

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

Yüksek Lisans Tezi

***WOLBACHIA* (ALPHA-PROTEOBACTERIA,
RICKETTSIAE) ENFEKSİYONUNUN *TRICHOGRAMMA*
TÜRLERİNDE BAZI BİYOLOJİK ÖZELLİKLER
ÜZERİNE ETKİSİ**

Tuğba KAYA BARAN

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Fahriye ERCAN**

Yozgat 2014

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

Yüksek Lisans Tezi

***WOLBACHIA* (ALPHA-PROTEOBACTERIA,
RICKETTSIAE) ENFEKSİYONUNUN *TRICHOGRAMMA*
TÜRLERİNDE BAZI BİYOLOJİK ÖZELLİKLER
ÜZERİNE ETKİSİ**

Tuğba KAYA BARAN

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Fahriye ERCAN**

**Bu çalışma, Bozok Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından 2012FBE/T11 kodu ile desteklenmiştir.**

T.C
BOZOK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ ONAYI

Enstitümüzün Biyoloji Anabilim Dalı 70110310007 numaralı öğrencisi Tuğba KAYA BARAN'ın hazırladığı "*Wolbachia* (alpha-Proteobacteria, Rickettsiae) enfeksiyonunun *Trichogramma* türlerinde bazı biyolojik özellikler üzerine etkisi" başlıklı YÜKSEK LİSANS tezi ile ilgili TEZ SAVUNMA SINAVI, Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği uyarınca 25/03/2014 günü saat 13.00'te yapılmış, tezin onayına OY BİRLİĞİYLE karar verilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Dilek PANDIR



Üye : Yrd. Doç. Dr. Fahriye ERCAN (Danışman)



Üye : Yrd. Doç. Dr. Sedat PER



ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
TABLolar LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
KISALTMALAR LİSTESİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Trichogramma</i>	3
2.2. <i>Wolbachia</i>	6
3. YÖNTEMLER	12
3.1. Gereçler	12
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Böcek Kültürleri	12
3.1.1.1 Yumurta Parazitoiti, <i>Trichogramma embryophagum</i> (Hartig) ve <i>Trichogramma cacoeciae</i> (Marchal)'nın Sistematığı	12
3.1.1.2 Un Güvesi, <i>Ephestia kuehniella</i> (Zeller)'nin Sistematığı	13
3.2. Yöntemler	14
3.2.1. <i>Trichogramma</i> Türlerinin Laboratuvar Koşullarında Üretimi	14
3.2.2. <i>Ephestia kuehniella</i> (Zeller)'nin Laboratuvar Koşullarında Üretimi	14
3.2.3. Moleküler Çalışmalar	15
3.2.3.1. DNA İzolasyonu	15

3.2.3.2. ITS2 PCR Ve Örneklerin Tür Teşhisi.....	15
3.2.3.3. Kültürlerde <i>Wolbachia</i> Enfeksiyonunun Tespiti.....	16
3.2.3.4. Ömür Uzunluğu Ve Parazitleme Kapasitesi Denemeleri	17
3.2.3.5. İstatistiksel Analiz.....	18
4. BULGULAR.....	19
4.1. <i>Trichogramma</i> Kültürlerinin Teşhis Sonuçları.	19
4.2. Kültürlerde <i>Wolbachia</i> Enfeksiyonu Tespiti.....	22
4.3. <i>T. embryophagum</i> ve <i>T. cacoeciae</i> 'nin Ömür Uzunluğu ve Parazitleme Kapasitesi Denemeleri.....	24
4.4. <i>T. embryophagum</i> ve <i>T. cacoeciae</i> 'da Partenogenez Türünün Belirlenmesi..	26
4.5. <i>T. embryophagum</i> Dişilerinde Sıcaklık Uygulaması.....	26
5. TARTIŞMA – SONUÇ VE ÖNERİLER	29
KAYNAKLAR	34
ÖZGEÇMİŞ	39

**WOLBACHIA (ALPHA-PROTEOBACTERIA, RICKETTSIACEAE)
ENFEKSİYONUNUN *TRICHOGRAMMA* TÜRLERİNDE BAZI BİYOLOJİK
ÖZELLİKLER ÜZERİNE ETKİSİ**

Tuğba KAYA BARAN

**Bozok Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

2014; Sayfa: 39

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Fahriye ERCAN

ÖZET

Wolbachia cinsine ait endosimbiontlar özellikle *Trichogramma* cinsi parazitoidlerde yaygın olarak görülmektedir. *Wolbachia*, bazı *Trichogramma* türlerinde tam partenogeneze (telitoki) neden olan zorunlu hücre içi bakteridir. Bu çalışmanın amacı bakteri varlığının *Trichogramma* türlerinde ömür uzunluğu ve parazitlenme kapasitesi gibi bazı biyolojik özellikler üzerine etkisini belirlemektir. Çalışmada, *Trichogramma embryophagum* (Hartig)'da *Wolbachia* enfeksiyonunun varlığı wsp-PCR yöntemi ile tespit edilmiştir. *T. embryophagum* ve *Wolbachia* taşımadığı belirlenen *Trichogramma cacoeciae* (Marchal) türleri ömür uzunluğu ve parazitlenme kapasiteleri açısından karşılaştırılmıştır. *T. cacoeciae* ait bireyler daha uzun süre yaşamasına karşın bu fark istatistiksel olarak önemli değilken ($P>0,05$), parazitlenme kapasitesi açısından bu tür daha başarılıdır ve fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0,05$). Aynı zamanda *T. embryophagum*'a ait dişiler sıcaklık ile ($>30^{\circ}\text{C}$) muamale edilerek bakteri tedavi edilmiş ve bakteri içeren (telitoki) ve sıcaklık uygulanan bireyler aynı biyolojik özellikler açısından karşılaştırılmıştır. Ömür uzunluğu ve parazitlenme açısından iki grup arasında bir fark bulunmamıştır. Sonuç olarak *T. embryophagum* türü için *Wolbachia* varlığının türün bazı biyolojik özellikleri üzerine negatif ya da pozitif etkiye sahip olmadığı ve *T. cacoeciae*'nin biyolojik mücadele programlarında başarıyla kullanılabilceği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Trichogramma embryophagum*, *Trichogramma cacoeciae*, *Wolbachia*, telitoki, partenogenez

**EFFECT OF WOLBACHIA (ALPHA-PROTEOBACTERIA, RICKETTSIACEAE)
INFECTION ON SOME BIOLOGICAL PROPERTIES OF TRICHOGRAMMA
SPECIES**

Tuğba KAYA BARAN

**Bozok University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Master of Science Thesis**

2014; Page: 39

Thesis Supervisor: Assist. Prof. Fahriye ERCAN

ABSTRACT

Endosymbionts of the genus *Wolbachia* are widely seen particularly parasitoids of the genus *Trichogramma*. *Wolbachia* is an obligate intracellular bacteria that causes fully parthenogenesis (thelytoky) in some *Trichogramma* species. The aim of this study was to determine the effect of the presence of bacteria in some biological properties like the longevity and parasitism capacity of *Trichogramma* species. The presence of *Wolbachia* infection in *Trichogramma embryophagum* (Hartig) was defined by wsp-PCR technique in the study. *T. embryophagum* and *Trichogramma cacoeciae* (Marchal) that determined not have *Wolbachia*, were compared according to their longevity and parasitization capacities. *T. cacoeciae* adults survived longer but this difference wasn't statistically important ($P>0,05$), according to parasitization capacity this species was more successful and difference was statistically important ($P<0,05$). Also, *T. embryophagum* females were treated with temperature ($>30^{\circ}\text{C}$) for curing bacteria and bacteria containing (thelytoky), and temperature applied adults were compared by same properties. There was no difference found between the two groups in terms of longevity and parasitization. As a result, it has been demonstrated that, in *T. embryophagum* presence of *Wolbachia* haven't got a negative or positive effect on some biological properties and *T. cacoeciae* can be used successfully in biological control programs.

