results, isolates were identified as *Pseudomonas* sp. (Ns1), *Staphylococcus* sp. (Ns2), *Bacillus megaterium* (Ns3), *Klebsiella oxytoca* (Ns4), *Klebsiella oxytoca* (Ns5), *Staphylococcus* sp. (Ns6), *Klebsiella oxytoca* (Ns7), *Raoultella planticola* (Ns8), *Pantoea agglomerans* (Ns9), *Staphylococcus pasteurii* (Ns10), *Pantoea agglomerans* (Ns11), *Acinetobacter lwoffii* (Ns12) and *Pantoea agglomerans* (Ns13). To our knowledge, this is the first report in the literature on the bacterial flora of *N. sertifer*.

Keywords: : *Neodiprion sertifer*, pine, bacterial flora, 16S rRNA.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. <i>Neodiprion sertifer</i> 'in Biyolojik Gelişim Evreleri; a: <i>N. sertifer</i> 'in erkeği, b: <i>N. sertifer</i> 'in dişisi, c: yumurta, d-e: larva, f: pupa	9
Şekil 2. <i>N. sertifer</i> 'in Türkiye'de Yayılış Alanları	10
Şekil 3. <i>N. sertifer</i> 'in Dünyada Yayılış Alanları	11
Şekil 4. <i>N. sertifer</i> izolatlarının API 20 E test kitleri ile verdiği reaksiyonlar	31
Şekil 5. <i>N. sertifer</i> izolatlarının API 50 CHB test kitleri ile verdiği reaksiyonlar	33
Şekil 6. 16S rRNA gen sekans analizine göre <i>N.sertifer</i> 'den izole edilen bakterilerin filogenetik yakınlıkları (MEGA Software 6.06.)	39

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. <i>N.sertifera</i> 'den izole edilen bakterilerin morfolojik özellikleri	29
Tablo 2. Konvensiyonel ve API 20 E test kitlerine göre Gr (-) izolatların biyokimyasal karakteristikleri	34
Tablo 3. Konvensiyonel ve API 50 CHB test kitlerine göre Gr (-) izolatların biyokimyasal karakteristikleri	35
Tablo 4. 16S rRNA gen sekans analizine göre <i>N.sertifera</i> 'den izole edilen bakterilerin identifikasyonu.....	38

SİMGELER VE KISATMALAR DİZİNİ

DNA	Deoksiribonükleotik asit
dNTP	Deoksinükleotittrifosfat
g	Gram
KOH	Potasyum hidroksit
L	Litre
ml	Mililitre
μ l	Mikrolitre
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
bp	baz çifti

1. GİRİŞ

1. 1. Böcek Bakteriyel Florası

Böcekler yeryüzündeki tüm tür çeşitliliğinin en az yarısını oluşturmaktadırlar. Dünya üzerinde tahminen 1 milyonun üzerinde böcek türü tanımlanabilmiştir. Şüphesiz bu sonucun böceklerin gerçek tür zenginliğini yansıtmaktan uzak olduğu da açıktır. Tür zenginliğinin en göze çarpan takımlarını kınkanatlılar (Coleoptera), pul kanatlılar, güveler (Lepidoptera), sinekler (Diptera), arılar, karıncalar (Hymenoptera), ve gerçek yarımkanatlılar (Hemiptera) meydana getirmektedir. Coleoptera takımı 350.000'den fazla tür sayısı ile başı çekerken her biri en az 150.000 türe sahip Lepidoptera ve Diptera takımları bunu izlemekte, Hymenoptera takımı ise 115.000'den fazla tür sayısı ile neredeyse 100.000 tanımlanmış tür içeren Hemiptera takımından daha zengin görünmektedir (Gullan ve Cranston, 2012).

Mikroorganizmalar; bakteriler, virüsler ve küçük ökaryotlardan oluşur. Bunlardan birçoğu belirli böcek cinsleri ve familyalarına özgüdür, patojenik özelliğe sahip olanları ise genellikle böcekler için ölüm nedenidir. Böceğin çevresi ve çoğunlukla da toprak, enfeksiyona yol açan organizmaları, sporları ve viral partikülleri içerir. Virüsler, bakteriler, nematodlar ve protistler genellikle ağız yoluyla vücuda girer. (Gullan ve Cranston, 2012).

Böceklerin bakteriyel floraları bağırsaklarında yer alır. Zengin ve çeşitlilik gösteren bu floranın üyelerini Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler meydana getirir. Bu bakterilerin çoğu saprofit olup doğada yaygın olarak bulunurlar. Diğerleri ise böcekler için spesifik obligat anaeroplardır (Demirbağ vd., 2008; Tanada ve Kaya, 1993).

Böceklerde çeşitli mikroorganizmalar kolonize olur. Sindirim sistemi mikroflorası faydalıdan patolojik olana kadar pekçok etkileşime ev sahipliği yapar (Yun vd., 2014). Ayrıca, bakteriyel floranın internal üyeleri, konakları olan böceklerin beslenme, besin sindirimine yardımcı olma, enzim üretme, vitamin sentezleme, azot

bağlama, feromon üretme, diğer mikroorganizmaların böceğe kontaminasyonunu önleme gibi pek çok yönden fayda sağlarken aynı zamanda konaklarının fizyolojisi ve davranışlarında da çok önemli roller oynar (Tanada ve Kaya, 1993; Chen vd., 2016).

Tabiatta zararlı türlerin hastalanıp ölmesine yol açan, orijini bakteri, mantar, virüs veya protozoon olan pek çok mikroorganizma türü mevcuttur. Bunlar hastalandırdıkları zararlıyı, gelişmeyi durdurmak ve ölümüne sebebiyet vermek suretiyle kontrol edebilmektedirler. Bu patojen mikroorganizmaların, zararlı böceklere karşı yapılacak mücadelelerde kullanım şartları ve imkanlarını tespit amacıyla çeşitli ülkelerde büyük çapta araştırmalar yapılmaktadır. Zararlılarla savaşta mikroorganizmalardan yararlanılarak yapılan savaşa “mikrobiyal savaş” denir (Oğurlu, 2000).

Doğal ya da kültüre edilmiş böcek popülasyonlarında hastalığa yol açan mikroorganizmalar, böceklerin öteki doğal düşmanları gibi biyolojik mücadelede etkin olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptir (Gullan ve Cranston, 2012).

Bakteriler böceklerde nadiren hastalığa yol açarlar, bununla birlikte ölümün gerçek sebebini gizleyebilen saprofitik bakteriler genellikle ölü böcekleri istila eder. Bakterilerin çok azı zararlıların kontrolünde kullanılmaktadır, ancak bazılarının belirli zararlılara karşı kullanışlı entomopatojenler oldukları kanıtlanmıştır (Gullan ve Cranston, 2012).

Böcekler dünyasında biyolojik çeşitlilik en yüksek düzeydedir. Böceklerin beslenme, metabolizma ve yaşam alanlarındaki çeşitlilik, doğal olarak onların mikrobiyal floralarında yansımakta ve bu durum böceklerin vücut florasından yeni tür ve suşların izolasyon şansını artırmaktadır. Üstelik böcek mikroflorasının bilinmesi, onların beslenme fizyolojisi, bağırsak ekosistemleri, çeşitli mikrobiyal hücumlardan etkilenme ve onlara direnç oluşturma mekanizmaları gibi konuların aydınlatılması hususunda önemli ipuçları vermektedir (Albayrak-İskender ve Algur, 2009).

Yukarıda da özetlenmeye çalışılan nedenlerden dolayı böceklerin bakteriyel floraları üzerine yapılmış pek çok çalışma vardır (Moraes vd., 2000; Sezen vd., 2001; Osborn

vd., 2002; Dharne vd., 2006; Albayrak-İskender ve Algur, 2009; Sevim vd., 2012; Rizzi vd., 2013; Albayrak-İskender vd., 2017a, 2017b, 2017c).

Ancak, araştırmaların *N.sertifera*'un bakteriyel florasını ortaya koymaktan uzak olduğu görülmüştür. *N. sertifera* ölkemiz ve dünyada ki çam ormanlarında görölen bir zararlıdır. Bu çalışmada, zararlıdan ilk kez bakteriyel izolatlar elde edilmiştir.

1.2. Bakteriyel Tanılama

Biyoloji ile alakalı alanlarda çalışan araştırmacılar için doğal ortamlarda veya canlılarda yaşayan mikroorganizmaların tanı ve teşhisi ortak bir gayedir. Mikroorganizmalar geleneksel ve/veya moleküler yöntemler kullanılarak tanılanmaktadır. Geleneksel tanılama yöntemleri içerisinde; saf költürlerin mikroskopik incelenmesi, boyama reaksiyonları, koloni özellikleri, oksijen gereksinimleri, fizyolojik, biyokimyasal özellikler ve serolojik yöntemler yer almaktadır. Ancak, mikroorganizmaların daha çok fenotipik karakterleri hakkında bilgi veren, el becerisi gerektiren klasik yöntemler birçok dezavantajı da beraberinde getirmektedir. Bu dezavantajlar arasında; bu yöntemlerin tür ve cins seviyesinde daha az özgülük göstermesi, daha az ayırım gücünün olması, testlerin yapılması için geniş mekanlara ihtiyaç duyulması, fazla zaman ve iş gücü gerektirmesi, ekonomik olmaması, çoğu zaman alternatif yorum ve tartışmalara açık olması sayılabilir. Bu nedenle, günümüzde kullanılan moleküler yöntemler bu dezavantajların aşılmasında yeni bir yol açmıştır (Khatib, 2014; Bou vd., 2011; şahin, 1999).

Moleküler yöntemlerde karbonhidratlar, lipitler, proteinler ve nükleik asitler (DNA ve RNA) çalışma aracıdır. Bunlardan biri veya birkaçının kullanımıyla mikroorganizmaların tanı ve teşhisi gerçekleştirilmektedir.

Son yıllarda sıklıkla kullanılan moleküler yöntemler; seroloji (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA), elektroforez (protein, DNA, RNA), metabolik profiller (BIOLOG), gen amplifikasyonu ve genetik profiller (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP, Polymerase Chain Reaction: PCR, Repetitive Extragenic Palindromic PCR: Rep-PCR, Randomly Amplified Polimorphic Detection: RAPD vb.) ve yağ asitleri profillerinin (Fatty Acid Methly Ester Analysis:

FAME) analizidir. Bunlardan ELISA, PCR, FAME ve BIOLOG testleri tamamen bilgisayar kontrolünde olup, rutin testlerin yapıldığı laboratuvarlarda mikroorganizmanın tanı ve teşhisinde kullanılmaktadır (Şahin, 1999).

Bu teknikler arasında en çok kullanılanı Karry Mullis tarafından 1985’de keşfedilen Polimeraz zincir reaksiyonu PCR’dir. Bu keşif DNA analizlerinin alanını genişletip, beraberinde moleküler biyolojinin tıp, ziraat ve biyoteknolojinin geleneksel sahası dışındaki yan alanlarda yeni uygulamalara yol açmıştır (Brown 2009).

PCR reaksiyonunda temel olarak bulunması gereken maddeler; kalıp DNA, primerler (Forward-F,Reverse-R), dNTP’ler (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP), Taq DNA Polimeraz enzimi, buffer ve magnezyum klorür (MgCl₂)’dür (Wilson, 1997). Reaksiyon, PCR bileşenleri ve DNA’nın test tüpünde birleştirilmesi ve bu birleşim maddelerini içeren test tüpünün seçilen programla belirlenen sıcaklık değerlerine otomatik olarak ulaşmasını sağlayan PCR cihazına yerleştirilmesiyle başlatılmış olur (Brown, 2009). Sonuçta, istenilen organizmanın genomik DNA’sının spesifik kısımlarının *in vitro* şartlarda kısa zincirli oligonükleotid primerlerle enzimatik olarak sentezlenmesi sağlanır.

PCR üç farklı basamaklı bir reaksiyon serisinden oluşmaktadır:

Denatürasyon basamağı: Çift zincirli DNA moleküllerine 90°C’nin üzerindeki sıcaklıkla muamele edilerek, zincirlerin birbirlerinden ayrılmasının sağlandığı basamaktır.

Oligonükleotid primerlerin hedef bölgelerle bağlanması: DNA molekülünün birbirlerinden ayrılan tek zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen (komplementer) bölgelerinin oligonükleotid primerlerle bağlandığı basamaktır. Bu işlem için cihaz gerekli olan ısı derecesine getirilir. Bu sıcaklık (T_m) değeri hesaplanırken, A ile T bazlarının her birine göre 2°C, G ile C bazlarının her birine göre ise 4°C esas alınır. Ancak T_m sıcaklığı bunun 5°C altındadır.

Uzama basamağı: Taq DNA polimeraz enziminin primerin 3’ ucuna yeni nükleotidleri ekleyerek zincirin uzamasını sağlayan basamaktır. Bu sayede iki primerin kısıtladığı, genellikle 100 ile birkaç yüz baza kadar olan bölge çoğaltılır.

Tüm bu aşamalar bir PCR döngüsünü oluşturmaktadır. Her döngü sonrası hedef DNA'nın çoğaltılan kısmı iki katına çıkar (Barış, 2008; Brown 2006; Şahin vd 2000).

PCR tekniği günümüzde, temel moleküler biyolojik araştırmalarda (klonlama, dizi analizi ve DNA haritalaması gibi), klinik tıpta (orak hücre anemisi, kistik fibrozis, AIDS, lösemi tanısı gibi), analık babalık tayininde, tıbbın diğer kollarında, *in vitro* şartlarda çoğalabilen veya çoğalamayan patojen mikroorganizmaların neden oldukları hastalıkların tespitinde, tabiattaki farklı canlı türlerinin teşhisinde, türler arasındaki biyoçeşitlilik, adaptasyon ve genetik varyasyonla bağlantılı polimorfizmin ortaya çıkarılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Arı 1999).

1980'lerden beri geliştirilen yöntemlerle bakterilerin tanılanabilmesine olanaklar sağlanmıştır. Bakteriler arasındaki filogenetik yakınlığı ortaya çıkarabilmek için genetik kodun değişmeyen bölgelerinin karşılaştırılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla, bakterilerin sınıflandırılmasında yaygın olarak 16S rRNA gen bölgesi kullanılmaktadır. 16S rRNA gen bölgesi 16S rDNA'dan oluşur. 16S rRNA bölgesi mutasyona kapalı ve korunmuş bölgedir (Öztürk, 2007; Woese vd., 1983).

PCR kullanımı ve DNA dizileme çalışmalarının 2000'li yıllardan itibaren yaygınlaşması neticesinde; 16S rRNA gen bölgesinin dizilenmesi, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakteriyel izolatların doğru şekilde tanımlanmasında ve yeni suşların literatüre kazandırılmasında kilit nokta olmuştur. 16S rRNA gen dizilerine dayalı olarak yapılan sınıflandırma, fenotipik tiplendirmeye dayalı sınıflandırmadan çok daha objektif ve güvenilir bir sınıflandırmadır. 16S rRNA gen bölgesinin dizilenmesi; bakteri izolatlarının tanımlanmasında, özellikle mikrobiyoloji laboratuvarlarında anormal fenotipik profiller gösteren, nadir görülen, geç büyüyen ya da kültürü yapılmayan bakterilerin karşılaştırılmasında oldukça önemli rol oynamaktadır (Baltacı, 2015).

16S rRNA dizilerinin kıyaslanması bakteriler, arkebakteriler ve ökaryotik organizmalar arasındaki filogenetik ve evrimsel yakınlığın belirlenmesi için kullanılan güçlü bir araçtır. Bu nedenle, son yıllarda yapılan sistematik çalışmalarda, bakterileri familya, cins ve hatta tür düzeyinde tanımlayabilmek için, özellikle 16S

rRNA'yı da kapsayan makromolekül bölgelerinin analizi yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Woese, 1987; Fox vd., 1992; Rainey vd., 1994; Öztürk, 2007; Adıguzel vd., 2011; Baltacı 2015).

Günümüzde tanılamada kullanılan klasik yöntemlerin çoğu kez alternatif yorum ve tartışmalarında beraberinde getirmesi mikroorganizmaların tanı ve teşhisinde moleküler metotları da vazgeçilmez kılmaktadır.

1.3. *Neodiprion sertifer* (Geoffroy, 1785)

Neodiprion cinsi Rohwer (1918) tarafından tanımlanmıştır. *N. sertifer*'in orijinal cinsi *Tenthredo* Linneaus 1758'dur. Türün sinonimleri *Lophyrus sertifer* ve *L. rufus*'dur (Fauna Europa, 2018). Başta çam türleri olmak üzere diğer kozalaklı ağaçlarda zarar yapan Kırmızımtırak Sarı Çalı Antenli Yaprakarısı *Neodiprion sertifer* (Geoffroy, 1785) Hymenoptera takımının Diprionidae familyasına mensuptur.

N. sertifer'in sistematikteki yeri aşağıda sunulmuştur:

Takım : Hymenoptera
Alttakım : Symphyta
Üstfamilya : Tenthredinoidea
Familya : Diprionidae
Altfamilya : Diprioninae
Cins : *Neodiprion*
Tür : *Neodiprion sertifer*

1.3.1 *Neodiprion sertifer*'in Biyolojik Gelişim Evreleri

Ergin

N. sertifer'in erkek ve dişileri morfolojik olarak birbirinden farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar büyüklük, renk ve görünümüne yansımaktadır. Dişiler, daha iri yapılı olup 7-10 mm büyüklüğünde, abdomeni toraksa oranla daha geniştir. Ana

rengi kırmızımsıtrak sarı olup toraks kısmında siyah lekeler bulunur. 2-3 mm uzunluğundaki antenleri kıl şeklinde ve koyu kahverenkli. Ergin erkekleri 6 - 9,5 mm boyunda, parlak siyah renkte, karın ve bacakları ise kırmızımsıtrak kahverengidir. Antenleri 3-4 mm uzunluğunda olup siyah renkli ve iki katlı tarağımsıdır (Çanakçıoğlu, 1993). Erginlerin uçuş dönemi Eylül sonu ile Kasım ayının ilk yarısına rastlar. Eşleşen ergin bireylerin ömrü birkaç gündür ve bu süre boyunca beslenmezler. Dişiler çam iğnelerinin her birine 6-8 yumurta bırakır ve ovipozisyon için 10-12 arası çam iğnesi kullanabilir. Bir yıllık bir generasyonları vardır (Aksu, 2010; Shetler, 2009).

Yumurta

N. sertifer'in yumurtaları sarımsı beyaz renkte olup şekil olarak muza benzerler. Yumurtalar 1,4 - 1,5 mm boyunda ve 0,4 - 0,5 mm çapındadır (Çanakçıoğlu, 1993). Dişi ergin yumurtalarını ard arda olacak şekilde değil aralıklarla ibrelerde açtığı yarıklara bırakır. İki yumurta arasındaki uzaklık 0,3 - 1,7 mm arasında değişebilir (Akıncı ve Avcı, 2016).

Larva

Tırtılın üç çift yürüme bacağı ile sekiz çift yalancı bacağı mevcuttur. Abdomenin sonuncu segmentinde anüs ve bir çift tutunma ayağı ile birlikte toplam 12 çift ayak bulunur. Yumurtadan yeni çıkmış yalancı tırtıl tipindeki larvalar siyahımsı yeşil renkli, silindire benzer şekillidir Olgun tırtılların vücutlarının asıl rengi ise açık yeşildir. Baş, göğüs ayakları, ve vücudun üzerinde enine diziler şeklinde düzgün bir halde dizilmiş parlak siyah dikencikler bulunur. Her segmentte sağda ve solda birer tane olmak üzere iki sıra halinde düzenli bir dizilişe sahip iri siyah noktalar vardır. Tırtılın sırt kısmının sağında ve solunda üste olan kalın altta olan ince olmak üzere siyah renkli iki şerit vardır.