Keywords: *Trichogramma embryophagum*, *Trichogramma cacoeciae*, *Wolbachia*, thelytoky, parthenogenesis

TEŞEKKÜR

Tez alıőmamın tım aőamalarında büyük ilgi ve desteğini grdğm, bilgilerinden yararlandığım ve çalıőmalarımı yönlendiren danıőmanım Yrd. Doç. Dr. Fahriye ERCAN'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen Biyoloji Bölümü'ndeki bütün hocalarıma teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalıőmamın esnasında bana destek olan eőim Serhat BARAN'a ve gülümsemesi ile bana enerji veren oğluma teşekkür ederim.

TABLULAR LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1: Türkiye’de bulunan <i>Trichogramma</i> Türleri ve Konukçuları	4
Tablo 2.2: Farklı eklembacaklı gruplarında görülen <i>Wolbachia</i> fenotipleri	8
Tablo 4.3: <i>Trichogramma embryophagum</i> ’a ait ITS2 sekans sonucu.....	19
Tablo 4.4: <i>Trichogramma cacoeciae</i> ’ya ait ITS2 sekans sonucu.....	21
Tablo 4.5: <i>Trichogramma embryophagum</i> ’a ait wsp-PCR sekans sonucu.....	22

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : <i>Trichogramma</i> türlerinin hayat döngüsü.....	4
Şekil 2.2: A) <i>Wolbachia</i> ile enfekte olmamış parazitoitte döllenmemiş yumurtadan (arhenotoki) haploid (n) erkek bireyler, döllenmiş yumurtadan diploid (2n) dişi bireyler oluşur. B) <i>Wolbachia</i> ile enfekte olmuş parazitoitte (telitoki partenogenez induksiyonu, PI) döllenmemiş bütün yumurtalardan diploid dişiler gelişir. PI <i>Wolbachia</i> için bir avantajdır, çünkü bakteri sadece dişiler aracılığıyla iletilir.....	10
Şekil 4.3: <i>T. embryophagum</i> (T.e) ve <i>T. cacoeciae</i> (T.c) dişi bireylerinin besin (Bal) varlığında ömür uzunluğu	24
Şekil 4.4: <i>T. embryophagum</i> (T.e) ve <i>T. cacoeciae</i> (T.c) dişi bireylerinin besinsiz (Bal) ömür uzunluğu.....	25
Şekil 4.5: <i>T. embryophagum</i> (T.e) ve <i>T. cacoeciae</i> (T.c) dişi bireylerinin günlük parazitleme oranı, ergin, dişi ve erkek birey çıkışları	25
Şekil 4.6: <i>T. embryophagum</i> (T.e) ve <i>T. cacoeciae</i> (T.c) dişi bireylerinin ömür boyu parazitleme oranı, ergin, dişi ve erkek birey çıkışları.....	26
Şekil 4.7: <i>T. embryophagum</i> (T.e) ve <i>T. cacoeciae</i> (T.c) çiftleşmemiş dişi bireylerinin parazitleme sayısı, ergin, dişi ve erkek birey çıkışları.....	27
Şekil 4.8: 25±1 °C (T.e) ve >30 °C (T.e-1) sıcaklıklarda yetiştirilen <i>T. embryophagum</i> dişi bireylerinin parazitleme sayısı, ergin, dişi ve erkek birey çıkışları	28
Şekil 4.9: 25±1 °C ve >30 °C sıcaklıklarda yetiştirilen <i>T. embryophagum</i> (T.e ve T.e-1) dişi bireylerinin ömür uzunluğu	28

KISALTMALAR LİSTESİ

Ark	: Arkadaşları
C	: Santigrat
Cl	: Sitoplazmik Uyumsuzluk
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit.
E	: <i>Ephestia</i>
F	: Feminizasyon
ITS2	: Internally Transcribed Spacer 2
mm	: Milimetre
MK	: Erkek Öldürme
Par	: Parazitleme
P ₁	: Partenogenez
sn	: Saniye
T	: <i>Trichogramma</i>
T.c	: <i>Trichogramma cacoeciae</i>
T.e	: <i>Trichogramma embryophagum</i>

1. GİRİŞ

Zararlı böceklerin, doğadaki mevcut doğal düşmanları yardımıyla ekonomik zarar düzeyinin altında tutulması işlemine biyolojik mücadele denilmektedir. Biyolojik mücadelede hedef, kimyasal mücadelede olduğu gibi zararlıları tümüyle yok etmek değil, ekonomik zarar düzeyinin altında tutmak ve söz konusu zararlıların doğal düşmanlarının doğada sürekliliğini sağlamaktır [1].

Biyolojik mücadelede kullanılan doğal düşmanlar avcı, parazit, parazitoit veya zararlı canlıda hastalık yapıcı bir patojen olabilir. Günümüzde, özellikle tarımla uğraşan kişiler başta olmak üzere, çevre bilinci gelişmiş kesimde “Biyolojik Mücadele” ifadesi önem kazanmıştır. Doğada var olan sınırlayıcı faktörler birçok organizmanın ya da canlının zararlı duruma gelmesine neden olabilir. Çevre faktörleri (abiyotik faktörler) ve doğal düşmanlar (biyotik faktörler) doğal biyolojik mücadeleyi oluşturan önemli unsurlardır. Biyolojik mücadeleyi, doğal biyolojik mücadeleden ayıran en önemli özellik doğal düşmanların insanlar tarafından kullanılmasıdır.

Biyolojik mücadele çalışmalarında doğal düşman olarak kullanılan *Trichogramma* cinsi yumurta parazitoitleri, özellikle lepidopter zararlılara karşı biyolojik mücadelede başarılı sonuçlar sağlamaktadır [2]. *Trichogramma*, Hymenoptera takımında, Trichogrammatidae familyası içerisinde yer alan 80 cinsten biridir. *Bu parazitoit arılar* biyolojik mücadele ajanı olarak başarıyla kullanılmaktadır ve yürütülen biyokontrol programlarında da oldukça büyük bir potansiyele sahiptir [3]. Günümüzde biyolojik mücadeleye dayalı entegre mücadele yöntemlerinin kullanılması önerilmekte ve desteklenmektedir. Özellikle parazitoit arıların bu amaçla biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılmaları ve bunun için yetiştirilmeleri yaygınlaşmaktadır. *Trichogramma* bu biyolojik mücadele ajanları içerisinde geniş ölçüde kullanılan parazitoit arı türlerini içermektedir.

Hymenoptera’da görülen en yaygın üreme modelinde döllenmemiş yumurtalardan sadece haploid erkek bireyler çıkarken (arhenotoki), döllenmiş yumurtalardan diploid dişi bireyler çıkar. Telitoki ise Hymenoptera’da ve dolayısıyla *Trichogramma*’da

görülen, döllenmemiş yumurtadan sadece dişi bireylerin geliştiği bir diğer üreme şeklidir [4] ve bazı *Trichogramma* türlerinde *Wolbachia* cinsine ait bakteri tarafından oluşturulur. Bu endosimbiont, alfa-Proteobacteria'nın Rickettsiaceae familyasında yer almaktadır [5] ve birçok arthropod türünde bulunan intrasellular bir bakteridir. Çeşitli yollarla konukçusunun üremesini değiştiren bu bakteri, parazitoit arı türlerinde ve nematodlarda tam partenogenez (telitoki) oluşumuna neden olur. Böcek türlerinin yaklaşık %20'sinin *Wolbachia* ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir [6].

Biyolojik mücadele için partenogeneze neden olan *Wolbachia* ile enfekte olmuş *Trichogramma*'nın kullanımı bazı potansiyel avantajlar sağlayabilir. Telitoki sonucunda hiç erkek üretilmemesi ya da sadece dişi bireylerin meydana gelmesi doğal düşmanın popülasyon büyüme oranını arttırır. Bu durum aynı zamanda kitle üretim maliyetini azaltır, çünkü sadece dişi bireyler oluşmaktadır. Bir diğer avantaj ise dişilerin çiftleşmek için zaman harcamadığından kolonizasyonun daha hızlı gerçekleşmesidir. Bu avantajlar *Trichogramma*'daki *Wolbachia* enfeksiyonuna olan ilgiyi arttırmıştır. Bir biyolojik mücadele programının başarılı olabilmesi için en önemli evre doğal düşmanın doğru seçilmesi ve bu doğal düşmanın parazitlenme kapasitesidir. *Trichogramma* türlerinin kullanılacağı bir çalışma için parazitoit arı tarafından üretilen eşey oranı oldukça önemlidir. Çünkü sadece dişi bireyler konukçu yumurtasını parazitler ve etkisiz hale getirir. Bu durum göz önüne alınacak olursa sadece dişi bireylerin gelişimi ile sonuçlanan telitoki olayı biyolojik mücadelenin başarısı açısından bir avantaj yaratabilir [7].