Yumurtayı terk eden genç tırtılların boyu 3-5 mm arasında değişiklik gösterir. İkinci döneme geçen larvaların boyları 5-8 mm, üçüncü ve dördüncü döneme geçen larvaların 14-17 mm ve son döneme geçen larvaların ise 19-24 mm arasındadır (Çanakçıoğlu, 1993; Aksu, 2010; Akıncı ve Avcı, 2016). Larvalar nisan ayından mayısın ortalarına kadar çıkmaya devam eder. Larva tamamen büyüdüğünde,

ağustosun ortalarından eylül ayının başlarına kadar pupa evresini geçirir (Shetlar, 2009).

Yumurtadan çıkan tırtıllar ibrelerin uç kısımlarına doğru hareket ederek, bu kısma yakın yerlerden yiyime başlar ve ibrenin ana damarına dokunmadan sadece mezofil tabakasını yerler. Tırtıllar ergin hale gelinceye kadar 6-7 adet gömlek değişikliği yapar, son gömleğe doğru ilerledikçe beslenmeleri daha çok artar. Beslenme süresi 6-7 hafta olmaktadır. Tehlike anında S şeklini alır ve yeşil bir salgı üretirler (Aksu, 2010).

Pupa

Pupası fiçi şeklindedir. Açık kahverenkli, ince ve oldukça yumuşak duvarlı olup, 7-11 mm boyunda, 3,5 - 5,0 mm çapındadır. Larvalar çoğunlukla toprak içinde, az sayıda ibrelerin aralarında ve kabuk çatlaklarında pupa dönemine geçer (Çanakçıoğlu, 1993; Akıncı ve Avcı, 2016).

1.3.2 *Neodiprion sertifer*'in Zararı

N. sertifer primer zararlı türlerden biridir. Bütün yaş sınıflarındaki çamların iğne yapraklarında yiyim yaparak, özellikle elverişli olmayan topraklar üzerinde bulunan yaşları 10-15 arasında değişen genç ağaçları seçmektedir. Yumurtadan çıkan genç tırtıllar önce ibreleri yüzeyden yemeğe başlar, iç parankima tabakasına kadar yiyim yapar, ibrenin ana damarına dokunmazlar. Çoğunlukla yumurtaların bulunduğu iğne yapraklara el sürmezler. İbreleri yiyen larvalar daha sonra hep birlikte yan sürgünlere geçer ve benzer şekilde yeme işlerini sürdürürler. Larvaların orta damara kadar yediği ve larvaların ayrıldığı ibrelerin bir müddet sonra sararıp döküldüğü görülür. Larvalar orta damar dışı beslenmeye üçüncü deri değişimine kadar devam eder. Son gömleğe doğru ilerleyen larvalar artan besin ihtiyaçlarıyla beraber ibrelerin hepsini tüketirler (Çanakçıoğlu, 1993; Akıncı ve Avcı, 2016).

N. sertifer'in zararına maruz kalan ağaçlar yaşamlarını sürdürse de, çamların iğne yaprakları büyük ölçüde zarar gördüğünden meşcerelerde artım kayıpları görülür. Bunun neticesinde zayıf düşen ağaçlar çeşitli kabuk böceklerinin üremeleri için uygun bir ortam haline gelir (Çanakçıoğlu, 1993).



a



b



c



d



e



f

Şekil 1. *N. sertifer*'in Biyolojik Gelişim Evreleri; a: *N. sertifer*'in erkeği, b: *N. sertifer*'in dişisi, c: yumurta, d-e: larva, f: pupa.

Url-1 < <http://bugguide.net/node/view/275378/bgp>>, alındığı tarih: 01.05. 2018.

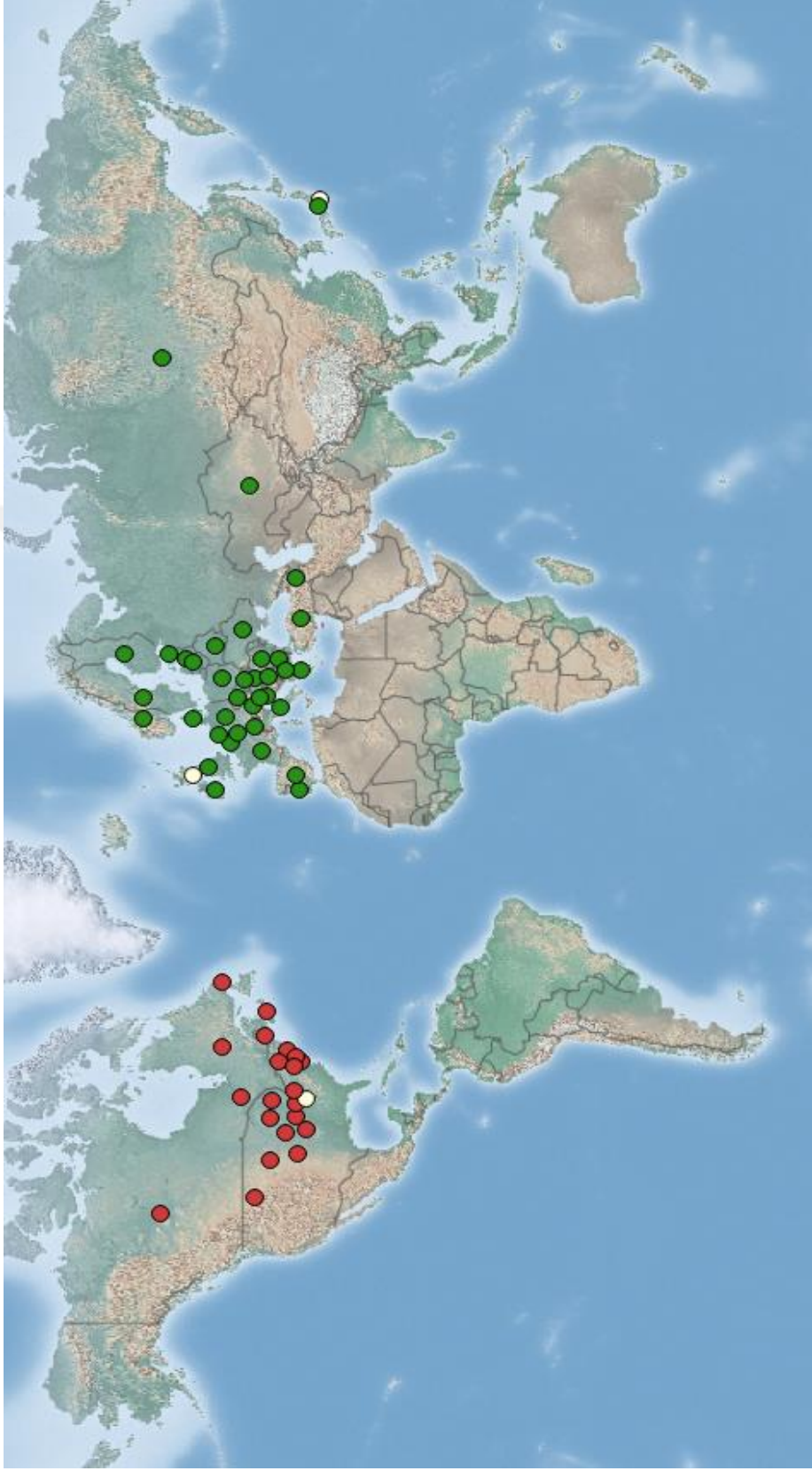
1.3.3 *Neodiprion sertifer*'in Yayılışı

N. sertifer dünyada; Kuzey Amerika ve Kanada başta olmak üzere, Avrupa, Sibiryaya, Hindistan, Japonya ve Kore'yi içeren geniş bir alanda yayılış göstermektedir.

Türkiye'de ise; Afyon, Adana, Ankara, Antalya, Artvin, Balıkesir, Bolu, Burdur, Bursa, Çanakkale, Çorum, Denizli, Elazığ, Erzurum, Eskişehir, Isparta, İstanbul, İzmir, Kahramanmaraş, Kastamonu, Kırklareli, Kütahya, Mersin, Muğla, Sakarya, Trabzon, Zonguldak'ta tespit edilmiştir (Aksu, 2010; Baş, 1973; Çanakçıoğlu ve Mol, 1998; OGM, 2011).



Şekil 2. *Neodiprion sertifer*'in Türkiye'de yayılış alanları.



Şekil 3. *Neodiprion sertifer*'in Dünyada (Avrupa, Asya, Uzak Doğu) Yayılış Alanları
● : İnvaziv ● : İnvaziv değil

1.3.4 *Neodiprion sertifer*'in Zarar Yaptığı Bitkiler

N. sertifer dünyada çok çeşitli çam türlerinde ve nadir olarak da ladinde tespit edilmiştir. Türkiye'de Sarıçam, Kızılcım ve Karaçamlarda zarar oluşturmaktadır. Artvin'de ise bütün Sarıçam ağaçlandırma alanlarında yayılış sergilemektedir. Çoğunlukla 5-15 yaş aralığındaki Sarıçamlarda zararlı olmaktadır.

1.3.5 *Neodiprion sertifer*'in Biyolojisi

Uçma zamanı Eylül sonu ile Ekimin ilk yarısına denk gelir. Dişiler yumurtalarını tek sıra halinde yumurta koyma borusu ile iğne yaprakların kenarlarına batırmak suretiyle açtıkları yarıkların içerisine aşağıdan yukarıya doğru bırakırlar. Yumurtalar *Diprion pini* (L.)'de olduğu gibi yan yana konulmuş halde değil 1-1,5 mm mesafelerle birer birer bırakılır. İğne yapraklara konulan yumurtaların etrafları yaklaşık 10-12 gün sonra ince bir şerit halinde sarardığından diğer yapraklardan rahatlıkla ayırt edilir. Bir dişinin 55-72 adet yumurta koyduğu tespit edilmiştir. Kış sezonu yumurta döneminde geçer. Ertesi yılın Mart sonu ile Nisanın ilk günlerinde genç tırtıllar yumurtadan çıkmaya başlar. İğne yapraklarda zarar yapan yalancı tırtıllara dokunulduğunda *D. pini* (L.)'de görüldüğü gibi (S) şeklini alır ve olgunlaşmaları 5-6 kez deri değiştirdikten sonra gerçekleşir. İğne yapraklardaki beslenmeleri yaklaşık 6 hafta kadar devam eden yalancı tırtıllar, kozalarını mayısın son yarısında çoğunlukla toprak içinde, nadiren de iğne yaprakların arasında örler. Kozada pupa olan tırtıllar 17-19 gün sonra erginleşip kozayı bir ucundan elips şeklinde keserek dışarıya çıkarlar. Bu şekilde tek yıllık basit bir generasyonu vardır (Çanakçıoğlu, 1993).

1.3.6 *Neodiprion sertifer*'in Parazitoit ve Avcıları

Neochrysocharis formosa (Westwood 1833) (Hym.: Eulophidae) , *Dipriocampe diprioni* (Ferriere 1935) (Hym.: Tetracampidae), *Drino inconspicua* (Meigen 1830) (Dip.: Tachinidae), *Exenterus amictorius* (Panzer 1801) (Hym.: Ichneumonidae), *Lamachus eques* (Hartig 1838) (Hym.: Ichneumonidae), *Agrothereutes adustus* (Gravenhorst 1829) (Hym.: Ichneumonidae), *Brachymeria* sp. (Hym.: Chalcididae),

Apanteles sp. (Hym.: Braconidae), *Mesopolobus mediterraneus* (Mayr 1903) (Hym.: Pteromalidae), *N. sertifer*'in yumurta, larva ve pupa evrelerinde etkili olan parazitoit türlerindendir (Akıncı ve Avcı, 2016).

Ayrıca, *N. sertifer*'in avcısı olarak *Troilus luridus* (Fabricius 1775) (Hemiptera, Pentatomidae) belirlenmiştir (Aksu, 2010; Akıncı ve Avcı, 2016)

Aksu (2010)'nun Artvin yöresinde 1990-1992 yıllarında epidemi yapan zararlının avcıları olarak *Rhinocoris iracundus*'u, parazitoit türler olarak *D. inconspicua* ve *E. amictorius*, *Diplostichus janithrix* ve *Lophyprolectus luteator*'u tespit etmiştir.

1.3.7 *Neodiprion sertifer*'le Mücadele Yöntemleri

Zararlının kontrolünde feromonlar ve kimyasal insektisitler kullanılmış, mekanik yöntemler de denenmiştir. Biyolojik mücadele çalışmalarında ise ağırlıklı olarak virüsler kullanılmıştır. Bunun yanı sıra nematod ve bakteriler kullanılarak yürütülen çalışmalarda bulunmaktadır.

Mekanik Yöntemler

N. sertifer larvalarının toplanarak imha edilmesi bahçeler gibi küçük alanlarda işe yarayabilir. Ancak, daha büyük alanlara yayılmış çam plantasyonlarında çok işe yarayacağı söylenemez. Nitekim, Aksu (2010), *N. sertifer*'in 1991 yılında Artvin'de ki sahalarda zarar seviyesinin %100'lük bir orana ulaştığı için mekanik mücadele yapıldığını, fakat böcek zararının tam olarak ortadan kaldırılamadığını, bu nedenle bu mücadeleye ara verildiğini ve daha sonraki yıllarda da bu şekilde mücadele yapılmadığını rapor etmiştir.

Feromonlar

N. sertifer'in dişilerince üretilen sex feromonları türün ergin erkekleri için son derece cezbedicidir. Bu durumdan yola çıkılarak sentetik feromonların kullanıldığı tuzaklar araştırmacıları yaprakarılarıyla ilgili pekçok bilgiye ulaştırmıştır. Bu sayede yaprakarılarının davranışları, uçuş peryotları, uçuşları için önemli abiyotik faktörler belirlenebilmiştir (Ostrand vd., 2001; Simandl, 1993; Schedl, 1994; Jönsson ve Anderbrant, 1993). Bunun yanısıra *N. sertifer*'in populasyon yoğunluğu

izlenmesinde feromon tuzakları kullanılmıştır (Anderbrant vd., 1995; Baldassari vd., 2000). Tüm bu uygulamalar zararlının populasyon yoğunluğunu baskılamakta fakat kontrol altına alınması noktasında etkili olamamıştır.

Kimyasal İsektisitler

Diprionidae familyasına ait yaprakarıları en çok mide ve temas zehirlerinden etkilenirler. Bu zararlılarda kimyasal kontrol çalışmalarında ilk zamanlarda tehlikeli kimyasal olarak bilinen kalsiyum arsenat kullanılmıştır (Hamilton, 1943). *N. sertifer*'in daha sonraki kontrol çalışmalarında; malation, diflubenzuron, Azadirachtin, Dimilin ve piretroidler gibi çeşitli insektisitler kullanıldığı bildirilmiştir (Wilson, 1971; Adomas, 1999; Malinowski, 2002; Anderbrant vd., 2002.).

Artvin'de 1990 ve 1991 yıllarında pülverizatörler yardımı ile temas zehirleri atılmış, fakat böceğin sahada varlığı ortadan kaldırılamamıştır. Böcekçil kuşların yavrulama dönemlerine rastlayan ilaçlama, kuşların sahadan uzaklaşmasına yol açmış ve biyolojik dengenin de bozulabileceği düşünüldüğünden kimyasal mücadeleye son verilmiştir (Aksu, Y., 2010)

Çankırı'da 2002 yılında karaçam plantasyonunda yapılan bir uygulama denemesinde 200 g preparat/ha dozda Diflubenzuron WP-25 kullanılmış ve *N. sertifer*'in 4.-5. gömlek larvalarına karşı %100'e varan etki elde edilmiştir. (Şimşek ve Kondur, 2006).

Mekanik yöntemlerin yetersiz kalışı, kimyasal insektisitlerin ekosistemde oluşturacağı olumsuz etkiler biyolojik mücadeleyi kaçınılmaz kılmıştır. *N. sertifer*'in biyolojik kontrolü için ağırlıklı olarak virüsler üzerine çalışılmıştır.

Biyolojik Mücadele

Bakülovirüsler sadece artropodları enfekte eden ve biyolojik kontrol çalışmalarında yüksek virulans özellikleri nedeniyle en çok kullanılan virüslerdendir. Bu virüslerin bir grubu olan Nüklear Polihedrosis Virüs (NPV), *N. sertifer*'in doğal patojenidir. NPV üzerine yapılan bir çalışmada; virüsün duyarlı hücrelerde oluşturduğu enfeksiyon süreci, inkübasyon süresi, izolasyonu gibi hususlar ayrıntılı olarak açıklanmıştır (Bird ve Whalen, 1953).

Avusturya’da bu zararlının kontrolü için yapılan çalışmalarda polihedrosis virüsün $10^6 - 2 \times 10^5$ inklüzyon cisimciği/ml içeren konsantrasyonu larvalara yaklaşık 6 ml’lik spreyleme ile uygulanmıştır. Uygulama sonrası 1. gömlek larvalarda; uygulamanın yaklaşık 23. günde % 95 ölüm, 4 hafta sonunda ise % 100 ölüm elde edilmiştir. Daha sonra yapılan ikinci denemede 2. ve 3. gömlek larvalara 2×10^5 inklüzyon cisimciği/ml içeren konsantrasyonu uygulanmış ve uygulama yapılan alanda üç hafta sonunda bütün larvaların öldüğü ve virüsün plantasyonun hepsine yayıldığı belirlenmiştir. Alanda büyük yoğunlukta ölü larvalarla beslenen *Omophlus* cinsine ait türlerin varlığı tespit edilmiş, böylece bu böceklerin hastalığın yayılmasından sorumlu olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Donaubauer E, 1973).

Podgwaite ve arkadaşları (1984) yaptıkları çalışmada zararlının makul kontrolü için NPV’nin doz oranını $2,5 \times 10^9$ olarak belirlemişlerdir.

Entwistle ve arkadaşları (1985) NPV’nin saflaştırılmış polihedral inklüzyonlarını içeren sprej süspansiyonlarının uygulama yılında *N. sertifer*’in larval popülasyonlarında oldukça yüksek mortaliteye yol açtığını ve yaprakları iyi koruduğunu bildirmişlerdir.

Glowacka ve arkadaşları (1987), laboratuvar uygulamaları sonucu $1 \times 10^2 - 1 \times 10^6$ PIB (Polyhedral Inclusion Body /ml’de 9. günde %100 mortalite elde etmişlerdir.

Angus (1956), *Bacillus thuringiensis* var. sotto Ishiwata toksinlerinin zararlı üzerinde etkisiz olduğunu belirlemiştir.

Yaman ve arkadaşları (2001), *N. sertifer*’in larvalarına karşı NsNPV’nin 5×10^9 , 5×10^8 ve 5×10^7 PIB/ml olmak üzere üç farklı konsantrasyonlarını test etmiş, viral enfeksiyonu giemsa yöntemiyle boyama yapılarak gösterilmiştir. Larvalarda ölümün deney süresinin dördüncü gününde başladığı, 5×10^9 PIB/ml konsantrasyonunda 9. günde % 90,4’e ulaştığı bildirilmiştir. Üç farklı konsantrasyonun aynı ölüm oranını gösterdiğini, enfeksiyon sürelerinin ise farklı günlerde geliştiğini belirlemişlerdir. Çalışmada NsNPV’nin Türkiye’de *N. sertifer*’e karşı etkili bir biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılabileceği de saptanmıştır.

Finney ve Bennett (1983), *Heterorhabditis heliothidis* nematodunun laboratuvar koşullarında kullanımıyla 15°C'de 120 saat süre sonunda *N. sertifer*'in son gömlek larvalarında % 100 mortalite elde etmişlerdir. Ancak, zararlının pupalarının ise nematoda duyarlı olmadığı bildirilmiştir. Pupalarda disekte edildiğinde ise 24 saat sonra %100 enfekte oldukları tespit edilmiştir. Bu nematodun potansiyel olarak yaprakarılarının biyolojik kontrolünde düşünülebileceklerini belirtmişlerdir

Sezen ve arkadaşları (2001), *Balaninus nucum*'dan izole ettikleri *Serratia marcescens* bakterisinin insektisidal etkisini *N. sertifer* larvaları üzerinde 5 gün içinde %88 olarak tespit ettiler.