Çalışmamızda *T. embryophagum* ve *T. cacoeciae* türleri kullanılmıştır. *T. embryophagum*'da görülen telitokinin *Wolbachia* bakterisinden kaynaklandığı [8, 9, 10], *T. cacoeciae*'da ise *Wolbachia* olmaksızın telitoki bulunduğu rapor edilmiştir [9, 11]. Bu çalışmada laboratuvarında yetiştirmekte olduğumuz *T. embryophagum* ve *T. cacoeciae* türlerinde telitokinin olup olmadığı, bu olayı indükleyen *Wolbachia* bakterisinin varlığı ve bu iki *Trichogramma* türüne ait popülasyonların birer doğal düşman olarak etkinliği araştırılmış ve en etkin olan popülasyonların tespit edilmesi amaçlanmıştır. Böylece daha sonra yapılması planlanan biyolojik mücadele programları için uygun popülasyonların seçiminde bir alt yapı oluşturulmuş olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.2. *Trichogramma*

Trichogramma cinsi, Trichogrammatidae familyasındaki 80 cinsten biridir ve bu familyanın bütün üyeleri böcek yumurta parazitoitidir. Günümüzde *Trichogramma* türleri doğal düşman olarak zararlı böceklere karşı yaygın olarak kullanılmaktadır. Oldukça kolay üretilmeleri ve pek çok önemli ürün zararlısına karşı kullanılabilirliği *Trichogramma* arıların önemlerini artırmıştır [12]. Biyolojik mücadelede yaygın olarak kullanılan bu parazitoit arılar, ülkemizde de bu amaç için yetiştirilmektedir. Tablo 1’de Türkiye’de tespit edilen *Trichogramma* türleri ve konukçuları verilmiştir [13].

Trichogramma, öncelikli olarak güve ve kelebek (Lepidoptera) yumurtalarını parazitler. Dişi *Trichogramma*, yumurtasını konukçu yumurtasının içine koyar ve artık konukçunun değil, parazitoitin larvası gelişir. *Trichogramma* tarafından parazitlenen yumurta korionu siyaha dönüşür. Bu, konukçu yumurtası içerisindeki parazitoitin prepupal evreye geçtiğini gösterir. Her bir dişi yaklaşık 100 yumurtayı parazitleyebilir ve aynı zamanda konukçu beslenmesiyle onları tamamen tahrip eder. Hayat döngüleri kısadır (8-10 gün) ve bunun sonunda hızlı bir şekilde arı popülasyonu artar (Şekil 1). Bu arılar insanlara, hayvanlara ve bitkilere zararlı değildir. *Trichogramma* türlerinin pro-ovijenik olduğu, erginlerin yumurtadan çıktığı ilk gün en yüksek miktarda yumurta bıraktığı ve besin olmadığı zaman ömür uzunluğunun çok kısa olduğu belirtilmiştir [14].

Sümer, *Trichogramma* türleri hakkında binden fazla bilimsel çalışma yapıldığı ve üzerinde en çok çalışılan doğal düşman olduğunu bildirmiştir. *Trichogramma* türleri oofag böceklerdir ve 200’ün üzerinde kelebek ve güve yumurtasının parazitoitidirler. Bunlar mikroskobik arılardır (0,5 mm; 1/50 inch). Konukçularını üründe bir hasara yol açmadan öldürür ve böylece ürünü korurlar [1].

Trichogramma’nın 180 türü olduğu bilinmektedir ancak biyolojik mücadele programlarında kullanılan tür sayısı beş tanedir [12]. Doğru tür teşhisi başarılı bir biyolojik mücadele programı için ilk adımdır. Teşhisleri temel olarak erkek genital

organ morfolojisine dayanmaktadır [15]. Ancak birçok önemli türün benzer genital karakterlere sahip olması araştırıcıları farklı yöntemler geliştirmeye yönlendirmiştir [16]. Aynı zamanda *Trichogramma* dişilerinin erkek bireylerde olduğu gibi güvenilir teşhis karakterlerine sahip olmaması dolayısıyla teşhis edilememesi, morfolojik karakterlere dayalı teşhisi sınırlandırmaktadır. Bu durum erkek bireylerin olmadığu, tam partenogenetik formlar için teşhiste önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır [17]. Bu sorun, Stouthamer ve ark, (1999) tarafından geliştirilen rDNA'nın ITS2 (internally transcribed spacer 2) sekansına dayalı moleküler yöntem ile çözülmüştür [18]. Bu yöntem sayesinde *Trichogramma* türlerinin güvenilir teşhisi sağlanmaktadır.



1.Parazitlenmenin 2.Parazitlenmeden **3.Parazitlenmeden** 4. Parazitlenmeden

1. günü 1-3 gün sonra **4-8 gün sonra** 8-9 gün sonra

1. Parazitoit konukçu yumurtasına kendi yumurtasını koyar.
2. Konukçu yumurtası içerisinde parazitoit larvası gelişir.
3. Konukçu yumurtasının rengi siyaha dönüşür ve parazitoit pupası gelişir.
4. Ergin parazitoit arılar konukçu yumurtasından çıkar.

şekil 2.1. *Trichogramma* türlerinin hayat döngüsü [19].

Tablo 2.1. Türkiye'de bulunan *Trichogramma* Türleri ve Konukçuları [13]

<i>Trichogramma</i> Türleri	Konukçu Zararlı	Konukçu Bitki
<i>Trichogramma evanescens</i> Westwood	<i>Ostrinia nubilalis</i> (Hübner)	Mısır, pamuk, lahana,

	<p><i>Chrysodeixis chalcites</i> (Esper)</p> <p><i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner)</p> <p><i>Cydia molesta</i> (Busck)</p> <p><i>Palpita unionalis</i> (Hübner)</p> <p><i>Cryptoblabes gnidiella</i> Mill.</p>	domates, zeytin, nar, turunçgil, it üzümü
<i>Trichogramma cacaeciae</i> Marchal	<i>Archips rosanus</i> (Linnaeus)	Kiraz
<i>Trichogramma brassicae</i> Bezdenko	<i>Ostrinia nubilalis</i> (Hübner) <i>Idaea bractilineata</i> (Zeller)	Mısır, Hint yağı bitkisi
<i>Trichogramma embryophagum</i> (Hartig)	<i>Cydia pomonella</i> L. <i>Hedya nubiferana</i> Haw. <i>Spilonota ocellana</i> F. <i>Cydia molesta</i> (Busck) <i>Thaumetopoea pityocampa</i> (Denis and Schiffermüller)	Elma, armut, şeftali, çam
<i>Trichogramma dendrolimi</i> Matsumura	<i>Thaumetopoea pityocampa</i> (Denis and Schiffermüller) <i>Archips</i> spp.	Elma, armut, erik, ayva kayısı, kiraz, alıç, çam
<i>Trichogramma turkeiensis</i> Kostadinov	<i>Euproctis chrysorrhoea</i> L.	Elma, armut, ayva

<i>Trichogramma kulinceri</i> Kostadinov (sp.n.)	<i>Cydia pomonella</i> L.	Elma, armut
<i>Trichogramma buluti</i> Kostadinov (sp.n.)	<i>Malacosoma neustria</i> L.	Elma
<i>Trichogramma turkestanica</i> M.	<i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner) <i>Ostrinia nubilalis</i> (Hübner) <i>Chrysodeixis chalcites</i> (Esper)	Mısır, pamuk, lahana, it üzümü
<i>Trichogramma pintoii</i> V.	<i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner) <i>Trichoplusia ni</i> (Hübner)	Domates, marul

2.2. *Wolbachia*

Endosimbiyotik bir bakteri olan *Wolbachia*, ilk kez Hertig (1936) tarafından *Culex pipiens* (L.) (Diptera: Culicidae)' de tanımlanmıştır ve pek çok farklı organizmada bulunduğu tespit edilmiştir. Bu endosimbiyont, alfa-Proteobacteria'nın Rickettsiaceae familyasında yer almaktadır [5]. *Wolbachia*, zorunlu hücre içi bir parazittir ve enfekte olmuş dişiden bir sonraki döle maternal olarak transfer olur. Konukçunun üreme dokularına (ovaryum ve testisler) yerleştiği bilinmektedir [20]. Böcek türlerinin yaklaşık %20'sinin *Wolbachia* ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir [6]. *Wolbachia*'nın aynı zamanda isopodlar [21], nematodlar [22], ve akarlarda da bulunduğu tespit edilmiştir [23].

Bu bakterinin varlığı konukçusunda değişik üreme tiplerinin oluşmasına yol açmaktadır. Bu modifikasyonlar; 1: böceklerde, isopodlarda ve akarlarda sitoplazmik uyumsuzluk [24, 25, 26, 23], 2: isopod erkeklerde feminizasyon [27], 3: bazı

haplodiploid Hymenoptera üyelerinde tam partenogenez (telitoki) [17], 4: erkek bireylerin ölümüne yol açmak şeklinde özetlenebilir [28].

Farklı eklembacaklı gruplarında görülen ve yukarıda bahsedilen *Wolbachia* fenotipleri; Sitoplazmik uyumsuzluk (Cytoplasmic incompatibility, CI), Partenogenez indüksiyonu (Parthenogenesis induction, PI), Feminizasyon (Feminization, F) ve Erkek öldürme (Male killing, MK) olarak gruplandırılmış ve Tablo 1’de gösterilmiştir [29] *Trichogramma* türlerinde, bu fenotiplerden PI görülmektedir. *Wolbachia*’nın neden olduğu PI, Şekil 2’de özetlenmiştir.

Wolbachia’nın *Trichogramma* türlerinde telitokinin yanısıra üretkenliği arttırdığı da rapor edilmiştir [30]. Telitoki, *Trichogramma* türlerinde *Wolbachia* simbiyosisi sonucu oluşan en yaygın üreme modifikasyonudur. *Wolbachia* ile enfekte olmuş *Trichogramma* dişileri döllenmiş ve döllenmemiş bütün yumurtalardan dişi bireyler üretirler. Hymenoptera’da, dolayısıyla *Trichogramma*’da normal üreme sisteminde, döllenmemiş yumurtalardan haploid erkek, döllenmiş yumurtalardan diploid dişi bireylerin çıktığı arhenotoki olarak adlandırılan üreme modu görülür. Telitoki ve arhenotoki üreme modlarını birbirinden ayırmak için çiftleşmemiş dişilerin ürettiği bireylere bakmak yeterlidir; telitoki dişiler sadece dişi, arhenotoki dişiler ise sadece erkek birey üretecektir [17].

Kural olarak *Trichogramma* türleri arhenotoki ile ürerler. Bununla beraber telitoki üreme modu da görülebilmektedir. Bazı türler tamamen telitoki iken bazıları hem telitoki hem arhenotoki gösteren popülasyonlar içerebilmektedir. *Wolbachia* ile enfekte olmuş *Trichogramma*, antibiyotik ya da yüksek sıcaklık uygulamasıyla arhenotoki form haline çevirilebilir [31]. *Wolbachia* ile enfekte olmuş dişi bireyler >30 °C sıcaklığa maruz bırakılacak olursa bir sonraki dölde erkek bireylere rastlanabilmektedir. Bu durum telitoki formlar içeren pek çok farklı Hymenoptera türleri için de geçerlidir. Genellikle sıcaklığa maruz bırakılma sonucu üretilen erkekler fonksiyonel değildir. Ancak pek çok türde bu erkeklerin fonksiyonel olduğu ve hem arhenotoki hem telitoki gösteren dişileri başarılı şekilde dölediği bilinmektedir [32].

Tablo 2.2. Farklı eklembacaklı gruplarında görülen *Wolbachia* fenotipleri [29]

<i>Wolbachia</i> fenotipi	Arthropod taxa (ilgili referans)
Sitoplazmik uyumsuzluk (CI)	Diptera (Hoffman, 1988) Lepidoptera (Sasaki ve Ishikawa, 1999) Homoptera (Noda ve ark, 2001) Coleoptera (Fialho ve Stevens, 1996) Hymenoptera (Perlman ve ark, 2006) Isopoda (Rousset ve ark, 1992) Acari (Vala ve ark, 2000) Heteroptera (Kamoda ve ark, 2000) Arachnida (Oh ve ark, 2000)
Partenogenez indüksiyonu (PI)	Hymenoptera (Stouthamer, 1993) Collembola (Vandekerckhove ve ark, 1999) Acari (Xie ve ark, 2007) Thysanoptera (Arakaki ve ark, 2001)
Feminizasyon (F)	Isopoda (Verne ve ark, 2007) Lepidoptera (Hiroki ve ark, 2002) Hemiptera (Negri ve ark, 2006)

Erkek öldürme (MK)	Coleoptera (Fialho ve Stevens, 2000) Diptera (Hurst ve ark, 2000) Lepidoptera (Li ve ark, 2007) Hymenoptera (Van Borm ve ark, 2001)
--------------------	--

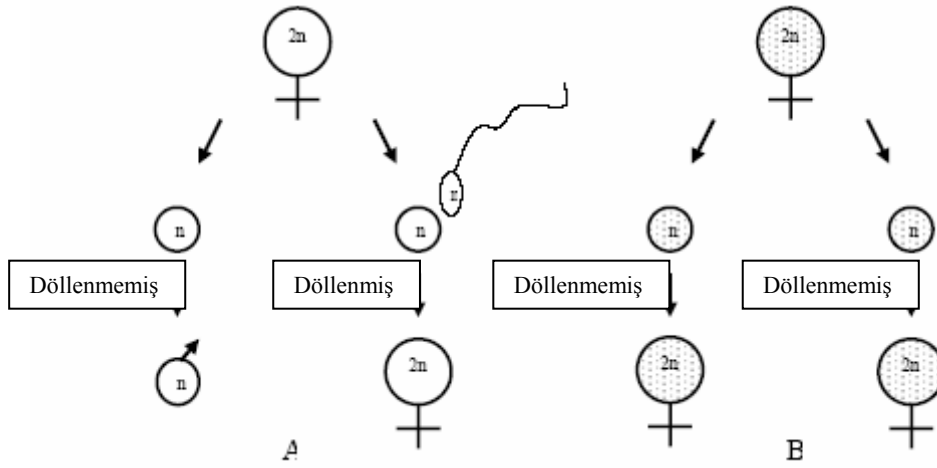
Wolbachia ile enfekte olmuş *Trichogramma* türleri, Kue olarak adlandırılan ve A supergrubuna dahil bir grup ile Dei, Sib ve Kay olarak adlandırılan ve B supergrubuna dahil olan üç grup olmak üzere toplam 4 grup halinde sınıflandırılmaktadır. 180 tanımlanmış *Trichogramma* türünden 20 tanesinin *Wolbachia* ile enfekte olduğu bilinmektedir. Bu 20 tür içinden 2 tanesi [*T. cordubensis* Vargas & Cabello (Avrupa ve Kuzey Afrika) ve *T. oleae* Voegelé & Pointel (Avrupa ve Kuzey Amerika)] *Wolbachia*'nın B supergrubu tarafından tam olarak enfekte edilmiştir. Yani bu iki türe ait bilinen tüm popülasyonlardaki tüm bireyler bakteri tarafından enfekte olmuştur ve telitoki göstermektedir [33].

Onsekiz tür ise değişik oranlarda kısmi olarak enfekte olmuştur ve *Wolbachia* varlığında benzer şekilde telitoki üreme modu gösterir. Bunlardan beşi, kısmi fakat yüksek oranda enfektelidir ve çok sayıda enfekte popülasyon içerir ve bazı popülasyonlarda bir önceki grupta olduğu gibi bütün bireyler enfekte olabilir. Bu beş türden üçü; *T. embryophagum* Hartig (Avrupa ve Asya), *T. deion* (Kuzey Amerika) ve *T. pretiosum* Riley (Amerika) B supergrubu'ndaki *Wolbachia* tarafından enfekte olmuştur. *T. bourarachae* Pintureau & Babault (Avrupa ve Kuzey Afrika) A supergrubu'ndaki *Wolbachia* tarafından, *T. kaykai* (Kuzey Amerika) ise hem A hem B supergrupları'ndaki *Wolbachia* tarafından enfekte olmuştur [34, 36].