Aksu (2010), 1992 yılında *Bacillus thuringiensis* içeren preparatlar (Foray) kullanılarak mücadele yapıldığını bildirmiştir. Bu uygulamanın temas yoluyla sahanın genelinde tırtıllara etki yaparak onların hastalanmalarına ve gömlek değiştirmelerini engellediği için ölümlerine neden olduğunu belirtmiştir. 1993 yılında yapılan kontrolde 1992 yılına oranla bakteriyel ilacın kesin etkisini göstererek sahanın %80'inde başarılı olduğunu ve bu ilacın doğal denge açısından zarar boyutunun olmadığını tespit etmiştir.

Ancak, Dünyada ve Türkiye'de çok çeşitli çam türlerinde zarar yapan Kırmızımtırak Sarı Çalı Antenli Yaprakarısı *Neodiprion sertifer*'in vücut mikroflorası üzerine yapılmış yeterli araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, böceğin vücut bakteriyel florasının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Ayrıca, bu çalışma sonuçlarının bizi bu flora üyelerinin biyokontrol ajanı olarak kullanılabilme potansiyelleri, önemli biyoaktif bileşiklerin üretimi gibi benzer pekçok konuda önemli bilgilere ulaştıracağı beklenmektedir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışma esnasında kullanılan alet ve cihazlar aşağıda sıralanmıştır:

İnkübatör (MMM Group Incucell, CZECH REPUBLIC)

Otoklav (HMC Hirayama Hiclava HV-50L, JAPAN)

Faz Kontrast Mikroskop (Zeiss, GERMANY)

Steril Kabin (BLF 2000, CLASS II, TÜRKİYE)

Çalkalamalı inkübatör (GFL 3032, GERMANY)

Magnetik Karıştırıcı (Heidolph, GERMANY)

pH Metre (InoLab pH7110, GERMANY)

Derin Dondurucu (New Brunswick Sci, U410, ENGLAND)

Hassas Terazı (Ohaus, CHINA)

Otomatik pipet seti (Socarex, SWISS)

Buzdolabı (Bosch, GERMANY)

Su Banyosu (Mettler, GERMANY)

Mikrodalga Fırın (Beko MD1505, TÜRKİYE)

Saf Su Cihazı (GFL4L, GERMANY)

Vorteks (Heidolph Reax Top, GERMANY)

PCR (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Elektroforez Tankı (Yatay) (Bio-Rad, U.S.A.)

Elektroforez Akım Sağlayıcı (Bio-Rad, U.S.A.)

Jel Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad, U.S.A.)

Buz makinası (IQ 85C AIRE, EU)

Santrifüj (Awel, WF 48-R, FRANCE)

2.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan besiyeri ve kimyasalların analitik saflıkta olmasına özen gösterilmiş, Difco, Oxoid ve Merck marka besiyeri ve kimyasallar kullanılmıştır.

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Bakterial İzolatlar

Çalışmada kullanılan bakterial izolatlar *N. sertifer*'in larvalarından elde edilmiştir.

2.1.4. İzolasyon İşlemlerinde Kullanılan Böcek Türü

İzolasyon işlemlerinde *N.sertifer*'in larvaları kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması

İzolasyon, saflaştırma, teşhis işlemlerinde kullanılan besiyeri ve çözeltiler aşağıda belirtilen şekilde hazırlanmıştır:

Nutrient agar (NA): Distile suya 28 g/L olacak şekilde hazırlanmış, otoklavda sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Steril kabin içerisinde 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra petri kapları içerisine dökülüp katılaşması beklenmiştir.

Nutrient broth (NB): Distile suya 13 g/L olacak şekilde hazırlandıktan sonra otoklavda sterilizasyon gerçekleştirilmiştir.

Stok Besiyeri: 0,65 g nutrient broth karışımına 36 ml %18'lik gliserol çözeltisinden eklendikten sonra son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmış, otoklavda sterilizasyondan sonra eppendorf tüplerine dağıtılmıştır.

%18'lik gliserol çözeltisi: 18 ml gliserol deiyonize saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

%5'lik H₂O₂ çözeltisi: 17 ml %30'luk H₂O₂'in hacmi steril saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

%3'lük KOH çözeltisi: 3 g KOH 100 ml steril saf su içerisinde çözülerek hazırlandı.

%0,85'lik NaCl çözeltisi: 8,5 mg NaCl 1 L saf suda çözüldü. Çözelti otoklavda steril edildi.

%70'lik Etil alkol: 70 ml saf etil alkolün hacmi steril saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. -20°C'de muhafaza edildi.

Primer çalışma konsantrasyonu: Ticari olarak liyofilize halde alınan primerler kataloğu doğrultusunda çözülerek $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ formülü kullanılarak son konsantrasyonu 100 µM olacak şekilde hazırlandı.

Ethidium bromür çözeltisi: 100 ml steril saf su içerisinde 1 g ethidium bromür magnetik karıştırıcı kullanarak iyice çözüldü. Amber şişede, oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Gr + bakteriler için lizis tamponu: Lizozim 20 mg/ml, 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1,2% Triton X-100 ve pH 8.0 olacak şekilde ayarlanıp hazırlandı.

Tris asetik asit EDTA (TAE) tamponu (x50): 242 g tris, 57,1 ml glisial asetik asit, 0,5 M 100 ml EDTA, pH 8.0 olacak şekilde ayarlanıp hacim distile suyla 1 L'ye tamamlandı.

Yükleme tamponu: 40 gr sukroz, 0,025 gr bromofenol mavisi, 0,25 gr ksilen siyanol 100 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

Taq polimeraz tamponu 10x: 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl, 1 mg/ml jelatin.

-MgCl₂: 25 mM

-Nükleotid Karışımı: 10 mM dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)

-Taq polimeraz: 5 U/ ml

Safranin çözeltisi: 1 g safranin, 10 ml %95'lik etil alkolde çözülmüş, son hacim steril saf su ile 100 ml'ye tamamlanmış, buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Lugol Solüsyonu: 1g I ve 0,5g KI tartılarak, toplam hacim steril saf su ile 100 ml'ye tamamlanmış ve buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Kristal violet çözeltisi: 2 g kristal violet, 20 ml %95'lik etil alkolde çözülmüş, son hacim steril saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak şişe içinde buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Malaşit yeşili çözeltisi: 5 g malaşit yeşili, 100 ml steril saf su ile çözümlenerek şişe içinde buzdolabında muhafaza edilmiştir.

2.2.2. Örneklerinin Toplanması

N.sertifer'in larvaları Nisan-Mayıs 2016 tarihleri arasında Artvin çam ormanlarında yapılan arazi çalışmalarında toplandı. *N.sertifer* ile enfekte olduğu belirlenen çam ağaçlarının yan dal sürgünleri kesilerek alındı. Bu dalların kesilen kısımları steril nemli pamukla sarılarak, plastik kutulara yerleştirildi ve laboratuara getirildi.

2.2.3. Bakterilerin İzolasyonu ve Stoklanması

N.sertifer türünün larvalarından bakteri izolasyonu için ayrı ayrı ve her defasında 10 adet larva kullanılarak %70'lik alkolde yüzey sterilizasyonu için 10 dak bekletildi. Larvalar üç kez steril su ile çalkalandı, cam bir doku parçalayıcı kullanılarak nutrient broth içerisinde ezilerek ekstraktları hazırlandı. Hazırlanan ekstrakt seyreltildi ve son seyreltikten 0.1ml alınarak nutrient agar besiyeri üzerine yayma ekim yapıldı. Ekim

yapılan petri kabları 30°C'de 2-3 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda oluşan kolonilerden saf kültürler elde edildi. İzolatların her birine ayrı bir kod numarası verilerek ve stok kültürleri hazırlanarak (eppendorf tüpleri) -20°C'de derin dondurucuda muhafaza edildi.

2.2.4. Bakterilerin Karakterizasyonu

Bakteriler klasik (koloni morfolojisi, hücre morfolojisi, gram özelliği, endospor oluşumu ve hareketlilik) ve konvensiyonel testler (API 20 E ve API 50 CH kitleri, Biomerieux, France) kullanılarak morfolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlenerek karakterize edildi.

Koloni morfolojisi

Saflaştırılan bakteri kültürlerinin her birinden alınan örnekler, çizgi ekimle tek koloni düşecek şekilde NA besiyerine transfer edilmiş ve 25°C'de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gelişen kolonilerin şekilleri ve renkleri incelenmiştir (Saygılı 1995).

Hücre morfolojisi

Bakteriyel izolatların 18-24 sa'lik taze kültürlerinden hazırlanan preparatlar, basit boyama yapılarak mikroskopun immersiyon objektifinde hücre şekillerine (çubuk, yuvarlak, virgül vs.) bakılmıştır (Temiz 2000; Harley ve Prescott, 2002).

Gram özelliği

İzolatların Gram özelliği iki farklı yöntemle belirlenmiştir:

1. yöntemde; taze bakteri kültüründen alınarak lam üzerinde hazırlanan smear üzerine kristal violet çözeltilisi dökülerek 1dk bekletilmiş ve sonra su ile fazla boya uzaklaştırılmıştır. Devamında preparat üzerine lügol eklenmiş ve 1 dk sonunda %96'lık etil alkol ile yıkanmıştır. Daha sonra saf sudan geçirilen preparat safranin ile 20 saniye boyandıktan sonra su ile yıkanmış, kurutma kağıdı ile kurutulmuş ve mikroskopun immersiyon objektifinde incelenmiştir. Mor renk Gram (+), pembe-kırmızı renk Gram (-) olarak değerlendirilmiştir (Harley ve Prescott 2002).

2. yöntemde; lam üzerine damlatılan %3'lük KOH solüsyonu üzerine öze ile alınan taze bakteri kültüründen koyularak 5-10 saniye karıştırılır. Daha sonra öze yukarı doğru kaldırılır. Gram negatif bakteriler bu durumda vizkoz bir uzama gösterirken Gram pozitif bakterilerde bu durum gözlenmez. Gr negatif bakterilerde KOH ile muamele edildiğinde görülen bu uzama hücre duvar yapısının parçalanmasından kaynaklanmaktadır (Farrab ve Reboli 2006; Saygılı vd., 2006).

Hareket testi

Saf bakteri izolatlarının 18-24 saat'lik kültürlerinden alınan örneklerin hareketlilik testi, "asılı damla preparat yöntemi" ile mikroskopta incelenmiştir (Arda, 2000).

Endospor oluşumu

Bakteri kültüründen alınarak hazırlanan smear kaynayan su banyosu üzerine yerleştirilmiş, üzeri malaşit yeşili ile kaplanarak kurutma kağıdı koyulmuş ve tekrar malaşit yeşili ilave edilerek 5-7 dakika boyama işlemine devam edilmiştir. Daha sonra kurutma kağıdı kaldırılmış, fazla boya uzaklaştırıldıktan sonra preparat safranin ile boyanmış boyama sonrası su ile nazikçe yıkanıp, kurutulmuş ve incelenmesi yapılmıştır (Harley ve Prescott 2002).

Kapsül

Bazı mikroorganizmalar hücre duvarının dış yüzeyini kaplayacak şekilde ekstraselular (hücre dışı) polimerler üretirler. Hücreyi saran bu yapıya kapsül adı verilmektedir. Saf bakteri izolatlarının 18-24 saat'lik kültürlerinden alınan örneklerinden hazırlanan preparatlarla faz kontrast mikroskobu ile kapsül yapılarının varlığı incelenmiştir.

Biyokimyasal testler

Katalaz testi

İzolatların katalaz enzimine sahip olup olmadıklarını belirleyebilmek için bu test yapılmıştır. Katalaz enzimine sahip olan bakteriler elektron taşıma sisteminin sonunda açığa çıkan hidrojen peroksiti (H_2O_2)'i parçalayıp H_2O ve O_2 'ye dönüştürür. O_2 'nin oluşumu kabarcıklar halinde görülebilmektedir. Bu amaçla 24-48 saat'lik genç

bakteri kültürlerinin her birinden bir öze dolusu alınarak lam üzerine konulmuş ve üzerlerine bir damla H₂O₂ damlatılmıştır. Kabarcık oluşumu katalaz pozitif, oluşmaması ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Arda 2000; Harley ve Prescott 2002).

Oksidaz testi

İzolatların Cytochrome C Oksidase enzimine sahip olup olmadıklarını belirleyebilmek için bu test yapılmıştır. Solunum prosesinde görev alan bu enzim elektron taşıma sisteminde maddeleri birinden diğerine indirgeyerek hücresel enerji (ATP) oluşumunu sağlar. Bu amaçla, %1 tetra methyl-p-phenylenediamine dihydrochloride içeren kit halindeki tabletler steril saf su ile doyurulup, üzerine petri plağında geliştirilmiş 24-48 sa'lik bakteri kültürü yayılmıştır. Mavimsi-mor renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Leloğlu ve Erdoğan 1979; Harley ve Prescott, 2002).

Konvensiyonel testler

Bu amaçla API 20 E ve API 50 CHB (Biomerieux, France) test kiti kullanıldı. Bakteriler nutrient agar besiyerine ekilerek, 30°C'de bir gece inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda oluşan koloniler steril bir öze yardımıyla toplanarak API 20 E için içerisinde % 0.8'lik NaCl bulunan 2 ml' lik test tüplerine, API 50 CHB için ise içerisinde amonyum sulfat, maya ozutu, fenol kırmızısı ve tripton bulunan 10 ml' lik hazır API 50CHB (Enterobacteriaceae/Bacillus) besiyerine aktararak süspansiyon haline getirildi. Süspansiyon içerisindeki bakterilerin yoğunluğu 3 No'lu McFarland standardına eşitlendi.

Daha sonra hazırlanan bakteri süspansiyonları API 20 E ve API 50 CHB test kuyucuklarına(strip) ekildi. Stripler 30°C'de 48 saat inkubasyona bırakıldı. 24 ve 48 saatlik süreler sonunda test kuyucuklarında meydana gelen renk değişimlerine göre değerlendirmeler yapıldı.

2.2.5. Bakterial İzolatların 16S rRNA dizi analizi ile tanılanması

Genomik DNA izolasyonu

Bakteriyel izolatlar, nutrient agar besiyerinde 30°C’de 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası gelişen bakterilerden alınan tek koloniler nutrient broth besiyerine aktarıldı. Çalkalamalı inkübatörde 30°C’de 160 rpm’de yaklaşık 18-24 saat inkübe edildi. Bu şekilde geliştirilen kültürlerden genomik DNA izolasyonu, DNA izolasyon kitinden (Thermo Scientific GeneJET) uyarlanan protokol kullanılarak Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler için aşağıda belirtilen aşamalar uygulanarak gerçekleştirildi.

Gram pozitif Bakteriler için Genomik DNA İzolasyon Aşamaları

Bakteri kolonileri nutrient broth besiyerinde 30°C’de yaklaşık 18-24 saat inkübe edildi.

1- İnkübasyon süresi sonunda gelişen genç kültürler 2 ml’lik steril eppendorf tüplerine alındı. 5000 rpm’de 10 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonunda elde edilen pelet genomik DNA izolasyonunda kullanıldı.

2- Pelet Gram pozitif bakteriler için hazırlanan 180 µl lizis tamponuyla suspense edildi. 37°C’de 30 dk bekletildi.

3- Bekleme sonrası 200 µl Lizis solüsyonu ve 20 µl Proteinaz K eklendi, homojenize süspansiyon elde etmek için vortekslendi.

4- Bakterial hücreler tamamen parçalanana kadar 56°C’de çalkalamalı su banyosunda 30 dk süreyle inkübe edildi.

5- İnkübasyon sonrası ortama 20 µl RNase A Solüsyonu eklenerek, vortekslendi. Karışım 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

6- 400 µl %50 etanol eklendi ve vortekslendi.

7- Hazırlanan lizat GeneJET Genomic DNA Pürifikasyon kolonuna aktarıldı. Kolon 10 000 rpm’de 1-4 dk süreyle santrifüj edildi. İçerisine akan solüsyonu içeren

toplama tüpü atıldı. GeneJET Genomic DNA Pürifikasyon kolonu yeni 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi.

8- Kolona 500 µl Wash Buffer I eklendi. Kolon 12 000 rpm'de 1-3 dk santrifüj edildi. Dipte oluşan sıvı atıldı. Toplama tüpü pürifikasyon kolonuna geri yerleştirildi.

9- GeneJET Genomic DNA Pürifikasyon kolonuna 500 µl Wash Buffer II eklendi. 12 000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Dipte oluşan sıvı döküldü.. Toplama tüpü atıldı. GeneJET Genomic DNA Pürifikasyon kolonu steril 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi.

10- 200 µl Elüsyon Tamponu GeneJET Genomik DNA Pürifikasyon kolonuna Genomik DNA'yı ayrıştırmak için eklendi. 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.

11- Pürifikasyon kolonu atıldı. İzole edilen DNA daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20°C'de stoklandı.

Gram negatif Bakteriler için Genomik DNA İzolasyon Aşamaları

Bakteri kolonileri nutrient broth ve luria bertani broth besiyerinde 30°C'de yaklaşık 18-24 saat inkübe edildi.

1- İnkübasyon süresi sonunda gelişen genç kültürler 2 ml'lik steril eppendorf tüplerine alındı. 5000 rpm'de 10 dk süreyle santrifüj edildi. Süpernatant kısmı döküldü. Santrifüj sonunda elde edilen pelet genomik DNA izolasyonunda kullanıldı.

2- Pelet 180 µl Dijesyon Solüsyonuyla süspansiyon edildi. 20 µl Proteinaz K eklendi, homojenize süspansiyon elde etmek için vortekslendi.

3- Bakterial hücreler tamamen parçalanana kadar 56°C'de çalkalamalı su banyosunda yaklaşık 30 dk süreyle inkübe edildi.

4- İnkübasyon sonrası ortama 20 µl RNaz A Solüsyonu eklenerek, vortekslendi. Karışım 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

5- Örneğe 200 µl Lizis solüsyonu eklendi. Yaklaşık 15 s homojenize süspansiyon elde etmek için vortekslendi.

6- 400 µl %50'lik etanol eklendi ve vortekslendi.

7- Hazırlanan lizat GeneJET Genomic DNA Pürifikasyon kolonuna toplama tüpü yerleştirilerek transfer edildi. Kolon 6000 rpm'de 1 dk süreyle santrifüj edildi. Alta geçen sıvıyı içeren toplama tüpü atıldı. GeneJET Genomic DNA Pürifikasyon kolonuna yeni 2 ml'lik toplama tüpü yerleştirildi.

8- Kolona 500 µl Wash Buffer I eklendi. 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Alta geçen sıvı sıvı döküldü. Toplama tüpü pürifikasyon kolonuna geri yerleştirildi.

9- GeneJET Genomic DNA Pürifikasyon kolonuna 500 µl Wash Buffer II eklendi. 12 000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Alta geçen sıvı sıvı döküldü. Toplama tüpü atıldı. GeneJET Genomic DNA Pürifikasyon kolonu steril 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi.

10- 200 µl Elüsyon Tamponu GeneJET Genomik DNA Pürifikasyon kolonuna Genomik DNA'yı ayrıştırmak için eklendi. 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.

11- Pürifikasyon kolonu atıldı. İzole edilen DNA daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20°C'de stoklandı.

16S rRNA geninin PCR yardımı ile çoğaltılması

16S rRNA gen amplifikasyonu; 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Macrogen) evrensel primerleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Reaksiyonun hazırlanması

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yapılacak her bir örnek için 50 µl'lik reaksiyon olarak hazırlandı. 5 µl kalıp DNA için; 5 µl 10 x PCR tamponu(Fermentas), 2,5 µl dNTP (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP - 4 mM), 2 µl 10 pm primer 27F, 2 µl 10 pm primer 1492R, 3.0 µl MgCl₂, 0,5 µl 5 unit/pl *Taq* DNA polimeraz ve 30 µl steril saf su kullanıldı.

PCR şartları

Hazırlanan örnekler, 94°C'de 2 dakika denatürasyon, bunu takiben 35 döngü olacak şekilde 94°C'de 45 saniye denatürasyon, 55°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 1 dakika uzama ve son olarak 72°C'de 10 dakika uzama basamağından oluşacak şekilde programlanan PCR termocycler cihazına yerleştirildi. Seçilen programda hedef bölgelerin çoğaltılması yapıldı.

PCR ürünlerinin elektroforezi:

0,5 gr agaroz üzerine 50 ml 1XTAE tamponu eklendi. Karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar ısıtıldı. 45-50°C'ye kadar soğuyan agarose jele 3 µl etidium bromür ilave edildi. Hazırlanan jel karışımı içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel kütetine döküldü. 15-20 dakika beklenerek jelin donması sağlandı. Donan jelden taraklar dikkatlice çıkarıldı ve içerisinde 1XTAE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirildi. Jeldeki çukurlara ise her bir örnek için 2 µl 6X yükleme tamponu, 5 µl PCR ürünü karıştırılarak yüklendi.

PCR ürünü, % 1 elektroforez jel düzeneğinde 100 volta ayarlanarak 30-40 dakika yürütüldü. İstenen bölgenin varlığı jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenerek, teyit edildi.

Sekans analizi

PCR yöntemiyle çoğaltılan 16S rRNA gen bölgesi sekans analizi, her iki yönde ticari bir firma aracılığıyla her iki yönde okutuldu. Sekans verileri BioEdit ile analiz edildi. Birleştirilen diziler gen bankasında (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) bulunan nükleotid koleksiyonunda karşılaştırılarak diğer türler ile yakınlıkları ortaya konuldu. Alınan sonuçlar gen banka gönderildi ve bakterial izolatların herbiri için gen bank kabul numaraları alındı.

3. BULGULAR

3.1. *N. sertifer*'den İzole Edilen Bakteriler

Bu çalışmada, kırmızımtrak sarı çalı antenli yaprakarısı *N. sertifer*'den 7 cinse ait toplam 13 bakteri izole edildi. Bakteriyel izolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri (konvensiyonel testler ve API 20 E, API 50 CH kitleriyle) belirlendi. Yapılan çalışmalara ve 16S rRNA gen sekans analizi verilerine dayanılarak izolatlar; *Pseudomonas* sp. (Ns1), *Staphylococcus* sp. (Ns2), *Bacillus megaterium* (Ns3), *Klebsiella oxytoca* (Ns4), *Klebsiella oxytoca* (Ns5), *Staphylococcus* sp. (Ns6), *Klebsiella oxytoca* (Ns7), *Raoultella planticola* (Ns8), *Pantoea agglomerans* (Ns9), *Staphylococcus pasteurii* (Ns10), *Pantoea agglomerans* (Ns11), *Acinetobacter lwoffii* (Ns12) ve *Pantoea agglomerans* (Ns13) olarak tanımlandı.

3.2. İzolatların Morfolojik Özellikleri

İzolatların morfolojik özellikleri Tablo 1.'de verilmiştir. Ns2 ve Ns6 izolatlarının açık krem, Ns9, Ns10, Ns11 ve Ns13 izolatlarının sarı, diğer izolatların ise krem renginde koloni oluşturduğu tespit edildi. İzolatların tümünün ise yuvarlak koloni morfolojisine sahip olduğu görüldü. Ns2, Ns3, Ns6 ve Ns10 izolatlarının Gram pozitif, diğer izolatların ise Gram negatif olduğu belirlendi. Ns1 ve Ns2 izolatlarının basil (çubuk), Ns2, Ns6 ve Ns10 izolatlarının kok (yuvarlak), diğer izolatların ise kokobasil şeklinde olduğu görüldü. Ns1, Ns3, Ns9, Ns11 ve Ns13 dışındaki izolatların hareketsiz olduğu tespit edildi. Kapsül varlığı Ns4, Ns5, Ns7 ve Ns8 izolatlarında, spor oluşumu ise sadece Ns3 izolatında görüldü. Ns1, Ns3, Ns5, Ns6, Ns7, Ns10 ve Ns13 izolatları ölü larvalardan, Ns2, Ns8, Ns9, Ns11 ve Ns12 izolatları sağlıklı larvalardan, Ns4 ise hastalıklı larvalardan izole edildi.

Tablo 1. *N.sertifer*'den izole edilen bakterilerin morfolojik özellikleri.

İzolasyon kodu	Testler							İzolasyon kaynağı
	Koloni rengi	Koloni şekli	Hücre şekli	Kapsül	Gram özelliği	Spor	Hareket	
Ns 1	Krem	Yuvarlak	Basil	-	-	-	+	Ö.L
Ns 2	Açık krem	Yuvarlak	Kok	-	+	-	-	S.L
Ns 3	Krem	Yuvarlak	Basil	-	+	+	+	Ö.L
Ns 4	Krem	Yuvarlak	Kokobasil	+	-	-	-	H.L
Ns 5	Krem	Yuvarlak	Kokobasil	+	-	-	-	Ö.L
Ns 6	Açık krem	Yuvarlak	Kok	-	+	-	-	Ö.L
Ns 7	Krem	Yuvarlak	Kokobasil	+	-	-	-	Ö.L
Ns 8	Krem	Yuvarlak	Kokobasil	+	-	-	-	S.L
Ns 9	Sarı	Yuvarlak	Kokobasil	-	-	-	+	S.L
Ns 10	Sarı	Yuvarlak	Kok	-	+	-	-	Ö.L
Ns 11	Sarı	Yuvarlak	Kokobasil	-	-	-	+	S.L
Ns 12	Krem	Yuvarlak	Kokobasil	-	-	-	-	S.L
Ns 13	Sarı	Yuvarlak	Kokobasil	-	-	-	+	Ö.L

+ pozitif, - negatif, Ö.L: ölü larva, S.L: sağlıklı larva, H.L: hastalıklı larva

3.3. İzolatların Biyokimyasal Karakteristikleri

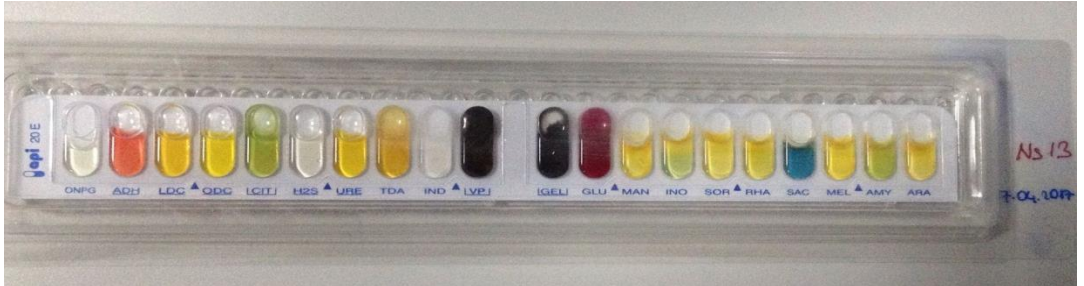
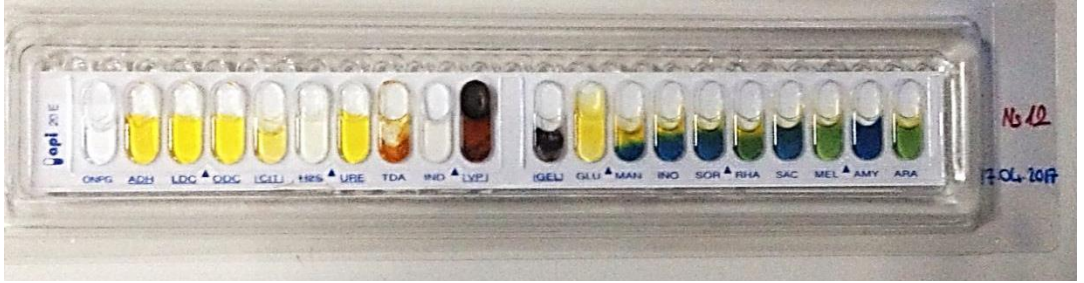
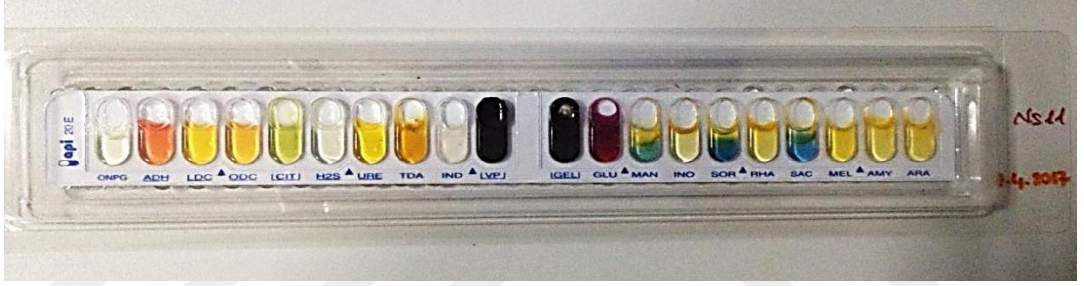
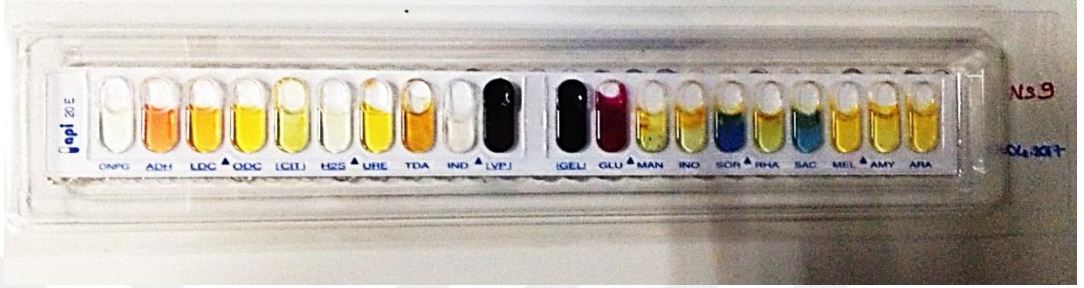
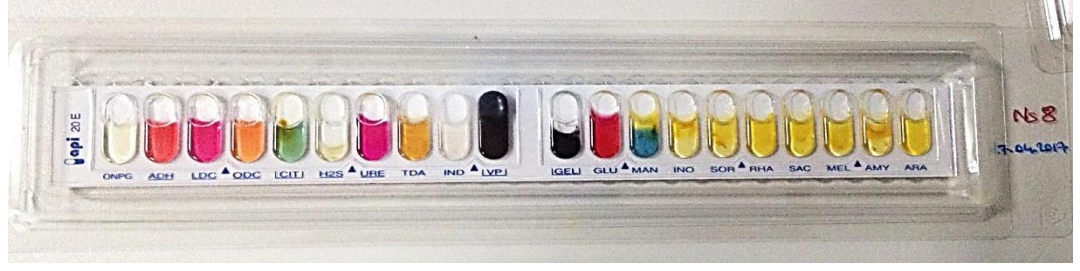
İzolatların biyokimyasal özellikleri, konvansiyonel tesler ve API (Analitik Profil İndeks) test kitleri kullanılarak belirlendi. API test kitlerinden; API 20 E sadece Gram negatif bakterilerin, API 50 CH ise sadece Gram pozitif bakterilerin biyokimyasal karakterizasyonu için kullanıldı. API test kitlerinden; API 50 CH 49 adet, API 20 E ise 20 adet minyatürize edilmiş biyokimyasal test içeren mikrotüplerden oluşmaktadır. İzolatlara ait API 20 E ve API 50 CH test sonuçları sırasıyla Tablo 2 ve Tablo 3’de sunulmuştur.

Bütün izolatlar katalaz pozitif, Ns1 izolatu hariç oksidaz negatiftir. Tablo 2 değerlendirildiğinde; Gram negatif bütün izolatların glukoz fermentasyonu testinden pozitif sonuç, H₂S üretimi testinden ise negatif sonuç verdiği belirlendi. β -galaktozidaz reaksiyonunun sadece Ns3 izolatusunda pozitif sonuç verdiği, inositol fermentasyonunun ise sadece Ns12 izolatusunda negatif sonuç verdiği tespit edildi. Üreaz ve indol üretimi test sonuçlarının ise Ns4, Ns5 ve Ns7 izolatlarında pozitif olduğu gözlemlendi. Diğer test sonuçlarının ise izolatlar arasında değişkenlik gösterdiği tespit edildi.

Tablo 3. değerlendirildiğinde; Gram pozitif izolatların hepsinin D-fruktoz, D-sukroz ve D-trehaloz test sonuçlarının pozitif, eritritol, L-ksiloz, Metil- β D-ksilopiranozid, Metil- α D-mannopiranozid, amygdalin, D-melezitoz, Ksilitol, Glikojen, D-liksoz, D-fukoz, L-arabitol, Potasyum glukonat, Potasyum 2-ketoglukonat ve Potasyum 5-ketoglukonat test sonuçlarının ise negatif olduğu tespit edildi. D-Arabinoz, D-adonitol, D-galaktoz, L-sorboz, L-ramnoz, inositol, D-sorbitol, Metil- α -D-glukopiranozid, D- seliobiyoz, D- laktoz, gentiobiyoz, D-tagatoz, L-fukoz test sonuçları sadece Ns6 izolatu için, inulin ve nişasta testi ise sadece Ns3 izolatu için pozitif sonuç verdiği belirlendi. D- riboz ve eskulin ferrik sitrat test sonuçları sadece Ns2 izolatu için negatif, D- glukoz ve D- maltoz test sonuçları ise sadece Ns10 izolatu için negatif olarak tespit edildi. Geriye kalan diğer test sonuçlarının ise izolatlar arasında değişkenlik gösterdiği belirlendi.



Şekil 4. *N. sertifer* izolatlarının API 20 E test kitleri ile verdiği reaksiyonlar.



Şekil 4. Devam, *N. sertifer* izolatlarının API 20 E test kitleri ile verdiği reaksiyonlar



Şekil 5. *N. sertifer* izolatlarının API 50 CHB test kitleri ile verdiği reaksiyonlar.

Tablo 2. Konvensiyonel ve API 20 E test kitlerine göre Gr (-) izolatların biyokimyasal karakteristikleri

Testler	Ns 1	Ns 3	Ns 4	Ns 5	Ns 7	Ns 8	Ns 9	Ns 11	Ns 12	Ns 13
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-galaktozidaz	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Arjinin dihidrolaz	zp	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Lisin dekarboksilaz	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Ornitin dekarboksilaz	-	-	zp	-	-	zp	-	-	-	-
Trisodyum sitrat	+	-	+	-	zp	+	-	-	-	-
H ₂ S üretimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ureaz	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
L-triptofan	zp	-	+	+	+	-	-	-	zp	-
Indol	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
VP (sodyum piruvat)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Jelatinaz	zp	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Glukoz ferment.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-mannitol ferment.	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Inositol ferment.	+	zp	+	+	+	+	+	+	-	+
D-sorbitol ferment.	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
L-ramnoz ferment.	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
D-sakkaroz ferment.	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
D-melibioz ferment.	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Amygdalin ferment.	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
L-arabinoz ferment.	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
NO ₂	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+

+ pozitif, - negatif, zp: zayıf pozitif, ferment: fermentasyonu

Tablo 3. Konvensiyonel ve API 50 CHB test kitlerine göre Gr(+) izolatların biyokimyasal karakteristikleri

Testler	Ns2	Ns3	Ns6	Ns10
Katalaz	+	+	+	+
Oksidaz	-	-	-	-
Gliserol	-	+	+	zp
Eritritol	-	-	-	-
D-Arabinoz	-	-	+	-
L-Arabinoz	-	+	+	-
D-Riboz	-	+	+	+
D- Ksiloz	-	+	+	-
L- Ksiloz	-	-	-	-
D-Adonitol	-	-	+	-
Metil-β-D-ksilopiranozid	-	-	-	-
D-Galaktoz	-	-	+	-
D-Glukoz	+	+	+	-
D-Fruktoz	+	+	+	+
D-Mannoz	-	-	+	+
L-Sorboz	-	-	+	-
L-Ramnoz	-	-	+	-
Dulkitol	-	-	+	+
Inositol	-	-	+	-
D-Mannitol	-	+	+	-
D-Sorbitol	-	-	+	-
Metil-α-D-mannopiranozid	-	-	-	-
Methyl-α-D-glukopiranozid	-	-	+	-
N-Asetilglukozamin	-	+	+	-
Amygdalin	-	-	-	-
Arbutin	-	zp	+	-
Eskulin-ferrik sitrat	-	+	+	+
Salisin	-	-	+	+
D-Seliobiyoz	-	-	+	-
D-Maltoz	+	+	+	-
D-Laktoz (bovine origin)	-	-	+	-
D-Melibiyoz	-	+	+	-
D-Sakkaroz	+	+	+	+
D-Trehaloz	+	+	+	+
Inulin	-	+	-	-
D-Melezitoz	-	-	-	-
D-Raffinoz	-	+	+	-

+ pozitif, - negatif, zp: zayıf pozitif

Tablo 3. Devam Konvensiyonel ve API 50 CHB test kitlerine göre Gr(+) izolatların biyokimyasal karakteristikleri

Testler	Ns2	Ns3	Ns6	Ns10
Nişasta (starch)	-	+	-	-
Glikojen	-	-	-	-
Ksilitol	-	-	-	-
Gentiobiyoz	-	-	+	-
D-Turanoz	-	+	-	-
D-Liksoz	-	-	-	-
D-Tagatoz	-	-	+	-
D-Fukoz	-	-	-	-
L-Fukoz	-	-	+	-
D-Arabitol	-	-	+	+
L-Arabitol	-	-	-	-
Potasyum glukonat	-	-	-	-
Potasyum 2-ketoglukonat	-	-	-	-
Potasyum 5-ketoglukonat	-	-	-	-

+ pozitif, - negatif, zp: zayıf pozitif

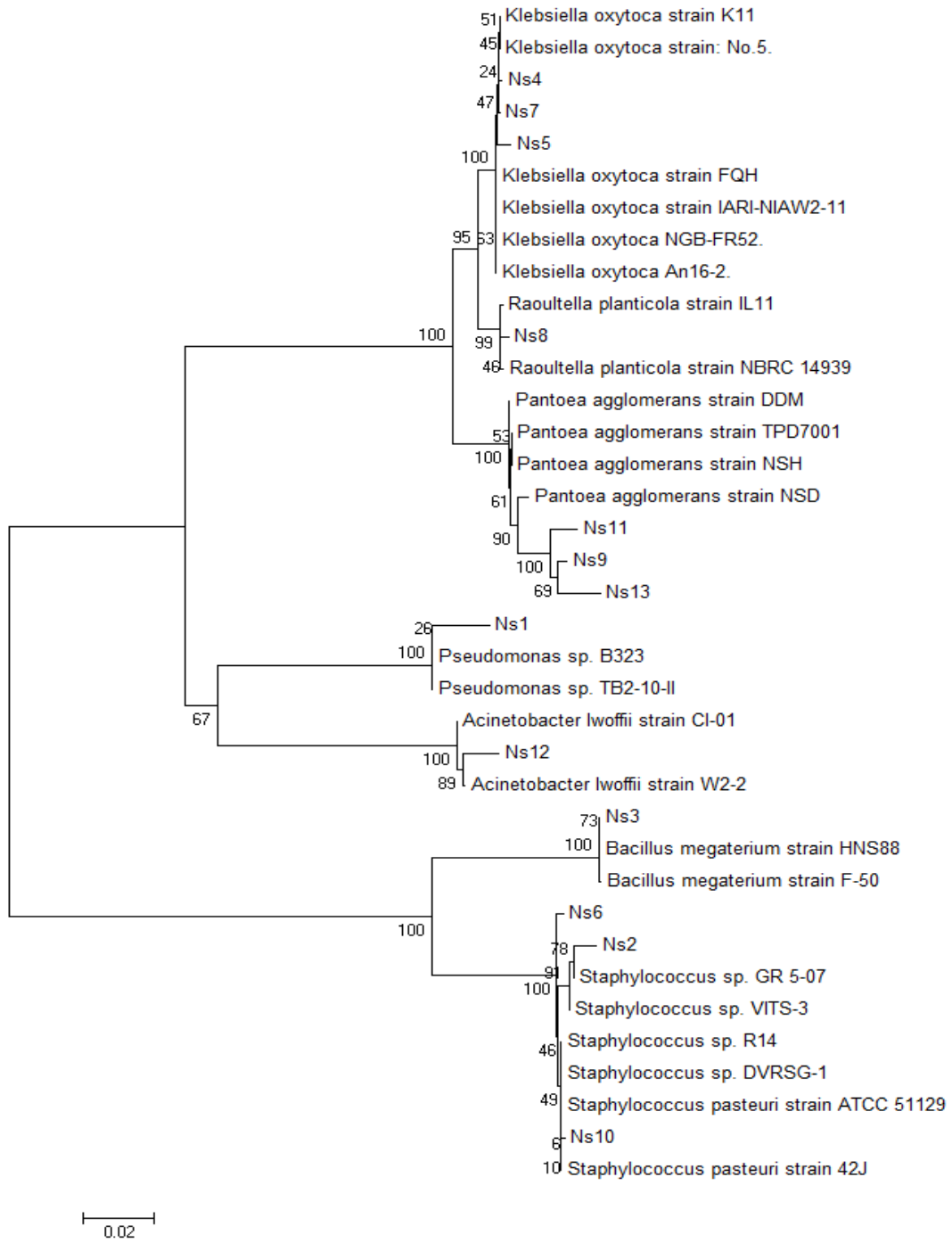
3.4. 16S rRNA Dizi Analizi Sonuçları ve Filogenetik Ağaç

Bakteriyel izolatlar 16S rRNA gen sekans analizi için ticari bir firmaya gönderildi. Gelen sekans sonuçlarına göre elde edilen baz dizileri GenBank'da blast analiziyle (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) diğer baz dizileriyle karşılaştırıldı. Blast analizi sonuçlarına göre bakteriyel izolatlar karşılaştırıldıkları türler ile %97-%99 arasında benzerlik gösterdi. Elde edilen sonuçlar identifikasyonda kullanıldı ve gen banka bu veriler girilerek gen bank erişim numaraları alındı.