Diğer onüç kısmi enfekte türde *Wolbachia* tarafından enfekte olmuş popülasyon sayısı oldukça azdır ve bu popülasyondaki bireylerden çok azı enfeksiyon içermektedir. Bunlardan B supergrubu içinde yer alan türler; *T. evanescens* Westwood ve *T. semblidis* (Avrupa), *T. brevicapillum* Pinto & Platner, *T. nubilale* Ertle & Davis, *T. platneri* Nagarkatti ve *T. sibericum* Sorokina (Kuzey Amerika) ve *T. chilonis* Ishii (Australasya)'dir. *Wolbachia* supergrup teşhisi bilinmeyen türler ise;

T. agrotidis Voegelé & Pintureau, *T. daumalae* Dugast & Voegelé ve *T. dendrolimi* Matsumura (Avrupa), *T. atopovirilia* Oatman & Platner ve *T. diana* Pinto (Amerika), and *T. pinto* Voegelé (Asya)'dir [34, 36, 37].

Sitogenetik mekanizmalara bağlı olarak *T. cacoeciae*'daki telitoki *T. embryophagum* ve diğer türlerde görüldüğünden farklıdır [9]. *T. cacoeciae*, tam partenogenez gösterir ve doğal popülasyonunda erkek bireyler bulunmaz ya da oldukça nadir üretilir [3]. *T. cacoeciae*'da *Wolbachia* ya da başka bir simbiyont tespit edilmemiştir ve telitokinin meydana gelme sebebi *Wolbachia*'ya bağlı değildir [38].



Şekil 2.2. A) *Wolbachia* ile enfekte olmamış parazitoitte döllenmemiş yumurtadan (arhenotoki) haploid (n) erkek bireyler, döllenmiş yumurtadan diploid (2n) dişi bireyler oluşur. **B)** *Wolbachia* ile enfekte olmuş parazitoitte (telitoki partenogenez induksiyonu, PI) döllenmemiş bütün yumurtalardan diploid dişiler gelişir. PI *Wolbachia* için bir avantajdır, çünkü bakteri sadece dişiler aracılığıyla iletilir [29].

Partenogeneze neden olan *Wolbachia* taşımanın parazitoite sağladığı bazı potansiyel avantajlar vardır; 1) erkek bireylerin üretilmemesi doğal düşmanın daha yüksek popülasyon büyüme oranına sahip olmasını sağlar, 2) dişi bireyler çiftleşme arayışı için vakit kaybetmediğinden kolonizasyon daha hızlı olur, 3) telitoki parazitoitler normal üreyenlere göre daha fazla dişi birey üretebilir [7]. Parazitoiddeki *Wolbachia* varlığını tespit etmek için 23S rDNA, 16S rDNA [26], *fstZ* gen bölgesi [39], *wsp* gen bölgesi [40] ve *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *fbpA* [41] gen bölgelerinin analizinden faydalanılmaktadır.

Trichogramma kullanılarak biyolojik mücadele geliştirilirken *Wolbachia* biyoçeşitliliğinin anlaşılması büyük öneme sahiptir. Örneğin, *Ostrinia nubilalis*'e karşı salınan *T. brassicae* normal olarak eşeyli üreme moduna sahiptir fakat *T. brassicae*'de telitokiyi uyaran *Wolbachia* transferi, sadece dişi bireyler üretmek suretiyle parazitoitin etkinliğini arttırmıştır [33]. Dolayısıyla, biyolojik mücadelenin başarısı açısından doğru *Trichogramma* türünün seçimi ile beraber bu türün üreme modu, ömür uzunluğu ve parazitleme kapasitesi gibi özellikler de büyük önem taşımaktadır.

3. YÖNTEMLER

Bu araştırma; Bozok Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.1. Gereçler

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Böcek Kültürleri

3.1.1.1. Yumurta Parazitoiti, *Trichogramma embryophagum* (Hartig) ve *Trichogramma cacoeciae* (Marchal)'nın Sistematığı

Bu çalışmada kullanılan yumurta parazitoitleri; *T. embryophagum* ve *T. cacoeciae* kültürleri Adana Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü'nden konukçu yumurtası içindeki pupalar halinde laboratuvara getirilmiştir.

Sistematikteki yeri:

Şube	: Arthropoda
Altşube	: Antennata
Sınıf	: Insecta
Altsınıf	: Pterygota
Takım	: Hymenoptera
Alttakım	: Apocrita
Üst familya	: Chalcidoideae
Familya	: Trichogrammatidae
Cins	: <i>Trichogramma</i>
Tür	: <i>Trichogramma embryophagum</i> Hartig

Sistematikteki yeri:

Şube	: Arthropoda
Altşube	: Antennata
Sınıf	: Insecta
Altsınıf	: Pterygota
Takım	: Hymenoptera
Alttakım	: Apocrita
Üst familya	: Chalcidoideae
Familya	: Trichogrammatidae
Cins	: <i>Trichogramma</i>
Tür	: <i>Trichogramma cacoeciae</i> Marchal

3.1.1.2. Un Güvesi, *Ephestia kuehniella* (Zeller)'nin Sistematığı

Bu çalışmada kullanılan un güvesi *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) Adana Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü'nden getirilmiştir.

Sistematikteki yeri:

Şube	: Arthropoda
Altşube	: Antennata
Sınıf	: Insecta
Altsınıf	: Pterygota
Takım	: Lepidoptera
Alttakım	: Frenata (Heteroneura)
Familya	: Pyralidae
Cins	: <i>Ephestia</i>
Tür	: <i>Ephestia kuehniella</i> Zeller

3.2. Yöntemler

3.2.1. *Trichogramma* Türlerinin Laboratuvar Koşullarında Üretimi

Trichogramma türlerinin laboratuvar koşullarında üretimi için konukçu olarak *E. kuehniella* yumurtaları kullanıldı. Elde edilen bir günlük *E. kuehniella* yumurtaları A₄ kâğıdı üzerine %10'luk arap zımkı ile yapıştırıldı. Zımk sürülürken yumurtaların gömülmemesi için oldukça ince bir hat şeklinde sürülmesine dikkat edildi. Kartlar üzerine besin olarak bir damla bal sürüldü. Bu kartlar içerisinde *Trichogramma* erginleri bulunan deney tüpleri içine aktarıldı. Bu petripler 25±1 °C ve % 70±5 neme ayarlı uzun gün aydınlatmalı (16L:8D) iklimlendirme kabineye konularak takibe alındı [14]. Bu takip süresi içerisinde parazitlenen yumurtaların 4-5 gün içerisinde siyahlaştığı, parazitlenmemiş yumurtalardan ise larvaların çıktığı gözlemlendi. Çıkan larvaların parazitlenmiş yumurtalara zarar vermesini engellemek için bu larvalar ince uçlu fırça ile mikroskop altında temizlendi. Siyahlaşmanın olması konukçu yumurtası içerisinde parazitoitin geliştiğini göstermektedir.

Kültür hazırlandıktan yaklaşık 9-10 gün sonra parazitlenmiş olan yumurtalardan ergin *Trichogramma* çıkışı başladı. Bu erginler kültürlerin devam ettirilmesi ve denemelerin yapılması için kullanıldı.

3.2.2. *Ephestia kuehniella* (Zeller)'nin Laboratuvar Koşullarında Üretimi

Ephestia kuehniella'nin üretiminde besin ortamı olarak 2:1 oranında steril un ve kepek karışımı kullanıldı. Besin ortamının konduğu plastik kapların kapakları delinerek ince bir bezle kapatıldı. Besin ortamına *E. kuehniella* yumurtaları serpildi. Yumurtadan çıkan larvaların olgunlaştıktan sonra pupa olabilmesi için besin ortamının üzerine oluklu kartonlar yerleştirildi. Bu kaplar 27 ±5°C ve % 70 ±5 neme ayarlı uzun gün aydınlatmalı (16L:8D) iklimlendirme kabineye koyuldu.