Filogenetik ağaç, izolatların 16S rRNA gen baz dizileri esas alınarak ve MEGA Software 6.06 programı kullanılarak çizildi (Tamura vd., 2013). Buna göre; izolatların identifikasyon sonuçları Tablo 4'de ve filogenetik yakınlıkları ise Şekil 6'da sunulmuştur.

Tablo 4. 16S r RNA gen sekans analizine göre *N.sertifer*'den izole edilen bakterilerin identifikasyon sonuçları

İzolot Kodu	Gen bank erişim numarası	Türler	16S r RNA gen sekans uzunluğu (bp)	İzolatların NCBI veri tabanında en yakın türle benzerliği
Ns 1	MG544098	<i>Pseudomonas sp.</i>	1418	99
Ns 2	MG544099	<i>Staphylococcus sp.</i>	1440	99
Ns 3	MG544100	<i>Bacillus megaterium</i>	1464	99
Ns 4	MG544101	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1453	99
Ns 5	MG544102	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1452	99
Ns 6	MG544103	<i>Staphylococcus sp.</i>	1467	99
Ns 7	MG544104	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1453	99
Ns 8	MG544105	<i>Raoutella planticola</i>	1451	99
Ns 9	MG544106	<i>Pantoea agglomerans</i>	1425	98
Ns 10	MG544107	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	1470	99
Ns 11	MG544108	<i>Pantoea agglomerans</i>	1453	98
Ns 12	MG544109	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1453	99
Ns 13	MG544110	<i>Pantoea agglomerans</i>	1456	97



Şekil 6. 16S rRNA gen sekans analizine göre *N.sertifer*'den izole edilen bakterilerin filogenetik yakınlıkları (MEGA Software 6.06.).

*Bootstrap değeri 1000 tekrarlı olarak yapıldı ve nodlar üzerinde %50'nin altındaki değerler gösterilmedi.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Böcekler yüksek uyum yetenekleriyle karasal nişlerin geniş yelpazelerinde varlıklarını sürdürebilen omurgasızlardır (Reddy P, 2013). Birçok böcek türü sindirim sisteminde geniş ve çeşitli mikrobiyal topluluklara ev sahipliği yapar (Dillon ve Dillon, 2004). Bu mikroorganizmalar ev sahiplerinde beslenmeden fizyolojiye hatta davranışlara kadar pek çok önemli görevi yerine getirirler (Chen vd., 2016). Böceklerin mikrofloralarındaki bakterilerle kurdukları simbiyotik ilişkiler, böcekler arası etkileşimler ya da zararlı böceklerin kontrolünde yeni stratejiler geliştirilmesi gibi önemli konulara ışık tutabilme potansiyeline sahiptir (Dillon ve Dillon, 2004). Ayrıca, simbiyotik bakteriler beslenme, gelişme, üreme, bağışıklık, doğal düşmanlar ve türleşme gibi konularda da önemli katkılar sağlayabilirler (Reddy P, 2013).

Böceklerin gerek iç gerekse dış vücut bakteriyel florası sadece yararlı bakterileri içermemekte bunların yanında şüphesiz onların hastalanmasına sebep olan, ölümlerine yol açan bakterileride içermektedir.

Yukarıda da özetlenmeye çalışılan tüm bu nedenler böceklerin bakterial florası üzerine yapılan araştırmaları cazip hale getirmektedir. Bu amaçla günümüzde pek çok araştırmacı zararlı böceklerin bakteriyel florasını araştırmakta, bakteriler izole etmekte ve konaklarında insektisidal etkilerini belirlemektedir (Moraes vd., 2000; Sezen vd., 2001; Osborn vd., 2002; Dharme vd., 2006; Albayrak-İskender, 2009; Sevim vd., 2012; Rizzi, 2013; Albayrak-İskender vd., 2017a, 2017b, 2017c, 2017d).

Bu araştırmada, *N.sertifera* türünün vücut içinden bakteriler izole edildi, izole edilen bakterilerin 16S rRNA gen sekans analizleri kullanılarak tanıları yapıldı.

Kırmızımtrak sarı çalı antenli yaprakarı *N. sertifera* larvalarının vücut içinden 7 cinse ait toplam 13 bakteri izole edildi. Bu izolatların 3'ü cins seviyesinde geriye kalanlar ise tür seviyesinde tanımlandı. *Pseudomonas* cins seviyesinde, *Bacillus* cinsi ise tür seviyesinde 1 izolatla temsil edildi.

Gram negatif bakterilerin sağlıklı böceklerin sindirim sistemlerinin en yaygın bakteriyel flora üyeleri olduğu bildirilmektedir (Tanada ve Kaya, 1993). Sağlıklı böceklerden yapılan izolasyon çalışmalarının sonuçları bu veriyle uyumludur.

Bu çalışmada elde edilen izolatlar daha önce yapılan böcek mikroflorası çalışmalarında farklı böceklerden izole edilmiştir. Nitekim daha önce yapılan araştırmalarda; *Pseudomonas* cinsi ve bu cinse ait türler; tüylü palemoto, *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Saturniidae)'dan (Osborn vd., 2002), Meksika meyve sineği, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae)'den (Kuzina vd., 2001), adi mayıs böceği, *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae)'dan (Sezen ve Demirbağ, 2007), sivrisinek, *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae)'ten (Galal vd., 2013), pamuk yaprakkurdu, *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae)'ten (Çakıcı vd., 2014), dişbudak kabuk böceği, *Hylesinus fraxini* (Coleoptera: Scolytidae)'den (Menendez vd., 2015), kestane gal arısı *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae)'dan (Albayrak İskender vd., 2017b) izole edilmiştir. Yukarıda verilen literatür çalışması, *Pseudomonas* cinsi ve bu cinse ait türlerin böceklere ait farklı takımlardan izole edilmesi, bu cinsin böceklerde yaygın olarak bulunduğu işaret etmektedir.

Pseudomonas cinsine ait çoğu bakteri etkin oksijenaz enzimleriyle aromatik hidrokarbonlarda dahil çeşitli ve farklı organik maddeleri metabolize etme yeteneğine sahiptir. Atık suların arıtılması, petrol sızıntılarının temizlenmesi (Dworkin, 2006), biyodegradasyon gibi önemli olaylarda bu bakteriler anahtar rol oynar (Sharma ve Pathak, 2014). Aynı zamanda *Pseudomonas* cinsi, bitkiler üzerinde faydalı etkiler gösteren rizosfer grubu bakterilerin en önemli cinslerinden biridir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar bitkilere faydalı özellikleriyle bilinen pseudomonadların insektisidal etki sergilediğini de ortaya çıkarmıştır (Péchy-Tarr vd., 2008; Ruffner vd., 2013). Bu çalışmada izole edilen *Pseudomonas* sp. türünün daha sonraki çalışmalarda bu amaçla kullanılabileceğini kanaatideyiz.

Çalışmamızda *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Raoultella*, *Pantoea* ve *Acinetobacter* cinsleri tek türle temsil edilmektedir. Bu cinslere ait bakterilerden *Staphylococcus* cinsi ve bu cinse ait türler; *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) ergininden (Kuzina vd., 2001), *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Saturniidae)

larvasından (Osborn vd., 2002), *Hepialus gonggaensis* (Lepidoptera: Hepialidae) bağırsağından (Yu vd., 2008), *Agriotes lineatus* (Coleoptera: Elateridae) larvasından (Danismazoglu vd., 2012), *Plagioderia versicolora* (Coleoptera: Chrysomelidae) larva ve erginlerinden (Demirci vd., 2013); *Dastarcus helophoroides* (Coleoptera: Bothriideridae) ergininin bağırsağından (Zhang vd., 2014), *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvasından (Çakıcı vd., 2014), *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae) larvasından (Albayrak-İskender vd., 2017b) olmak üzere farklı takımlara ait böceklerden izole edilmişlerdir.

Staphylococcus sp. türlerinin izole edildikleri konakları üzerinde önemli bir mortalite sergilemediği, entomopatojenik olmadığı bildirilmiştir (Çakıcı vd., 2014; İnce vd., 2008).

Yine *Bacillus megaterium* türüne ait bakteriler *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Saturniidae)'dan (Osborn vd., 2002), *Limonius canus* (Coleoptera: Elateridae) bağırsağından (Lacey, 2007), *Aphis pomi* (Homoptera: Aphididae)'den (Aksoy ve Ozman-Sullivan, 2008), *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae)'den (Secil vd., 2012), *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae)'den (Prasanna vd., 2014), *Macrotermes gilvus* (Blattodea: Termitidae)'dan (Ferbiyanto vd., 2015) izole edilmişlerdir.

Bacillus megaterium morfolojik olarak vejetatif hücre ve sporları büyük, topraktan kurutulmuş besinlere, denizsuyundan sedimentlere, balıklardan bal arılarına kadar farklı çevrelerde bulunabilen bir bakteridir. Geniş ve farklı ekolojik habitatlarda faydalı enzim ve ürünleriyle ekonomik bakımdan önemli bir bakteridir (Vary, 1994). *Bacillus* cinsine ait bakteriler böcekleri de içeren çeşitli ortamlardan izole edilmiş, konakları üzerinde insektisidal etkileri araştırılmış ve patojeniteleri belirlenmeye çalışılmıştır. *Aphis pomi* (Homoptera: Aphididae)'den izole edilen *B. megaterium* izolatlarının zararlı üzerinde %92 ile %100 arasında değişen yüksek patojenitesi ortaya çıkarılmıştır. (Aksoy ve Ozman-Sullivan, 2008). Yukarıda açıklamalara dayanarak izolatomuzun gerek ekonomik gerekse biyolojik kontrol yönünden kullanılabilme potansiyeline sahip olduğunu söyleyebiliriz.

Klebsiella oxytoca'ya ait türler; Akdeniz meyve sineği, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)'dan (Marchini, vd., 2002), diğer meyve sinekleri *Bactrocera tau*

(Tephritidae: Diptera) (Prabhakar vd., 2009), *Dacus dorsalis* (*Bactrocera dorsalis*) (Diptera: Tephritidae)'den (Jang vd., 2009; Shi vd., 2012), sindirim sisteminin predominant bakteriyel simbiyontları olarak *Bactrocera* spp. (Diptera: Tephritidae)'den (Sood vd., 2010) daha önceki çalışmalarda izole edilmiştir. Ayrıca, Turunçgil Uzunanteni böceği *Anoplophora chinensis*'den kültüre bağlı ve kültürden bağımsız metodlar kullanılarak (Rizzi vd., 2013), *Anaplophora glabripennis* (Coleoptera: Chrysomelidae)'den (Podgwaite vd., 2013), *Aspidomorpha miliaris* (Coleoptera: Chrysomelidae)'den (Shil vd., 2014) ve *Ae. albopictus*'dan (Yadav vd., 2015) da izole edilmiştir.

Klebsiella sp'nin *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) larvalarında %77 olarak tespit edilen en yüksek oranda mortaliteye yol açtığı (Çakıcı vd., 2014), *L. dispar* larvalarında ise %40 mortalite gösterdiği bildirilmiştir (Demir vd. 2012). Ayrıca, *Klebsiella oxytoca*'ya ait türlerin alifatik hidrokarbonların geniş bir kısmını aerobik şartlarda tamamen metabolize edebildiğine dair çalışmalar bu suşların biyodegradasyon etkinlikleri bakımından farklı çalışmalarda değerlendirilebileceğini de göstermektedir (Chamkha vd., 2011).

Raoultella cinsine ait türlerden *R. ornithinolytica*, *R. terrigena* *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae) erginlerinden (Thaochan vd., 2010), *R. planticola* ise *Anoplophora chinensis*'den (Rizzi vd., 2013), daha önce yapılan böcek mikroflorası çalışmalarında izole edilmiştir. Ayrıca, diazotrofik bakterilerden biri olan *R. terrigena*'nın *Dendroctonus rhizophagus* ve *D. valens* gibi kabuk böceklerinin sindirim sisteminde bulunduğu da bildirilmektedir. Diazotrofik bakteriler böceklerde azot fiksasyonunun sürdürülmesi, azot dengelenmesi gibi işlevleri yerine getirirler (Morales-Jimenez vd., 2013; Morales-Jimenez vd., 2009).

Pantoea agglomerans (Ns9), *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:Noctuidae)'dan (Yaman vd., 2005), *Dacus dorsalis* (Diptera: Tephritidae)'den (Jang vd., 2009), *Bactrocera tau* (Tephritidae: Diptera)'dan (Prabhakar vd., 2009), *Bactrocera* spp. (Diptera: Tephritidae) türlerinin sindirim sisteminden (Sood vd., 2010), *Rhizophagus grandis*'den (Yaman vd., 2010), *Plagioderia versicolora* (Coleoptera: Chrysomelidae)'nin larva ve erginlerinden (Demirci vd., 2013), *Anaplophora glabripennis* (Coleoptera: Chrysomelidae)'in larva ve erginlerinden (Podgwaite vd.,

2013), *Gypsonoma dealbana* (Lepidoptera: Tortricidae)'nın larvalarından izole edilmiştir (Yaman vd., 2017).

P. agglomerans'ın zararlı böceklerden *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:Noctuidae), *D. micans* ve *Plagioderia versicolora* üzerindeki patojenitesi araştırılmış, sırasıyla şu sonuçların %95, %86 ve %0 alındığı bildirilmiştir (Yaman vd., 2005; Yaman vd., 2010; Demirci vd., 2013).

Acinetobacter cinsi ve bu cinse ait bakteriler böceklerden yaygın olarak izole edilmektedir. Nitekim, *Acinetobacter lwoffii* *Dendroctonus valens* (Coleoptera: Curculionidae)'den (Morales-Jiménez vd., 2009), *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera)'dan (Vilanova vd., 2012), *Acinetobacter* sp. küçük Beyazmelek, *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) larvalarının orta bağırsağından (Robinson vd., 2010), *A. calcoaceticus*, uğur böceği, *Propylea quatuordecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae)'dan (Shil vd., 2014), *A. pittii*, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)'dan (Yadav vd., 2015), *A. johnsonii*, *Pristiphora abietina* (Hymenoptera: Tenthredinidae)'dan (Albayrak-İskender vd., 2017a) izole edilmiştir.

Sonuç olarak, Kırmızımsıtrak sarı çalı antenli yaprakarı *N. sertifer* (Geoffr) (Hymenoptera: Diprionidae) çam ormanlarında görülen en zararlı böceklerden biridir. Bu çalışma, *N.sertifer*'den yapılan ilk bakteriyel izolasyon çalışmasıdır. Şüphesiz zararlı böcekleri kontrol altına almayı başarmada bunların bakteriyel floralarının araştırılması son derece önem arz etmektedir. Böylece, biyolojik kontrol ajanlarını geliştirebilme yolunda ilk adımlar atılmış olur. Elde edilen izolatlar; endüstriyel, ekonomik ve biyokontrol çalışmalar için son derece önemli strainleri kapsamaktadır. Bütün bu açılarından değerlendirildiğinde çalışmanın bilime katkı sağladığı açıktır.

KAYNAKLAR

- Adiguzel, A., Inan, K., Sahin, F., Arasoğlu, T., Gulluce, M., Belduz, A.O., Baris, O., 2011. Molecular diversity of thermophilic bacteria isolated from Pasinler hot spring (Erzurum, Turkey), *Turkish Journal of Biology*, 35, 267-274.
- Adomas, J., 1999. The effectiveness of Dimilin 480 SC in control of Diprioninae [Diprionidae], *Progress in Plant Protection*, 39 (2). 524-526.
- Aksu, Y., 2010. Ağaçlandırma Sahalarında *Pinus sylvestris* 'lerde Önemli Zararlar Yapan *Neodiprion sertifer* (Geoff.) (Hymenoptera; Diprionidae) Üzerine Yapılan Araştırma, *Orman Mühendisleri Dergisi*, 47 (1-2-3): 26-34.
- Albayrak-İskender, N.; Algur, Ö. F. 2009. Sekiz Dişli Kabuk Böceği (*Ips typographus*, Coleoptera: Scolytidae)'nin Bakteriyel Florası Üzerine Araştırmalar, *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi Estitüsü*, 2(1): 67-76.
- Albayrak Iskender, N., Ortucu, S., Algur, O.F., Aksu, Y., Saral, A., 2017 a. The first study on bacterial flora and biological control agent of the little spruce sawfly, *Pristiphora abietina* (Christ.) (Hymenoptera: Tenthredinidae). *Romanian Biotechnology Letters*, 22, 13169-13181.
- Albayrak-Iskender, N., Aksu, Y., Algur, O.F., Saral, A., 2017 b. Isolation, identification and characterization of biotechnologically important bacteria from microflora of *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(3). 505-510.
- Albayrak Iskender, N., Ortucu, S., Aksu, Y., 2017 c. Insecticidal activity of isolated bacteria from *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae). *Artvin C, oruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 18 (1): 55-61,
- Albayrak-Iskender, N., and Saral, A., 2017 d. Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* from Artvin, Turkey, and screening against *Hypantaria cunea* (Lepidoptera), *Fresenius Environmental Bulletin*, 26 (6). 4011-4016 .
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi No: 46, 548s.
- Arı, Ş., 1999. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. İstanbul Üniv., Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEM).Yayın No: 1, 57-68s.
- Akıncı, Z.E., ve Avcı, M., 2016. *Neodiprion sertifer* 'in Göller Bölgesi ormanlarında Biyolojisi ve Doğal Düşmanları, *Turkish Journal of Forestry*, 17(1): 30-36.
- Anderbrant, O., Löfqvist, J., Hedenström, E. and Högberg, H. E. 1995. Development of mating disruption for control of pine sawfly populations, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 74, 83-90.

- Anderbrant, O., Hedenström, E., Högberg, Hans-Erik., 2002. Pheromone mating disruption of the pine sawfly *Neodiprion sertifer*: is the size of the treated area important? *International Organization for Biological Control (IOBC) Bulletin / West Palaearctic Regional Section*, 25(9): 1-7.
- Angus, T.A., 1956. The reaction of certain lepidopterous and hymenopterous larvae to Bacillus sotto toxin, *Canadian Entomologist*, 88, 280-283.
- Baldassari, N., Martini, A., Baronio, P., Rocchetta, G., 2000. The behaviour of *Neodiprion sertifer* (Geoffroy) (Hymenoptera Diprionidae) populations in Scots pine stands of the Appennino Tosco-Romagnolo. *Bollettino dell'Istituto di Entomologia 'Guido Grandi' della Università di Bologna*, 54, 91-100.
- Baltacı, M.Ö., 2015. Erzurum Mezbahalarından Toplanan İşkembe Örneklerinden Selülitik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Barış, Ö., 2008. Erzurum İlindeki Mağaralarda Damlataşı Oluşumunda Etkili Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Baş, R., 1973. Türkiye'de Orman Ağaçlarına Zarar Yapan Zar Kanatlılar (Hymenoptera) Üzerine Araştırmalar. Orman Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Bird, F.T., Whalen, M.M., 1953. A virus disease of the European pine sawfly, *Neodiprion sertifer* (Geoffr.), *Canadian Entomologist*, 85(12). 433-437
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J.A., Valdezate, S., 2011. Bacterial identification methods in the microbiology laboratory. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29 (8). 601-608.
- Brown, T.A., 2006. *Genome 3*. Garland Science Publishing, 713 p, New York, USA.
- Brown, T.A., 2009. Gen Klonlama ve DNA Analizi, (Çeviri kurulu: Fevzi Bardakçı, Ali Fazıl Yenidünya, Nazan Yılmaz), Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- Chamkha, M., Trabelsi, Y., Mnif, S., Sayadi, S., 2011. Isolation and characterization of *Klebsiella oxytoca* strain degrading crude oil from a Tunisian off-shore oil field, *Journal of Basic Microbiology*, 51(6):580-9.
- Chen, B., Teh, B. S., Chao, S., Hu, S., Lu, X., Boland, W., and Shao, Y., 2016. Biodiversity and activity of the gut microbiota across the life history of the insect herbivore *Spodoptera littoralis*, *Scientific Reports*, 6, 29505.
- Çakıcı, F.Ö., Sevim, A., Demirbağ, Z., Demir, İ., 2014. Investigating internal bacteria of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and some Bacillus strains as biocontrol agents. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38, 99-110.

- Çanakçıoğlu, H., 1993. Orman Entomolojisi Özel Bölüm.. İ.Ü.Orman Fak. Yayınları No: 412, İstanbul, 458 s.
- Çanakçıoğlu, H., Mol, T., 1998. Orman Entomolojisi Zararlı ve Yararlı Böcekler. İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Yayınları, İstanbul.
- Danısmazoglu, M., Demir, I., Sevim, A., Demirbag, Z., Nalcacioglu, R., 2012. An investigation on the bacterial flora of *Agriotes lineatus* (Coleoptera: Elateridae) and pathogenicity of the flora members., *Crop Protection*, 40, 1-7.
- Demirbağ, Z., Nalçacıoğlu, R., Katı, H., Demir, İ., Sezen, K. ve Ertürk, Ö., 2008. Entomopatojenler ve Biyolojik Mücadele. ISBN: 978-975-93278-2-8, Trabzon.
- Demirci, M., Sevim, E., Demir, İ., Sevim, A., 2013. Culturable bacterial microbiota of *Plagioderia versicolora* (L.) (Coleoptera: Chrysomelidae) and virulence of the isolated strains, *Folia Microbiologica*, 58, 201-210.
- Dharne, M., Patole, M., Shouche, Y.S., 2006. Microbiology of the insect gut: tales from mosquitoes and bees., *Journal of Biosciences*, 31 (3), 293-295.
- Dillon, R.J. and Dillon, V.M. 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions, *Annual Review Entomology*, 49, 71-92.
- Donaubauer, E., 1973. Results of polyhedral virus applications against *Neodiprion sertifer* Geoffr. *Bulletin, Organisation Europeenne et Mediterraneenne pour la Protection des Plantes*, 3 (3): 105-110.
- Dworkin, M.(Editor-in-Chief), Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H. and Stackebrandt, E.(Editors), 2006. The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria. Third Edition. Springer Science, 7000 p (7-volume-set), New York, USA.
- Entwistle, P.F. & Evans, H.F. & Harrap, Keith & Robertson, J.S.. (1985). Control of European pine sawfly *Neodiprion sertifer* (Geoffr.) with its nuclear polyhedrosis virus in Scotland.. 135. 36-46.
- Farrab, W.E. and Reboli, A.C., 2006. The Genus *Bacillus*—Medical. Dworkin, M.(Editor-in-Chief), The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria. Third Edition. Springer Science, volume 4, 609–630, New York, USA.
- Fauna Europa, 2018. Erişim tarihi: 15.04.2018. http://www.faunaeur.org/full_results.php?id=354114
- Ferbiyanto, A., Rusmana, I., Raffiudin, R., 2015. Characterization and identification of cellulolytic bacteria from gut of worker *Macrotermes gilvus*, *HAYATI Journal of Biosciences*. 22,197-200.

- Finney, J.R., Bennett, G.F., 1983. The susceptibility of some sawflies (Hymenoptera: Tenthredinidae) to *Heterorhabditis heliothidis* (Nematoda:Heterorhabditidae) under laboratory conditions, *Canadian Journal of Zoology*, 61, 1177-1180.
- Fox, G.E., Wisotzkey, J.D., Jurtshuk, Jr. P. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 166-170.
- Galal, F.H., Abu Elnasr, A., Abdallah, I., Seufi, A.E.M., Zaki, O., 2013. Isolation and characterization of internal bacteria from the Mosquito, *Culex pipiens* from Egyptian, *International Journal of Science and Research*, 4 (5), 2682-2688.
- Glowacka-B., Ziemnicka, J., Lipa, J.J. and Chlodny, J., 1987. Laboratory and field efficacy of virox in control of the European pine sawfly, (*Neodiprion sertifer* Geoffr.) (Hymenoptera: Diprionidae) .*Prace Naukowe IOR*, 28: 399-407.
- Gullan, P.J. ve Cranston, P.S. 2012. Böcekler: Entomolojinin Ana Hatları, Nobel Yayınevi, 563pp.
- Hamilton, C.C., 1943. The pine sawfly *Neodiprion sertifer* (Geoff.) and its control with concentrated lead arsenate sprays, *Journal of Economic Entomology*, 36, 236-240.
- Harley, J.P. and Prescott, L.M., 2002. Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edition New York: The McGraw–Hill Companies, 466p.
- İnce, I.A., Kati, H., Yilmaz, H., Demir, I., & Demirbag, Z., 2008. Isolation and identification of bacteria from *Thaumetopoea pityocampa* Den. and Schiff. (Lep., Thaumetopoeidae) and determination of their biocontrol potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 3005–3015.
- Jang, E.B. and Nishijima, K.A., 1990. Identification and attractancy of bacteria associated with *Dacus dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Environmental Entomology*. 19: 1726-1751.
- Jönsson, P; Anderbrant, O., 1993. Weather factors influencing catch of *Neodiprion sertifer* (Hymenoptera: Diprionidae) in pheromone traps, *Environmental Entomology*, 22(2), 445-452.
- Khatib, R.M., Veena., and Konanavar, N. 2014. Modern Identification Methods of Bacteria. Research and Reviews: *Journal of Agriculture and Allied Sciences*. 3 (3), 32-38.
- Kuzina, L.V., Peloquin, J.J., Vacek, D.C., and Miller, T.A., 2001. Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Current Microbiology*, 42, 290-294.
- Lacey 2007 Lacey, L. A., Unruh, T. R., Simkins, H., and Thomsen-Archer, K. (2007). Gut bacteria associated with the Pacific Coast wireworm, *Limoni*

- canus*, inferred from 16s rDNA sequences and their implications for control. *Phytoparasitica* 35, 479–489. doi: 10.1007/BF03020607.
- Leloğlu, N., ve Erdoğan, N., 1979. Mikrobiyolo Laboratuvar Yöntemleri. Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 549, Erzurum.
- Malinowski, H., 2002. Activity of azadirachtin against Diprionidae larvae. *Sylwan*, 146(4):17-24.
- Marchini, D., Rosetto, M., Dallai, R. and Marri, L., 2002. Bacteria associated with the oesophageal bulb of the Medfly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), *Current Microbiology*. 44: 120-124.
- Menendez, E., Ramirez-Bahena, M.H., Fabryova, A., Igual, J.M., Benada, O., Mateos, P.F., Peix, A., Kolarik, M., ve Garcia-Fraile, P., 2015. Pseudomonas coleopterorum sp. nov., a cellulaseproducing bacterium isolated from the bark beetle *Hylesinus fraxini*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 2852–2858.
- Moraes, A.M.L., Junqueira, A.C.V., Costa, G.L., Celano, V.,Oliveira, and P.C., Coura J.R. 2000. Fungal flora of the digestive tract of 5 species of triatomines vectors of *Trypanosoma cruzi*, *Mycopathologia*, 151, 41-48.
- Morales-Jiménez J, Zúñiga G, Villa-Tanaca L, Hernández-Rodríguez C., 2009. Bacterial community and nitrogen fixation in the red turpentine beetle, *Dendroctonus valens* LeConte (Coleoptera: Curculionidae:Scolytinae). *Microbial Ecology*, 58(4): 879-891.
- OGM, 2011. Ormanlarımızın Önemli Zararları ve Mücadele Yöntemleri. Orman Koruma ve Yangınla Mücadele Dairesi Başkanlığı, 109-111s.
- Oğurlu, İ., 2000. Biyolojik Mücadele, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın No: 8, Isparta.
- Osborn, F., Berlioz, L., Flores, J.V., Monsalve, W., Dorta, B., Lemoine, V.R., 2002. Pathogenic effects of bacteria isolated from larval of *Hylesia metobus* Crammer (Lepidoptera: Saturniidae), *Journal of Invertebrate Pathology*, 80(1), 7-12.
- Ostrand, F., Anderbrant, O., Jönsson, P., Lyytikäinen-Saarenmaa, P., 2001. Capture rates of the European pine sawfly, *Neodiprion sertifer*, in pheromone traps, with special regard to effects of wind speed, *Journal of Chemical Ecology*, 27(8), 1561-74.
- Öztürk, F., 2007. Ankara'daki topraklardan izole edilen Bacillus türlerinin tanımlanması, mole-küler düzeyde tiplendirilmesi ve biyolojik akti-vitelerinin belirlenmesi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Péchy-Tarr, M., Bruck, D.J., Maurhofer, M., Fischer, E., Vogne, C., Henkels, M.D., Donahue, K.M., Grunder, J., Loper, J.E., Kee, l C., 2008. Molecular analysis

- of a novel gene cluster encoding an insect toxin in plant-associated strains of *Pseudomonas fluorescens*, *Environmental Microbiology*, 10, 2368-2386.
- Podgwaite, J.D.; Rush, P.; Hall, D.; Walton, G.S., 1984. Efficacy of the *Neodiprion sertifer* (Hymenoptera: Diprionidae) nucleopolyhedrosis virus (baculovirus) product, Neochek-S, *Journal of Economic Entomology*, 77(2), 525-528.
- Podgwaite, J.D., D'Amico, V., Zerillo, R. T., Schoenfeldt, H., 2013. Bacteria Associated with Larvae and Adults of the Asian Longhorned Beetle (Coleoptera: Cerambycidae), *Journal of Entomological Science*, 48 (2). 128-138.
- Prabhakar, C.S., Sood, P., Kapoor, V., Kanwar, S., Mehta, P. and Sharma, P. (2009). Molecular and biochemical characterization of three bacterial symbionts of fruit fly, *Bactrocera tau* (Tephritidae: Diptera), *Journal of General and Applied Microbiology*, 55: 479-487.
- Prasanna, V.A., Kayalvizhi, N., Rameshkumar, N., Suganya, T., and Krishnan, M., 2014. Characterization of amylase producing *Bacillus megaterium* from the gut microbiota of silkworm *Bombyx mori*, *Research Journal of Chemistry and Environment*. 18 :7, 38-45. July (2014) *Res.J.Chem.Environ*
- Rainey, F.A., Fritze, D., Stackebrandt, E., 1994. "The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analysis", *FEMS Microbiology Letters*, 115, 205-12.
- Reddy P,K., 2013. Isolation and characterization of bacterial associated with the peach fruit fly, *Bactrocera zonata* (Saunders) and its role in management. Postgraduate thesis, Division of Entomology Indian Agricultural Research Institute, New Delhi.
- Rizzi, A., Crotti, E., Borruso, L., Jucker, C., Lupi, D., Colombo, M., and Daffonchio, D., 2013. Characterization of the bacterial community associated with larvae and adults of *Anoplophora chinensis* collected in Italy by culture and culture-independent methods, *BioMed Research International*, 420287, 12. .
- Robinson, C.J., Schloss, P., Ramos, Y., Raffa, K., and Handelsman, J., 2010. Robustness of the bacterial community in the cabbage white butterfly larval midgut, *Microbial Ecology*, 59, 199-211.
- Ruffner, B., Péchy-Tarr, M., Ryffel, F., Hoegger, P., Obrist, C., Rindlisbacher, A., Keel, C., Maurhofer, M., 2013. Oral insecticidal activity of plant-associated pseudomonads, *Environmental Microbiology*, 15, 751-763.
- Saygılı, H., 1995. Fitobakteriyoloji. Ege Üni. Ziraat Fak. Bitki Koruma Bölümü, Ders Kitabı. Doğruluk Matbaası, İZMİR.
- Saygılı, H., Sahin, F. ve Aysan Y., 2006. Fitobakteriyoloji, Meta Basım Matbaacılık, İzmir, Türkiye, pp 550.

- Schedl, W., 1994. First field experiments with pheromone sticky traps for sawfly control in Austria (Hymenoptera: Symphyta: Diprionidae), *Entomologia Generalis*, 18(3/4), 235-240.
- Secil, E.S., Sevim, A., Demirbag, Z., Demir, I., 2012. Isolation, characterization and virulence of bacterial from *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae), *Biologia*, 67 (4), 767-776.
- Sezen, K., Yaman, M., Demirbag, Z., 2001. Insecticidal Potential of *Serratia marcescens*, *Biologia*, 56, 333-336.
- Sevim, E., Çelebi, Ö., ve Sevim, A., 2012. Determination of the bacterial flora as a microbial control agent of *Toxoptera aurantii* (Homoptera: Aphididae), *Biologia* 67 (2): 397-404.
- Sezen, K.; Yaman, M.; Demirbag, Z., 2001. Insecticidal potential of *Serratia marcescens* Bn10, *Biologia (Bratislava)*, 56 (3): 333-336.
- Sezen, K., Demir, İ., Demirbağ, Z., 2007. Identification and pathogenicity of entomopathogenic bacteria from common cockchafer, *Melolontha melolontha* L. (Coleoptera: Scarabaeidae), *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 35, 79-85.
- Sharma, S., Pathak, J., 2014. Pseudomonas in biodegradation, *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, 2 (2): 213-222.
- Shetlar, D.J., 2009. European Pine Sawfly. Ohio State University Extension Fact Sheet HYG-25555-95. ohioline.osu.edu/hyg-fact/2000/2555.html.
- Shi, Z., Wang, L., and Zhang, H., 2012. Low Diversity Bacterial Community and the Trapping Activity of Metabolites from Cultivable Bacteria Species in the Female Reproductive System of the Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* Hendel (Diptera: Tephritidae), *International Journal of Molecular Science*, 13, 6266-6278.
- Shil, R.K., Mojumder, S., Sadida, F.F., Uddin, M., and Dwaipayan, Sikdar., D., 2014. Isolation and Identification of Cellulolytic Bacteria from the Gut of Three Phytophagous Insect Species, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57 (6): 927-932.
- Simandl, J., 1993. Flight dynamics of males in a non-outbreaking population of the European pine sawfly *Neodiprion sertifer* (Geoff.) (Hymenoptera, Diprionidae), *Lesnictviacuta*, 39 (6): 241-243.
- Sood, P., Prabhakar, C.S., and Nath, A., 2010. Ecofriendly management of fruit flies through their gut bacterial, *Journal of Insect Science*. 23: 275-283.
- Şahin, F., 1999. Mikroorganizmaların yağ asitleri profillerine göre tanısı (Microbial Identification System). Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Kursu. Atatürk Üniversitesi Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 66, Erzurum.

- Şimşek, Z., Kondur, Y., 2006. Çankırı Ormanlarının Zararlı Böcekleri ve Mücadele Yöntemleri. Gazi Üniversitesi, *Orman Fakültesi Dergisi*, 6(1): 105-107.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Fılıpskı, A., S. Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0., *Molecular Biology and Evolution*, 30 (12), 2725-2729.
- Tanada, Y., ve Kaya, H.K., 1993. *Insect Pathology*. Academic Press, New York.
- Temiz, A., 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
- Thaochan, N., Drew, R.A.I., Hughes, J.M., Vijaysegaran, S., Chinajariyawong, A., 2010. Alimentary tract bacteria isolated and identified with API-20E and molecular cloning techniques from Australian tropical fruit flies, *Bactrocera cacuminata* and *B. tryoni*, *Journal of Insect Science*, 10 (1), 131, 1-16.
- Vary, P.S., 1994. Prime time for *Bacillus megaterium*, *Microbiology* 140, 1001-1013.
- Vilanova, C., Marco, G., Dominguez-Escriba, L., Genoves, S., Sentandreu, V., Bataller, E., Ramon, D., Porcar, M., 2012. Bacteria from acidic to strongly alkaline insect midguts: Potential sources of extreme cellulolytic enzymes, *Biomass and Bioenergy*, 45, 288-294.
- Wilson, L.F., 1971. European pine sawfly. Forest Pest Leaflet, USDA For. Serv. No. 98.
- Wilson, K., 1997. Preparation of Genomic DNA from Bacteria, *Current Protocols in Molecular Biology*, 2.4.1-2.4.5.
- Woese, C.R., Gutell, R., Gupta, R., and Noller, H.R., 1983. "Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids", *Microbiological Reviews*, 47, 621-669.
- Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution, *Microbiological Reviews*, 51, 221- 271.
- Yadav, K.K., Bora, A., Datta, S., Chandel, K., Gogoi, H.K., Prasad, G.B.K.S., and Veer, V., 2015. Molecular characterization of midgut microbiota of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from Arunachal Pradesh, India, *Parasites & Vectors*, 8, 641.
- Yaman, M., Nalçacıoğlu, R., Demirbağ, Z., 2001. Viral Control of The European Pine Sawfly, *Neodiprion sertifer* (Geoffroy) in Turkey, *Turkish Journal of Biology*, 25, 419-425.
- Yaman, M., Aslan, İ., Çalmaşur, Ö., Şahin, F., 2005. Two bacterial pathogens of *Helicoverpa armigera* (HÜBNER) (Lepidoptera:Noctuidae). Proceedings of the Entomological Society of Washington, 107, 623-626.