Kültür hazırlandıktan yaklaşık 40-50 gün sonra çıkan *E. kuehniella* erginleri vakum pompası yardımıyla alınarak yumurtlatma kaplarına aktarıldı. Yumurtlatma kapları 27±5 °C ve % 70±5 neme ayarlı uzun gün aydınlatmalı iklimlendirme kabineye koyuldu. Yumurtlatma kaplarına alınan erginler her gün kontrol edilerek yumurtaları

toplandı ve bu yumurtalar; yeni konukçu kültürlerinin oluşturulması, parazitoit kültürünün devam ettirilmesi ve parazitlenme kapasitesi denemeleri için kullanıldı [1].

3.2.3. Moleküler Çalışmalar

3.2.3.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için Chelex DNA-ekstraksiyon metodu kullanıldı. Arılar ekstraksiyondan önce 30 dk -20°C'de tutulduktan sonra ezme işlemine geçildi. 14.000 rpm'de 2 dk. Santrifüj edilerek arıların tüpün dibine çökmesi sağlandı. Ezme işlemi steril cam çubuk yardımıyla yapıldı ve her bir tüpe 2 µl Proteinase K eklenerek ezme işlemine devam edildi. Son olarak her tüpe 60 µl Chelex çözeltisinden eklenerek karıştırıldı. 55°C'de bir saat, 99°C'de 10 dk tutulduktan sonra 14.000 rpm'de 4 dk santrifüj edilerek Chelex'in çökmesi sağlandı ve supernatant kısmı dikkatlice alınarak yeni, temiz bir ependorf tüpe aktarıldı. Elde edilen süpernatant sonraki işlemler için kalıp DNA olarak kullanıldı ve kullanılacağı zamana kadar -20°C'de etiketlenerek saklandı.

3.2.3.2. ITS2 PCR ve Örneklerin Tür Teşhisi

Kültürlerin ITS2 bölgesini çoğaltıp karşılaştırmak ve türlerini belirlemek için ITS2 forward (5'TGTGAACTGCAGGACACATG3') ve reverse (5'GTCTTGCCTGCTCTGAG3') primerleri kullanılarak Polimeraze Chain Reaction kuruldu.

ITS2-PCR reaksiyon karışımı:

Genomik DNA: 2 µl

ITS2 forward primer: 0.5 µl

ITS2 reverse primer: 0.5 µl

10X PCR tamponu: 2.5 µl

1 mM dNTPs: 5.0 µl

ddH₂O: 14.3 µl

Taq DNA Pol: 0.2 µl

Reaksiyon hacmi: 25 µl

ITS2-PCR döngüsü:

İşlem	Sıcaklık	Süre	
Ön denatürasyon	95°C	3 dk	
Denatürasyon	92°C	45 sn	} 33 döngü
Bağlanma	53°C	45 sn	
Uzama	72°C	45 sn	
Son uzama	72°C	3 dk	

PCR ürünleri California Riverside Üniversitesi'ne (Institute for Integrative Genome Biology UCR) dizi analizi için gönderildi. Dizi sonuçları Bioedit programı ile düzenlendi [42] ve National Center for Biothechnology Information (NCBI) sitesinde mevcut türlere ait diziler arasında değerlendirilerek belirlendi.

3.2.3.3. Kültürlerde *Wolbachia* Enfeksiyonunun Tespiti

Kültürlerdeki *Wolbachia* enfeksiyonunu belirlemek için wsp forward (5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAA-3') ve reverse (5'-AAAAATTAACGCTACTCCA-3') primerleri ile PCR yapıldı.

wsp reaksiyon karışımı

Genomik DNA:	1.0 µl
wsp forward primer:	0.5 µl
wsp reverse primer:	0.5 µl
10X PCR tamponu:	2.5 µl
1 mM dNTPs:	1.0 µl
ddH ₂ O:	18.45 µl
25 mM MgCl ₂ :	0.75 µl
Taq DNA Pol:	0.3 µl
Reaksiyon hacmi:	25 µl

PCR ürünleri California Riverside Üniversitesi'ne (Institute for Integrative Genome Biology UCR) gönderildi. Dizi sonuçları Bioedit programı ile düzenlendi [42] ve National Center for Biothecnology Information (NCBI) sitesinde mevcut diziler arasında değerlendirilerek belirlendi.

wsp-PCR döngüsü

İşlem	Sıcaklık	Süre	
Ön denatürasyon	94°C	30 sn.	
Denatürasyon	94°C	30 sn.	} 36 döngü
Bağlanma	50°C	45 sn.	
Uzama	72°C	1.0 dk.	
Son uzama	72 °C	5.0 dk.	

3.2.3.4. Ömür Uzunluğu Ve Parazitleme Kapasitesi Denemeleri

Laboratuvarda yetiştirilmekte olan *T. embryophagum* ve *T. cacoeciae* kültürlerinin ömür uzunluğunu belirlemek için türlere ait bireyler en az onar tekrarlı olarak ayrı ayrı deney tüplerine alındı, besin olarak tüplere bal eklendi ve her gün besini

tazelenmek suretiyle ergin bireylerin yaşayıp yaşamadığı kontrol edilip kaydedildi. Parazitleme kapasitesi denemeleri için iki türe ait dişi bireyler tek tek tüplere alındı, her bir dişiye ölene kadar her gün 50 ± 5 adet taze (0-24 saatlik) *E. kuehniella* yumurtası verildi ve böylece ömür boyu parazitledikleri yumurta sayısı tespit edildi. Dişi parazitoid tarafından yumurtalar parazitlendikten sonra siyahlaşan yumurtalar (parazitoid tarafından parazitlenen yumurta sayısı) ve aynı zamanda bu yumurtalardan çıkan dişi ve erkek birey sayıları kaydedildi. Her iki türe ait mevcut kültürlerden sadece dişi bireyler elde edildiği için ömür uzunluğu denemeleri sadece dişi bireylerle yapıldı. Aynı zamanda her türe ait çiftleşmemiş dişiler partenogenetik üreme şeklinin (telitoki ya da arhenotoki) belirlenmesi için de kullanıldı. Bunun için her türe ait çiftleşmemiş dişiler yine tek tek ayrılarak tüplere alındı ve 50 ± 5 adet taze (0-24 saatlik) *E. kuehniella* yumurtası verildi. Bu yumurtalardan çıkan bireylerin cinsiyetine göre partenogenetik üreme modu tespit edildi. Bütün denemeler onar tekerrürlü olarak hazırlandı ve $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ve $\% 70 \pm 5$ neme ayarlı, uzun gün aydınlatmalı (16L:8D) iklimlendirme kabiniinde takip edildi. *Wolbachia* varlığı belirlenen *T. embryophagum*'a ait bireyler $>30^\circ\text{C}$ sıcaklığa maruz bırakıldı ve sonraki döllerde erkek birey üretimi takip edildi. Sıcaklığa maruz bırakılan bireyler ile normal bireyler ömür uzunluğu ve parazitleme kapasiteleri açısından karşılaştırıldı.

3.2.3.5. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 10 bilgisayar yazılım programı, Mann-Whitney U Testi ve T-Testi kullanıldı . ITS2 PCR ve *Wolbachia* enfeksiyonunununa ait dizi analiz sonuçları Bioedit programı ile düzenlendi ve National Center for Biothecnology Information (NCBI) sitesinde mevcut diziler arasında değerlendirilerek belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. *Trichogramma* Kültürlerinin Teşhis Sonuçları

Adana Ziraî Mücadele Araştırma Enstitüsü'nden parazitlenmiş yumurta paketleri halinde getirilen iki *Trichogramma* kültüründen çıkan bireyler ITS2-PCR işlemi sonucunda sekans analizi için California Riverside Üniversitesi'ne (Institute for Integrative Genome Biology UCR) gönderildi.

Dizi sonuçları NCBI sitesinde mevcut türlere ait diziler arasında değerlendirildiğinde kültürlerin *T. embryophagum* ve *T. cacocciae* türlerini içerdiği belirlendi. *T. embryophagum*, GenBank'da AY244465 kodlu tür ile, *T. cacocciae* ise EU547671 kodlu tür ile örtüştü. İki türe ait ITS2 sekansları Tablo 1 ve Tablo 2'de gösterilmiştir. İki türün ITS2 sekanslarının uzunluk olarak farklı olduğu belirlendi; *T. embryophagum*'un ITS2 sekans uzunluğu 471 bp, *T. cacocciae*'nin 477 bp olarak tespit edildi.

Tablo 4.3. *Trichogramma embryophagum*'a ait ITS2 sekans sonucu. (Koyu renkle işaretli kısımlar iki sekans arasında farklı olan nükleotidleri göstermektedir. (-) işareti insersiyon ya da delesyonlara karşılık gelmektedir.)

T. embryophagum

GTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAGCGTTGATCTGGGCGCTCGT 60

AY244465

GTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAGCGTTGATCTGGGCGCTCGT 60

T. embryophagum

GTCTCTATCTCCTTACTCTTCTTCGAAGTGTATAGCAGTGCGAGCACGTCGCCTTAAACG 120

AY244465

GTCTCTATCTCCTTACTCTTCTTCGAAGTGTATAGCAGTGCGAGCACGTCGCCTTAAACG 120

T. embryophagum

AAACGCAAGAAAAGAGATGAATTCGTTTCGCTAGCTGGCGAGCGCGCTTACCGCTTGGAG 180

AY244465

AAACGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTTCGTCTAGCTGGCGAGCGCGCTTACCGCTTGGAG 180

T. embryophagum

AGTTCTCGTGGTTCGTCTGCGCGAGAGAGACACTTGGCACTCTGTGTTTCGTGTCTCTCGAG 240

AY244465

AGTTCTCGTGGTTCGTCTGCGCGAGAGAGACACTTAGCACTCTGTGTTTCGTGTCTCTCGAG 240

T. embryophagum

CTTGGCGGCGGC--GAGTACTTCCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTCTCGACT 297

AY244465

CTTGGCGGCGGCGGCGAGTACTTCCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTCTCGACT 300

T. embryophagum

CGTCGAGCAGCGGACCGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGATTCCGGTAACTGA 357

AY244465

CGTCGAGCAGCGGACCGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGATTCCGGTAACTGA 360

T. embryophagum

ATGCGCGCGCGCTTTTACACGCACACACACGCACGCACACTCGTTGTGTGTGCTGTGCTG 417

AY244465

ATGCGCGCGCGCTTTTACACGCACACACACGCACGCACACTCGTTGTGTGTGCTGTGCTG 420

T. embryophagum

CTGCGTGTATAATTGCTAGCTCGGATCATTTCGTGAATGAGTCTTTTTTCTCGAT 471

AY244465

CTGCGTGTATAATTGCTAGCTCGGATCATTTCGTGAATGAGTCTTTTTTCTCGAT 474

Tablo 4.4. *Trichogramma cacoeciae*'ya ait ITS2 sekans sonucu. ((-) işareti insersiyon ya da delesyonlara karşılık gelmektedir.)

T. cacoeciae

GTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAGCGTTGATCTGGGCGCTCGT 60

EU547671

GTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAGCGTTGATCTGGGCGCTCGT 60

T. cacoeciae

GTCTCTATCTCCTTACTCTTCTCGAAGTGTATAGCAGTGCGAGCACGTGCGCCTTAAACG 120

EU547671

GTCTCTATCTCCTTACTCTTCTCGAAGTGTATAGCAGTGCGAGCACGTGCGCCTTAAACG 120

T. cacoeciae

AAACGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTTCGTCTAGCTGGCGAGCGCGCTTACCGCTTGGAG 180

EU547671

AAACGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTTCGTCTAGCTGGCGAGCGCGCTTACCGCTTGGAG 180

T. cacoeciae

AGTTCTCGTGGTTCGTCTGCGCGAGAGAGACACTTAGCACTCTGTGTTTCGTGTCTCTCGAG 240

EU547671

AGTTCTCGTGGTTCGTCTGCGCGAGAGAGACACTTAGCACTCTGTGTTTCGTGTCTCTCGAG 240

T. cacoeciae

CTTGGCGGCGGCGGCGAGTACTTCCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTCTCGACT 300

EU547671

CTTGGCGGCGGCGGCGAGTACTTCCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTCTCGACT 300

T. cacoeciae

CGTCGAGCAGCGGACCGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGATTCCGGTAACTGA 360

EU547671

CGTCGAGCAGCGGACCGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGATTCCGGTAACTGA 360

T. cacoeciae

ATGCGCGCGCGCTTTTACACGCACACACACGCACGCACACTCGT--TGTGTGTGCTGTGC 418

EU547671

ATGCGCGCGCGCTTTTACACGCACACACACGCACGCACACTCGTTTGTGTGTGCTGTGC 420

T. cacoeciae

TGCTGCTGCGTGTATAATGGCTAGCTCGGATCATTTCGTGAATGAGTCTTTTTTCTCGAT 477

EU547671

TGCTGCTGCGTGTATAATGGCTAGCTCGGATCATTTCGTGAATGAGTCTTTTTTCTCGAT 479

4.2. Kültürlerde *Wolbachia* Enfeksiyonu Tespiti

Yapılan wsp-PCR sonuçları California Riverside Üniversitesi'ne (Institute for Integrative Genome Biology UCR) gönderildi. Dizi sonuçları NCBI sitesinde mevcut diziler arasında değerlendirildiğinde *T. embryophagum*'un GenBank'da AF245165 kodlu *Wolbachia* ile enfekte olduğu belirlendi.

Tablo 4.5. *Trichogramma embryophagum*'a ait wsp-PCR sekans sonucu. (Koyu renkle işaretli kısımlar iki sekans arasında farklı olan nükleotidleri göstermektedir.)