- Yaman, M., Ertürk, Ö., Aslan, İ., 2010. Isolation of some pathogenic bacteria from the great spruce bark beetle, *Dendroctonus micans* and its specific predator, *Rhizophagus grandis*, *Folia Microbiologica*, 55, 35-38.
- Yaman, M., Ertürk, Ö., Ünal, S., Selek, F., 2017. Isolation and identification of bacteria from four important poplar pests, *Revista Colombiana de Entomología*, 43 (1): 34-37.
- Yu, H., Wang, Z., Liu, L., Xia, Y., Cao, Y. and Yin, Y., 2008. Analysis of the intestinal microflora in *Hepialus gonggaensis* larvae using 16S rRNA sequences, *Current Microbiology*, 56, 391-396.
- Yun, J.H., Roh, S.W., Whon, T.W., Jung, M.J., Kim M.S., Park D.S., Yoon, C., Nam, Y.D., Kim, Y.J., Choi, J.H., Kim, J.Y., Shin, N.R., Kim, S.H., Lee, W.J., and Bae, J.W., 2014. Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 5254-5264.
- Zhang, Z.Q., He, C., Li, M.L., 2014. Analysis of intestinal bacterial community diversity of adult *Dastarcus helophoroides*, *Journal of Insect Science*, 14 (114), 1-13.

EKLER

EK-1: Ns1 İzolatının 16S rRNA Geni, Kısmi Sırası

Baz Sayısı: 1418 bp

Gen Bank Erişim Numarası: MG544098

```
1 cgtctctcgg taaggagctt gctcctggat tcagcggcgg acgggtgagt aatgcctagg
61 aatctgcctg gtagtggggg acaacgtttc gaaaggaacg ctaataaccg atacgtccta
121 cgggagaaag caggggacct tcgggccttg cgctatcaga tgagcctagg tcggattagc
181 tagttggtga ggtaatggct caccaaggcg acgatccgta actggtctga gaggatgatc
241 agtcacactg gaactgagac acgggtccaga ctctacggg aggcaccagt ggggaatatt
301 ggacaatggg cgaaagcctg atccagccat gccgcgtgtg tgaagaaggc cttcggattg
361 taaagcactt taagtgggga ggaagggcag taaattaata ctttgctgtt ttgacgttac
421 cgacagaata agcaccggct aactctgtgc cagcagccgc ggtaatacag aggggtcaag
481 cgttaatcgg aattactggg cgtaaagcgc gcgtaggtgg ttcgtaagt tggatgtgaa
541 atccccgggc tcaacctggg aactgcattc aaaactgtcg agctagagta tggtagaggg
601 tgggtggaatt tcctgtgtag cggtgaaatg cgtagatata ggaaggaaca ccagtggcga
661 aggcgaccac ctggactgat actgacactg aggtgcgaaa gcgtggggag caaacaggat
721 tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg atgtcaacta gccgttggga gccttgagct
781 cttagtggcg cagctaacgc attaagttga ccgcctgggg agtacggccg caaggttaaa
841 actcaaatga attgacgggg gcccgcaaca gcgggtggagc atgtggttta attcgaagca
901 acgcgaagaa ccttaccagg ccttgacatc caatgaactt tccagagatg gattggtgcc
961 ttcgggaaca ttgagacagg tgctgcatgg ctgtcgtcag ctctgtctgt gagatgttgg
1021 gttaagtccc gtaacgagcg caacccttgt ccttagttac cagcagctca tgggtggcac
1081 tctaaggaga ctgccgtgta caaacgggag gaaggtggag atgacgtcaa gtcacatggt
1141 cccttacggc ctgggttaca cacgtgtcac aatggtcggg acaaaagggt gcccaagccg
1201 gaagtggagc taaaccata aaaccgaccg tagtcccgga tcgactatgt atcgcaactc
1261 gttactgcca gtgaagtctg gaatcgttag taatcgtgaa tcagaatgtc acgggtgaata
1321 cgttcccggg ccttgtacac accgccctgc acaccatggg agtgggttgc accagaagta
1381 gctagtctaa ccttcgggag gacggtacca cggggatc
```

EK-2: Ns2 İzolatının 16S rRNA Geni, Kısmi Sırası

Baz Sayısı: 1440 bp

Gen Bank Erişim Numarası: MG544099

```
1 gcgggcgtgc ctatacatgc agtcgagcga acagataagg agcttctcc tttgacgtta
61 gcgggcggacg ggtgagtaac acgtggataa cctacctata agactgggat aacttcggga
121 aaccggagct aataccgat aacatattga accgcatggt tcaatagtga aaggcggctt
181 tgctgtcact tatagatgga tccgcgccgt attagctagt tggtaaggta acggcttacc
241 aaggcaacga tacgtagccg acctgagagg gtgatcggcc aactgggaaac tgagacacgg
301 tccagactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttccgc aatgggcgaa agcctgacgg
361 agcaacgccg cgtgagtgat gaaggtcttc ggatcgtaaa actctgttat caggaagaa
421 caaatgtgta agtaactgtg cacatcttga cggtaactga tcagaaagcc acggtaact
481 acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt atccggaatt attgggcgta
541 aagcgcgcgt aggccgtttt ttaagtctga tgtgaaagcc cacggctcaa ccgtggaggg
601 tcattggaaa ctggaaaact tgagtgcaga agaggaaagt ggaattccat gtgtagcggg
661 gaaatgcgca gagatatgga ggaacaccag tggcgaaggc gactttctgg tctgtaactg
721 acgctgatgt gcgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga taccctggta gtccacgccc
781 taaacgatga gtgctaagtg ttagggggtt tccgccctt agtgcgagc ctaacgcatt
841 aagcactccg cctggggagt acgaccgcaa ggttgaaact caaaggaatt gacggggacc
901 cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgaagaacct aaccaaatct
961 tgacatcctt tgactgctct aaagaaagag tcttcccctt cgggggacaa agtgacaggt
1021 ggtgcatggt tgctgcagc tcgtgtcgtg aaatgttggg ttaagtcccg caacaagcgc
1081 aaccettaag ctaagttgcc atcattaagt tgggcactct aagttgactg ccggtgacaa
1141 accggaggaa ggtgggatg acgtcaatc atcatgccc ttatgatttg ggctacacac
1201 atgctacaat ggacaatata aaggcagct aaaccgcgag gtcaagcaaa tccataaag
1261 ttgttctcag ttcggattgt agtctgcaac tcgactacat gaagctggaa tcgctagtaa
1321 tcgtagatca gcatgctacg gtgaatacgt tcccgggtct tgtacacacc gcccgctaca
1381 ccacgagagt ttgtaacacc cgaagccggt ggagtaacca ttatggagct agccgtcgaa
```

EK-3: Ns3 İzolatının 16S rRNA Geni, Kısmi Sırası

Baz Sayısı: 1464 bp

Gen Bank Erişim Numarası: MG544100

```
1  tggagctggc  ggcgtgccta  tacatgcagt  cgagcgaact  gattagaagc  ttgcttctat
61  gacgttagcg  gcggacgggt  gagtaacacg  tgggcaacct  gcctgtaaga  ctgggataac
121  ttcgggaaac  cgaagctaata  accggatagg  atcttctcct  tcatgggaga  tgattgaaag
181  atggtttcgg  ctatcactta  cagatgggcc  cgcggtgcat  tagctagttg  gtgaggtaac
241  ggctcaccaa  ggcaacgatg  catagccgac  ctgagagggg  gatcggccac  actgggactg
301  agacacggcc  cagactccta  cgggaggcag  cagtagggaa  tcttccgcaa  tggacgaaag
361  tctgacggag  caacgccgcg  tgagtgatga  aggcttccgg  gtcgtaaaac  tctgttgтта
421  gggagaaca  agtacgagag  taactgctcg  taccttgacg  gtacctaacc  agaaagccac
481  ggctaactac  gtgccagcag  ccgcgtaaat  acgtaggtgg  caagcgttat  ccggaattat
541  tgggcgtaaa  gcgcgcgcag  gcggttctt  aagtctgatg  tgaaagcca  cggctcaacc
601  gtggagggtc  attgaaact  ggggaacttg  agtgcagaag  agaaaagcgg  aattccacgt
661  gtgacggtga  aatgcgtaga  gatgtggagg  aacaccagtg  gcgaaggcgg  ctttttggtc
721  ggtgacaaac  gctgaggcgc  gaaagcgtgg  ggagcaaaca  ggattagata  ccctggtagt
781  ccacgccgta  aacgatgagt  gctaagtgtt  agagggttcc  cgcccttag  tgctgacgtc
841  aacgcattaa  gcaactccgcc  tggggagtac  ggtcgcaaga  ctgaaactca  aaggaattga
901  cgggggccc  cacaagcgg  ggagcatgtg  gtttaattcg  aagcaacgg  aagaacctta
961  ccaggtcttg  acatcctctg  acaactctag  agatagagcg  tccccctcg  ggggacagag
1021  tgacaggtgg  tgcaggttg  tcgtcagctc  gtgtcgtgag  atgttggtt  aagtcccgca
1081  acgagcgcaa  cccttgatct  tagttgccag  catttagttg  ggcactctaa  ggtgactgcc
1141  ggtgacaaac  cggaggaagg  tggggatgac  gtcaaatcat  catgcccctt  atgacctggg
1201  ctacacacgt  gctacaatgg  atggtacaaa  gggctgcaag  accgcgaggt  caagccaatc
1261  ccataaaacc  attctcagtt  cggattgtag  gctgcaactc  gcctacatga  agctggaatc
1321  gctagtaatc  gcggatcagc  atgccgcgg  gaatacgttc  cggggccttg  tacacaccgc
1381  ccgtcacacc  acgagagttt  gtaacacccg  aagtcggtgg  agtaaccgta  aggagctagc
1441  cgcctaaggt  ggacagagat  agag
```

EK-4: Ns4 İzolatının 16S rRNA Geni, Kısmi Sırası

Baz Sayısı: 1453 bp

Gen Bank Erişim Numarası: MG544101

```
1  tggcgctggc  ggcagccta  cacatgcagt  cgaacggtag  cacagagagc  ttgctctcgg
61  gtgacgagtg  gcggacgggt  gagtaatgtc  tgggaaactg  cctgatggag  ggggataact
121  actgaaacg  gtagctaata  ccgcataacg  tcgcaagacc  aaagaggggg  acctcggggc
181  ctcttgccat  cagatgtgcc  cagatgggat  tagctagtag  gtgggtaaac  ggctcaccta
241  ggcgacgatc  cctagctggg  ctgagaggat  gaccagccac  actggaactg  agacacggtc
301  cagactccta  cgggaggcag  cagtggggaa  tattgcaca  tgggcgcaag  cctgatgcag
361  ccattgccgc  tgtatgaaga  aggcctcgg  gttgtaaagt  acttccagcg  gggaggaagg
421  cgataagggt  aataaccttg  ttgattgacg  ttaccgcgag  aagaagcacc  ggctaactcc
481  gtgccagcag  ccgcgtaaat  acggagggtg  caagcgttaa  tcggaattac  tgggcgtaaa
541  ggcacgcag  gcggtctgtc  aagtcggatg  tgaaatccc  gggctcaacc  tgggaactgc
601  attcgaaact  ggcaggctgg  agtctttag  agggggtag  aattccaggt  gtgacggtga
661  aatgcgtaga  gatctggagg  aataccgggt  gcgaaggcgg  ccccctggac  aaagactgac
721  gctcaggtgc  gaaagcgtgg  ggagcaaaca  ggattagata  ccctggtagt  ccacgtgta
781  aacgatgtcg  acttgagggt  tgttcccttg  aggagtggct  tccggagcta  acgcttaag
841  tcgaccgcct  ggggagtacg  gccgcaaggt  taaaactcaa  atgaattgac  gggggcccgc
901  acaagcgtg  ggagcatgtg  gtttaattcg  tgcaacgcga  agaacttac  ctactcttga
961  catccagaga  acttagcaga  gatgcttgg  tgccttcggg  aactctgaga  caggtgctgc
1021  atggctgtcg  tcagctcgtg  ttgtgaaatg  ttgggttaag  tcccgaacg  agcgaaccc
1081  ttatcctttg  ttgccagcgg  tccggccggg  aactcaaagg  agactgccag  tgataaactg
1141  gaggaagggt  gggatgacgt  caagtcac  tggcccttac  gagtaggggt  acacagctgc
1201  tacaatggca  tatacaaa  gaagcacc  cgcgagagca  agcggacctc  ataaagtatg
1261  tcgtagtccg  gattggagtc  tgcaactcga  ctccatgaag  tcggaatcgc  tagtaatcgt
1321  ggatcagaat  gccacggtga  atacgttccc  gggccttgta  cacaccgcc  gtcacaccat
1381  gggagtgggt  tgcaaaagaa  gtaggtagct  taacctcgg  gagggcgct  accacttggg
1441  tcagactggg  cac
```

EK-5: Ns5 İzolatının 16S rRNA Geni, Kısmi Sırası

Baz Sayısı: 1452 bp

Gen Bank Erişim Numarası: MG544102

```
1  taccgcttgg  cggcaggcct  acacatgcag  tcgaacggta  gcacagagag  cttgctctcg
61  ggtgacgagt  ggcggacggg  tgagtaatgt  ctgggaaact  gcctgatgga  gggggataac
121  tactggaaac  ggtagctaat  accgcataac  gtcgcaagac  caaagagggg  gaccttcggg
181  cctcttgcca  tcagatgtgc  ccagatggga  ttagctagta  ggtggggtaa  cgggtcacct
241  aggcgacgat  ccctagctgg  tctgagagga  tgaccagcca  cactggaact  gagacacggg
301  ccagactcct  acgggaggca  gcagtgggga  atattgcaca  atgggcgcaa  gcctgatgca
361  gccatgccgc  gtgtatgaag  aaggccttcg  ggttgtaaag  tactttcagc  ggggagagaa
421  ggcgataagg  ttaataacct  tgtcgattga  cgttaccgcg  agaagagacc  accggtaac
481  tccgtgccag  cagcccggt  aatacggagg  gtgcaacgct  taatcggaat  tactggcgct
541  aaagcgcacg  caggcggct  gtcaagtcgg  atgtgaaatc  cccgggctca  acctgggaa
601  tgcattcgaa  actggcaggc  tggagtcttg  tagagggggg  tagaattcca  ggtgtagcgg
661  tgaatcgct  agagatctgg  aggaataccg  gtggcgaagg  cggcccctg  gacaaagact
721  gacgctcagg  tgcgaaagcg  tggggagcaa  acaggattag  atacctggta  gtcacgctgt
781  aaacgatgct  gacttgagg  ttgttccctt  gaggagtggc  ttccggagct  aacgcgttaa
841  gtcgaccgcc  tggggagtac  ggccgcaagg  ttaaaactca  aatgaattga  cggggccccg
901  cacaagcggg  ggagcatgtg  gtttaattcg  atgcaaccgg  aagaacctta  cctactcttg
961  acatccagag  aacttagcag  agatgctttg  gtgccttcgg  gaactctgag  acaggtgctg
1021  catggctgct  gtcagctcgt  gttgtgaaat  gttgggttaa  gtcccgcaac  gagcgaacc
1081  cttatccttt  gttgccagcg  gttcgctcgg  gaactcaaag  gagactgcca  gtgataaact
1141  ggaggaaggt  ggggatgacg  tcaagtcatc  atggccctta  cgagtagggc  tacacacgtg
1201  ctacaatggc  atatacaaag  agaagcgacc  tcgcgagagc  aagcggacct  cataaagtat
1261  gtcgtagtcc  ggattggagt  ctgcaactcg  actccatgaa  gtcggaatcg  ctagttaatc
1321  tggatcagaa  tgccacgggt  aatacgttcc  cgggccttgg  acacaccgcc  cgtcacacca
1381  tgggagtggg  ttgcaaaaga  agtaggtagc  ttaaccttcg  ggaggcgct  caccacttgg
1441  atcagaacta  ga
```

EK-6: Ns6 İzolatının 16S rRNA Geni, Kısmi Sırası

Baz Sayısı: 1467 bp

Gen Bank Erişim Numarası: MG544103

```
1  gggggggctg  gcggcgtgcc  tatactgcaa  gtcgagcgaa  cagataagga  gttgctcctt
61  tgacgttagc  ggcggacggg  tgagtaacac  gtggataacc  tacctataag  actgggataa
121  cttcgggaaa  ccggagctaa  taccggataa  gattttgaac  cgcatggttc  aatagtgaaa
181  gacggccttg  ctgtcactta  tagatggatc  cgcgccgtat  tagctagttg  gtaaggtaac
241  ggcttaccaa  ggcaacgata  cgtagccgac  ctgagagggt  gatcggccac  actggaactg
301  agacacggtc  cagactccta  cgggagcgag  cagtagggaa  tcttccgcaa  tggcgaaaag
361  cctgacggag  caacgccgcg  tgagtgatga  aggtcttcgg  atcgtaaaac  tctgttatca
421  gggagaaca  aacgtgtaag  taactgtgca  cgtcttgacg  gtacctgatc  agaaagccac
481  ggctaactac  gtgccagcag  ccgcgtaaat  acgtaggtgg  caagcgttat  ccggaattat
541  tgggcgtaaa  gcgcgctgag  gcggtttttt  aagtctgatg  tgaaagccca  cggctcaacc
601  gtggagggtc  attgaaact  ggaaaacttg  agtgcagaag  aggaaagtgg  aattccatgt
661  gtacgggtga  aatgcgcaga  gatatggagg  aacaccagtg  gcgaaggcga  ctttctggtc
721  tgtaactgac  cgctgatgtg  cgaaagcgtg  gggatcaaaa  caggattaga  taccttggtg
781  gtccacgccg  taaacaatga  atgetaagtg  gtagggggtt  tccgcccctt  agtgctgcag
841  ctaacgcatt  aagcactccg  cctggggagt  acgaccgcaa  ggttgaaact  caaaggaatt
901  gacggggacc  cgcacaagcg  gtggagcatg  tggttaattc  gaagcaacgc  gaagaacctt
961  accaaatctt  gacatccttt  gaccgctcta  gagatagagt  tttccccttc  gggggacaaa
1021  gtgacaggtg  gtgcatggtt  tctgctagct  cgtgtcgtga  gatgtgggtg  taagtcccgc
1081  aacgagcgca  acccttaagc  ttagtggcca  tcattaagtt  gggcactcta  agttgactgc
1141  cggtgacaaa  ccggaggaag  gtggggatga  cgtcaaatca  tcatgccctt  tatgatttgg
1201  gctacacacg  tgctacaatg  gacaatacaa  agggcagcta  aaccgcgagg  tcaagcaaat
1261  cccataaagt  tgttctcagt  tcggattgta  gtctgcaact  cgactacatg  aagctggaat
1321  cgctagtaat  cgtagatcag  catgctacgg  tgaatacgtt  cccgggtctt  gtacacaccg
1381  cccgtcacac  cacgagagtt  tgtaaacacc  gaagccgggt  gagtaaccat  ttatggagct
1441  agccgtcgaa  ggtggacaaa  gatgggg
```

EK-7: Ns7 İzolatının 16S rRNA Geni, Kısmi Sırası

Baz Sayısı: 1453 bp

Gen Bank Erişim Numarası: MG544104

```
1  taccgctggc  ggcaggccta  cacatgcagt  cgaacggtag  cacagagagc  ttgctctcgg
61  gtgacgagtg  gcgagcgggt  gagtaatgtc  tgggaaactg  cctgatggag  ggggataact
121 actggaaaacg  gtagctaata  ccgcataacg  tcgcaagacc  aaagaggggg  accttcgggg
181 ctcttgccat  cagatgtgcc  cagatgggat  tagctagtag  gtggggtaac  ggctcaccta
241 ggcgacgatc  cctagctggt  ctgagaggat  gaccagccac  actggaactg  agacacggtc
301 cagactccta  cgggaggcag  cagtggggaa  tattgcacaa  tgggcgcaag  cctgatgcag
361 ccattgcccg  tgtatgaaga  aggccttcgg  gttgtaaagt  actttcagcg  gggaggaagg
421 cgataaggtt  aataaccttg  ttgattgacg  ttaccgcgag  aagaagcacc  ggctaaactc
481 gtgccagcag  ccgcgtaata  acggagggtg  caagcgtaaa  tcggaattac  tgggcgtaaa
541 ggcacgcagc  gcggtctgtc  aagtcggatg  tgaatcccc  gggctcaacc  tgggaactgc
601 attcgaact  ggcaggctgg  agtctttag  agggggtag  aattccaggt  gtagcgtgga
661 aatgcgtaga  gatctggagg  aataccggtg  gcgaaggcgg  cccccggac  aaagactgac
721 gctcagggtc  gaaagcgtgg  ggagcaaaac  ggattagata  ccctggtagt  cacgctgtaa
781 acgatgtcga  cttggaggtt  gttcccttga  ggagtggctt  ccggagctaa  cgcgttaagt
841 cgaccgcctg  gggagtacgg  ccgcaagggt  aaaactcaaa  tgaattgacg  ggggcccgca
901 caagcgggtg  agcatgtggt  ttaattcgat  gcaacgcgaa  gaaccttacc  taactcttga
961 catccagaga  acttagcaga  gatgctttgg  tgccttcggg  aactctgaga  caggtgctgc
1021 atggctgtcg  tcagctctg  ttgtgaaatg  ttgggttaag  tcccgcacg  agcgcacacc
1081 ttatcctttg  ttgccagcgg  tccggtcggg  aactcaaagg  agactccag  tgataaactg
1141 gaggaaggtg  gggatgacgt  caagtcacat  tggcccttac  gagtagggct  acacacgtgc
1201 tacaatggca  tatacaaaga  gaagcacct  cgcgagagca  agcggacctc  ataaagtatg
1261 tcgtagtccg  gattggagtc  tgcaactcga  ctccatgaag  tcggaatcgc  tagtaatcgt
1321 ggatcagaat  gccacggtga  atacgttccc  gggccttgta  cacaccgcc  gtcacaccat
1381 gggagtgggt  tgcaaaaaga  gtaggtagct  taaccttcgg  gagggcgctt  accacttggt
1441 atcagactgg  gcg
```

EK-8: Ns8 İzolatının 16S rRNA Geni, Kısmi Sırası

Baz Sayısı: 1451 bp

Gen Bank Erişim Numarası: MG544105

```
1  ttgacgctgg  cggcaggcct  acacatgcag  tcgagcggta  gcacagagag  cttgctctcg
61  ggtgacgagc  ggcgagcggg  tgagtaatgt  ctgggaaact  gcctgatgga  ggggataaac
121 tactgaaaac  ggtagctaata  accgcataac  gtcgcaagac  caaagtgggg  gaccttcggg
181 cctcatgcca  tcagatgtgc  ccagatggga  ttagctagta  ggtggggtaa  tggtcacctt
241 aggcgacgat  ccctagctgg  tctgagagga  tgaccagcca  cactggaact  gagacacggg
301 ccagactcct  acgggaggca  gcagtgggga  atattgcaca  atgggcgcaa  gcctgatgca
361 gccatgccgc  gtgtatgaag  aaggccttcg  ggttgtaaa  tactttcagc  gaggaggaag
421 gcattaaggt  taataacctt  ggtgattgac  gttactcgca  gaagaagcac  cggctaaactc
481 cgtgccagca  gccgcggtaa  tacggagggg  gcaagcgtaa  atcggaatta  ctgggcgtaa
541 agcgcacgca  ggcggtttgt  taagtcagat  gtgaaatccc  cgggctcaac  ctgggaactg
601 catttgaaac  tggcaagctt  gagtcttgta  gaggggggta  gaattccagg  tgtagcggtg
661 aatgcgtag  agatctggag  gaataccggt  ggcgaaggcg  gccccctgga  caaagactga
721 cgctcagggt  cgaaagcgtg  gggagcaaac  aggattagat  accctggtag  tcacgctgta
781 acgatgtcgc  acttgagggt  tgttcccttg  aggagtggct  tccggagcta  acgcgttaag
841 tgcaccgct  ggggagtacg  gccgcaagg  taaaactcaa  atgaattgac  gggggcccgc
901 acaagcggtg  gagcatgtgg  ttaattcga  tgcaacgcga  agaaccttac  ctaactcttg
961 acatccagag  aacttagcag  agatgctttg  gtgccttcgg  gaactctgag  acaggtgctg
1021 catggctgtc  gtcagctcgt  gttgtgaaat  gttgggttaa  gtcccgcac  gagcgcaacc
1081 cttatccttt  gttgccagcg  gttcggctcg  gaactcaaag  gagactgcca  gtgataaact
1141 ggaggaaggt  ggggatgacg  tcaagtcac  atggccctta  cgagtggggc  tacacacgtg
1201 ctacaatggc  atatacaaag  agaagcgacc  tcgcgagagc  aagcggacct  cataaagtat
1261 tgctagtagc  ggattggagt  ctgcaactcg  actccatgaa  ctcggaatcg  gtcgtaatcg
1321 tagatcagaa  tgctacggtg  aatacgttcc  cgggccttgg  acacaccgcc  cgtcacacca
1381 tgggagtggg  ttgcaaaaag  agtaggtagc  ttaaccttcg  ggaggcgcc  accacttgga
1441 tcagactgga  c
```

EK-9: Ns9 İzolatının 16S rRNA Geni, Kısmi Sırası

Baz Sayısı: 1425 bp

Gen Bank Erişim Numarası: MG544106

```
1 cctacacatg cagtcggacg gtagcacaga ggagcttgct ccttgggtga cgagtggcgg
61 acgggtgagt agtgtctggg gatctgcccg atagaggggg ataaccactg gaaacggtgg
121 ctaataccgc ataacgtcgc aagaccaaag agggggacct tcgggcctct cactatcggg
181 tgaaccaga tgggattatc tagtacgcgg ggtagtggcc cacctaggcg acgatcccta
241 tctggtctga gaggatgacc agccacactg gaactgacac acggtccaca ctctacggg
301 aggcagcagt ggggaatatt gcacagtggg cgcaagcctg atgacccat gccgctgta
361 tgaagaagc cttcgggttg taaagtactt tcagcgggga ggaagcgat gccgttaata
421 accgcgtcga ttgacgttac ccgcagaaga agcaccggct aactccgtgc cagcagccgc
481 ggtaatacag agggtgcaag cgттаатcag aattactggg cgtaaagcgc acgcacgagg
541 tctgttaact cagatgtgaa atccccgggc ttaacctggg aactgcattt gaactggcac
601 gcttgactct tgtagagggg ggtagaattc catgtgtagc ggtgaaatgc gtagagatct
661 ggaggaatac cgggtggcga cgcggcccct ggacaaagac tgacgctcag gtgcgaaagc
721 gttgggagca aacagatta gatactggg agtcacgccc taaacgatgt cgactgggag
781 gttgttcct tgaggagtgg cttccggagc taacgcgtta agtcgaccgc ctggggagta
841 cggccgcaag gttaaaactc aatgaattg acggggggccc gcacaagcgg tggagcatgt
901 gtttaattcg atgcaacgcg aagaacctta cctactcttg acatccagcg aatttagcag
961 agatgctttg gtgccttcgg gaacggtgag acagtgctg catgctgtc gtcagctcgt
1021 gttgtgaaat gttgggttaa gtcccgaac gagcgcgaacc cttatccttt gttgccagcg
1081 attcggctcg gaactcaaag gagactgccg gtgataaacc ggaggaaggt ggggatgacg
1141 tcaagtcate atggccctta cgagtagggc tacacacgtg ctacaatggc gcatacaaa
1201 agaagcgacc tcgcgagagc aagcggacct cacaaagtgc gtcgtagtcc ggatcggagt
1261 ctgcaactcg actccgtgaa gtcggaatcg ctagtaatcg tggatcagaa tgccacgggtg
1321 aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca tgggagtggg ttgcaaaaga
1381 agtaggtagc ttaaccttcg ggagggcgcc taccacttgg atcag
```

EK-10: Ns10 İzolatının 16S rRNA Geni, Kısmi Sırası

Baz Sayısı: 1470 bp

Gen Bank Erişim Numarası: MG544107

```
1 aaggacgctg gggcgtgcc tatacatgca gtcgagcgaa cagataagga gcttgcctct
61 ttgacgttag cggcggacgg gtgagtaaca cgtggataac ctacctataa gactgggata
121 acttcgggaa accggagcta ataccggata agattttgaa ccgcatgggt caatagtgaa
181 agacggcctt gctgtcactt atagatggat ccgcgccgta ttagctagtt ggtaaggtaa
241 cggcttacca aggcaacgat acgtagccga cctgagaggg tgatcggcc aactggaact
301 gagacacggt ccagactcct acgggaggca gcagtaggga atcttcgcga atggcgaaa
361 gcctgacgga gcaacgcgcg gtgagtatg aaggtcttcg gatcgtaaaa ctctgttatc
421 agggaagaac aaacgtgtaa gtaactgtgc acgtcttgac ggtacctgat cagaaagcca
481 cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggtg gcaagcgtta tccggaatta
541 ttgggcgtaa agcgcgcgta ggcggtttt taagtctgat gtgaaagccc acggctcaac
601 cgtggagggg cattgaaac tggaaaactt gagtgcagaa gaggaaagtg gaattccatg
661 tgtagcggtg aaatgvcag agatatggag gaacaccagt ggcgaaggcg actttctggt
721 ctgtaactga cgctgatgtg cgaaagcgtg gggatcaaac aggattagat acctgtagt
781 ccacgccgta aacgatgagt gctaagtgtt agggggtttc cggcccttag tgctgcagct
841 aacgcattaa gcaactccgc tggggagtac gaccgcaagg ttgaaactca aaggaattga
901 cggggaccgg cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgg aagaacctta
961 ccaaactctg acatcctttg acagctctag agatagagtt tcccccttcg ggggcaaaag
1021 tgacaggtgg gtgcatgggt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc
1081 aacgagcgca acccttaagc ttagtgtcca tcattaagtt gggcactcta agttgactgc
1141 cggtgacaaa ccggaggaag gtgggatga cgtcaaatca ccatgcccct tatgatttgg
1201 gctacacacg tgctacaatg gacaatacaa agggcagcta aaccgcgagg tcaagcaaat
1261 ccataaagt tgttctcagt tcggattgta gtctgcaact cgactacatg aagctggaat
1321 cgtagtaaat cgtagatcag catgctacgg tgaatacgtt cccgggtctt gtacacaccg
1381 cccgtcacac cacgagagtt tgtaacacce gaagccgggt gagtaaccat ttatggagct
1441 agccgtcgaa ggtggacaaa tgattggggg
```

EK-11: Ns11 İzolatının 16S rRNA Geni, Kısmi Sırası

Baz Sayısı: 1453 bp

Gen Bank Erişim Numarası: MG544108

```
1 tttacgttgg cggcaggcct acacatgcag tccgacggta gcacagagga gcttgcctct
61 tgggtgacga gtggcggacg ggtgagtagt gtctggggat ctgcccgata gagggggata
121 accactggaa acggtggcta ataccgcata acgtcgcaag accaaagagg gggaccttcg
181 ggcctctcac tatcggatga acccagatgg gattagctag taggcggggg agtggcccac
241 ctaggcgacg atccctatct ggtctgagag gatgaccacc cacactggaa ctgacacacg
301 gtccacactc ctacgggagg cagcagtggg gaatatgca cagtggggcg aagcctgatg
361 caccatgcc gcgtgtatga agaaggcctt cgggttgtaa agtacttca gcggggagga
421 aggcgatgcg gttaataacc gcgtcgattg acgttaccgg cagaagaagc accggctaac
481 tccgtgccag cagccgcggt aatacagagg gtgcaagcgt taatcggat tactggcggt
541 aaagcgacg cacgcggtct gttaagtcaag atgtgaaatc cccgggctta acctgagaac
601 tgcatttgaa actggcaggc ttgactcttg tagagggggg tagaattcca tgtgtagcgg
661 tgaatgcgt agagatctgg aagaataccg gtggagaagg cggccctctg gacaaagact
721 gacgctcagg tgcgaaagcg tggggagcaa acagattag ataccgtgat actcacgccc
781 taaacgatgt cgacttgagg gttgttcctt tgaggagtgg cttccggagc taacgcgta
841 agtccaccgc ctggggagta cggccgcaag gttaaaactc aaatgaattg acgggggccc
901 gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gatgcaacgc gaagaacctt acctactctt
961 gacatccagg gaatgtagca gagatgcttt ggtgccttcg ggaacctgga gacaggtgct
1021 gcatggctgt cgtcagctcg tgttgtaaaa tgttgggta agtcccgcaa cgagcgcaac
1081 ccttatcctt tgttgccagc gattcggctg ggaactcaa ggagactgcc ggtgataaac
1141 cggaggaagg tgggatgac gtcaagtcat catggccctt acgagtagg gctacacacg
1201 gctacaatgg cgcatacaaa gagaagcgac ctgcgagag caagcggacc tcacaaagt
1261 cgtcgtagtc cggatcggag tctgcaactc gactccgtga agtcggaatc gctagtaatc
1321 gtggatcaga atgccacggt gaatacgttc cggggccttg tacacaccgc ccgtcacacc
1381 atgggagtgg gttgcaaaa aagtaggtag cttaaccttc gggagggcgc tcaccacttg
1441 gatcagactg gga
```

EK-12: Ns12 İzolatının 16S rRNA Geni, Kısmi Sırası

Baz Sayısı: 1453 bp

Gen Bank Erişim Numarası: MG544109

```
1 tgtgcgtggc ggcaggctta cacatggcag tccgacgggg gagggtagcc ttcgcgtacc
61 tgacctagcg gcggacgggt gagtaatgct taggaatctg cctattagtg ggggacaaca
121 tctcgaaagg gatgtaata ccgcatacgt cctacgggag aaagcagggg accttcgggc
181 cttgcgctaa tagatgagcc taagtcggat tagctagttg gtgggtaaa ggcctacca
241 ggcgacgac tgtagcgggt ctgagaggat gatccgccac actgggactg agacacggcc
301 cagactccta cgggaggcag cagtggggaa tattggacia tggggggaac cctgatccag
361 ccatgcccg tgtgtgaaga aggccttttg gttgtaaagc actttaagcg aggaggaggc
421 taccgagatt aatactcttg gatagtggac gttactcgca gaataagcca cgggctaact
481 ctgtgccagc agccgcggta atacagaggg tgcaagcgtt aatcggattt actgggcgta
541 aagcgcgct aggtggccea ttaagtcaaa tgtgaaatcc ccgagcttaa cttgggaatt
601 gattcgata ctggtggct agagtggg agaggatggt agaattccag gtgtagcgg
661 gaaatcgta gagatctgga ggaataccga tggcgaaggc agccatctgg cctaatactg
721 aactgaggt gcgaaagcat ggggagcaaa caggattaga taccctggtg gtccatgccg
781 taaacgatgt ctactagccg ttggggcctt tgaggcttta gtggcgcagc taacgcgata
841 agtagaccgc ctggggagta cggtcgcaag actaaaactc aaatgaattg acgggggccc
901 gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gatgcaacgc gaagaacctt acctggtctt
961 gacatagtaa gaactttcca gagatggatt ggtgccttcg ggaacttaca tacaggtgct
1021 gcatggctgt cgtcagctcg tctcgtgaga tgttgggta agtcccgcaa cgagcgcaac
1081 ccttttcctt atttgccagc gggttaagcc gggaaactta aggatactgc cagtgacaaa
1141 ctggaggaag gcggggacga cgtcaagtca tcatggcctt tacgaccagg gctacacacg
1201 tgctacaatg gtcggtacaa agggttgcta ccacgcgagt ggatgctaat ctcaaaaagc
1261 cgatcgtagt ccggattgga gtctgcaact cgactccatg aagtcggaat cgctagtaat
1321 cgcgatcag aatgcccgcg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac
1381 catgggagtt tgttgacca gaagtaggta gtctaacgca aggaggacgc caccacgggg
1441 gcagagactt gct
```

EK-13: Ns13 İzolatının 16S rRNA Geni, Kısmi Sırası

Baz Sayısı: 1456 bp

Gen Bank Erişim Numarası: MG544110

```
1  tttacctggc  ggcaggccta  ccatggcagt  cggacggtag  cacagaggag  cttgtcctt
61  ggggtgacgag  tggcggacgg  gtgagtagtg  tctggggatc  tgcccgatag  agggggataa
121  ccactggaaa  cgggtggctaa  taccgcataa  cgtcgcgaaga  ccaaagaggg  ggaccttcgg
181  gcctctcact  atcggatgaa  cccatatggg  attatctaata  acgcggggta  atggcccacc
241  taggcgacta  tccctatctg  gtctgagagg  atgaccaccc  aactggaac  tgacacacgg
301  tccacactcc  tacgggaggc  agcagtgggg  aatattgcac  aatgggcgca  agcctgatgc
361  acccatgccg  cgtgtatgaa  gaaggccttc  gggttgtaaa  gtactttcag  cggggaggaa
421  ggcgatgcgg  ttaataaccg  cgtcgattga  cgttaccgcg  agaagaagca  cgggctaact
481  ccgtgccagc  agccgcggta  atacagaggg  tgcaagcggt  aatcagaatt  actgggcgta
541  aagcgcacgc  acgcggtctg  ttaactcaga  tgtgatatcc  cggggcttaa  cctgagaact
601  gcatttgaaa  ctggcaggct  tgactcttgt  agaggggggg  taaaattcca  ggtgtagcgg
661  tgaaatgcat  agagatctgg  aagaataaccg  gtggcgaacg  cggccccctg  gacaaagact
721  gacgctcagg  tgcgaaagcg  tggggagcaa  acagagatta  gataccctga  tactcacgcc
781  gtaaaccgatg  tccacttggg  ggttggtccc  ttgaggagtg  gcttccggag  ctaacgcggt
841  aagtcgaccg  cctggggagt  acggccgcaa  ggttaaaact  caaatgaatt  gacggggggc
901  cgcacaagcg  gtggagcatg  tggtttaatt  cgatgcaacg  cgaagaacct  tacctactct
961  tgacatccag  cgaatttagc  agagatgctt  tgggtccttc  gggaacgggtg  acacaggtgc
1021  tgcattggctg  ccctcagctc  gtgttgtgaa  atgttgggtt  aagtcgccga  acgagcgcaa
1081  cccttatcct  ttggtgccag  cgattcggtc  gggaaactcaa  aggagactgc  cggtgataaa
1141  ccggaggaag  gtggggatga  cgtcaagtca  tcatggccct  tacgagtagg  gctacacacg
1201  tgctacaatg  ggcatacaa  agagaagcga  cctcgcgaga  gcaagcggac  ctcaaaaagt
1261  gcgtcgtagt  ccggatcgga  gtctgcaact  cgactccgtg  aagtcggaat  cgctagtaat
1321  cgtggatcag  aatgccacgg  tgaatacgtt  cccgggcctt  gtacacaccg  cccgtcacac
1381  catgggagtg  ggttgcaaaa  gaagtaggta  gcttaacctt  cgggagggcg  cctaccactt
1441  gtgatcagac  tgggaa
```


ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : YILDIRIM, Başak

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri :19.09.1990, Artvin

Medeni hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Telefon : 05468080878

e-posta : basak08000@hotmail.com

Eğitim

Derece

Eğitim Birimi

Mezuniyet Tarihi

Lisans

AÇÜ / Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü

2014