T. embryophagum wsp

ACTAGCTACTACGTTTCGTTTACAATACAACGGTGAAATTTTACCTTTTTATACAAAAGTT 60

AF245165

ACTAGCTACTACGTTTCGTTTACAATACAACGGTGAAATTTTACCTTTTTATACAAAAGTT 60

T. embryophagum wsp

GATGGTATTAATAAATAACAAGTAAAGGGGAGGATAGTCCTTTAAAAAGATCTTTTATA 120

AF245165

GATGGTATTAATAAATGTAACAAGTAAAGGGGAGGATAGTCCTTTAAAAAGATCTTTTATA 120

T. embryophagum wsp

GCTGGTGGTGTTCATTTGGTTATAAATGGATGACATCAGAGTTGATGTTGAAGGGCTT 180

AF245165

GCTGGTGGTGGTTCATTTGGTTATAAAAATGGATGACATCAGAGTTGATGTTGAAGGGCTT 180

***T. embryophagum* wsp**

TACTCACGATTGGCTAATAATATAGCTGTAATAGATGCTTCTGAAGCAAATGTTGCAGAC 240

AF245165

TACTCACGATTGGCTAAAAATAAAGCTGTAATAGATGCTTCTGAAGCAAATGTTGCAGAC 240

***T. embryophagum* wsp**

AGTTTAAACAGCATTTTCAGGATTGGTTAACGTTTATTATGATATAGTGATTGAAGATATG 300

AF245165

AGTTTAAACAGCATTTTCAGGATTGGTTAACGTTTATTATGATATAGTGATTGAAGATATG 300

***T. embryophagum* wsp**

CCTATCACTCCATACGTTGGTGGTGGTGGTGCAGCATATATCAGCAATCCTTCAAAC 360

AF245165

CCTATCACTCCATACGTTGGTGGTGGTGGTGCAGCATATATCAGCAATCCTTCAAAC 360

***T. embryophagum* wsp**

GCTGCTGACGTTAAAGATCAAAGGAGGTTTGGTTTTGCTTATCAAGCAAAAAGCTGGTGT 420

AF245165

GCTGCTGACGTTAAAGATCAAAGGAGGTTTGGTTTTGCTTATCAAGCAAAAAGCTGGTGT 420

***T. embryophagum* wsp**

AGTTATGATGTAGCCCCAGAAATCAAACCTTTTGCTGGAGCTCGTTACTTCGGTTCTTAT 480

AF245165

AGTTATGATGTAGCCCCAGAAATCAAACCTTTTGCTGGAGCTCGTTACTTCGGTTCTTAT 480

***T. embryophagum* wsp**

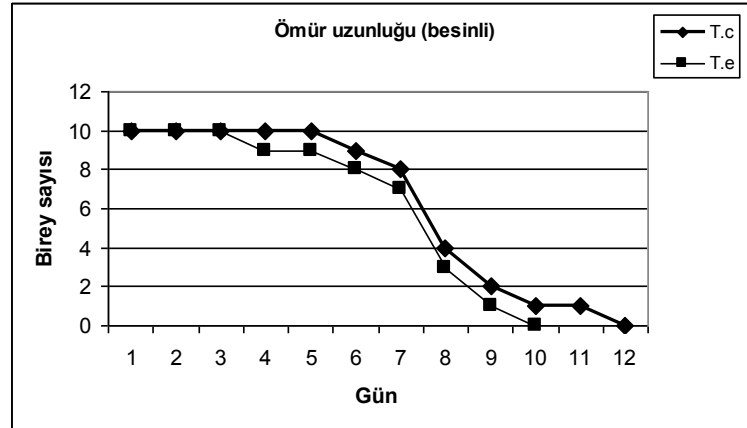
GGTGCTAGTTTTGATAAGGCAGCTAAGGGTGATGATGGTATCAAAAATGTTCTT 534

AF245165

GGTGCTAGTTTTGATAAGGCAGCTAAGGGTGATGATGGTATCAAAAATGTTCTT 534

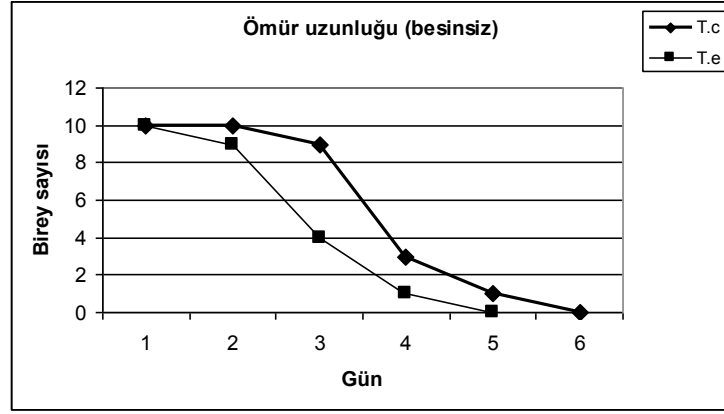
4.3. *T. embryophagum* ve *T. cacaoeciae*'nin Ömür Uzunluğu Ve Parazitleme Kapasitesi Denemeleri

Besinin iki türün ömür uzunluğuna etkisini belirlemek için yapılan deneme sonuçları Şekil 4.3.'de gösterilmiştir. Sekizinci günde *T. embryophagum*'a ait bireylerin %70'si ölüirken, aynı süre içinde *T. cacaoeciae*'a ait bireylerin ancak %60'ı ölmüştür. *T. embryophagum*'a ait dişi bireylerin besin varlığındaki ömür uzunluğu 6.70 ± 3.89 'u yaşarken *T. cacaoeciae*'a ait dişi bireylerin 7.40 ± 3.6 'ü yaşamıştır. *T. cacaoeciae*'a ait bireyler daha uzun süre yaşamasına karşın bu fark istatistiksel olarak önemli değildir ($P > 0,05$).

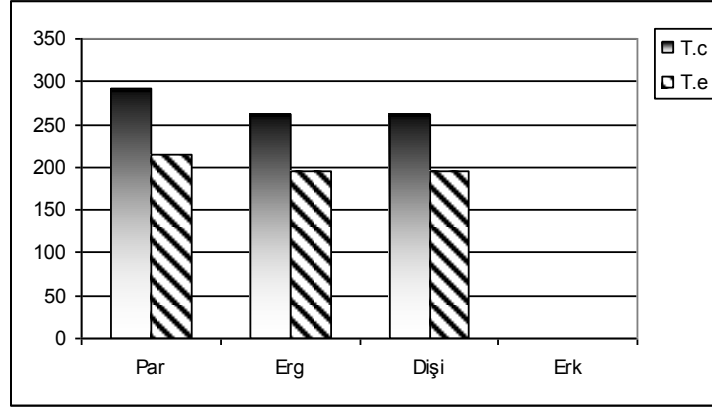


Şekil 4.3. *T. embryophagum* (T.e) ve *T. cacaoeciae* (T.c) dişi bireylerinin besin (Bal) varlığında ömür uzunluğu

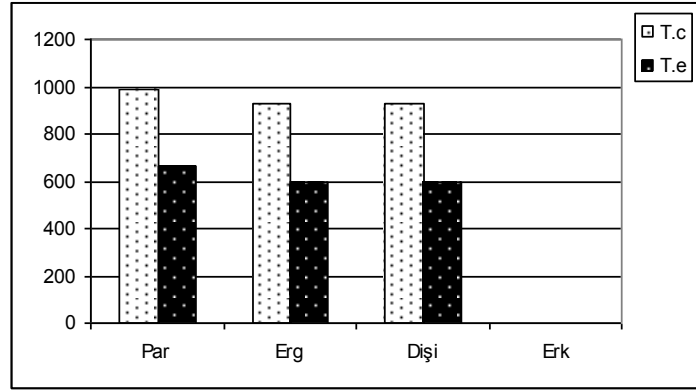
İki türün besinsiz ömür uzunluklarının karşılaştırıldığı deneme sonuçları Şekil 4.4.'de gösterilmiştir. Üçüncü günde *T. embryophagum*'a ait bireylerin %40'ı yaşarken, aynı süre içinde *T. cacaoeciae*'a ait bireylerin %90'ı yaşamaktadır. *T. embryophagum*'a ait dişi bireylerin besin yokluğundak 4.80 ± 4.55 'i yaşarken *T. cacaoeciae*'a ait dişi bireylerin 6.60 ± 4.28 'i yaşamıştır. *T. cacaoeciae*'a ait bireyler daha uzun süre yaşamasına karşın bu fark istatistiksel olarak önemli değildir ($P > 0,05$).



Şekil 4.4. *T. embryophagum* (T.e) ve *T. cacoeiae* (T.c) dişi bireylerinin besinsiz (Bal) ömür uzunluğu



Şekil 4.5. *T. embryophagum* (T.e) ve *T. cacoeiae* (T.c) dişi bireylerinin günlük parazitleme oranı, ergin, dişi ve erkek birey çıkışları

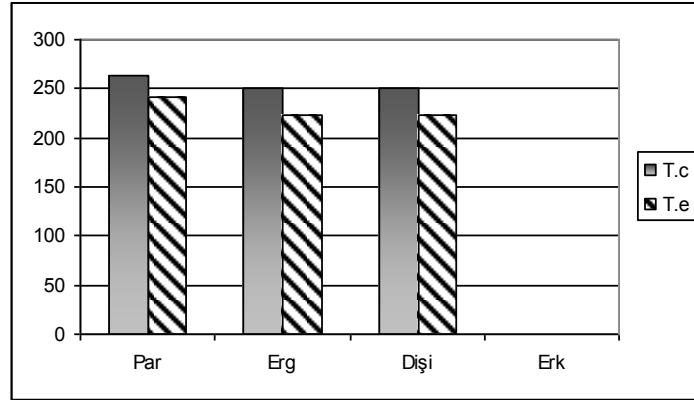


Şekil 4.6. *T. embryophagum* (T.e) ve *T. cacoeciae* (T.c) dişi bireylerinin ömür boyu parazitlenme oranı, ergin, dişi ve erkek birey çıkışları

Parazitlenme ve ömür boyu parazitlenme denemelerinde, toplam parazitlenme sayısı, ergin çıkışı ve dişi çıkışı açısından iki tür arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0,05$). Her iki denemede de her iki türde hiç erkek birey çıkışı olmamıştır.

4.4. *T. embryophagum* ve *T. cacoeciae*'da Partenogenez Türünün Belirlenmesi

T. embryophagum ve *T. cacoeciae*'da görülen partenogenez türünü belirlemek için çiftleşmemiş dişi bireyler kullanıldı. Deneme sonucunda her iki türde de çiftleşmemiş dişilerin sadece dişi döl verdiği dolayısıyla partenogenezin telitoki türünü gösterdiği belirlendi. *T. cacoeciae*'da görülen telitoki parazitoitin normal üreme modundan kaynaklanırken, *T. embryophagum*'da *Wolbachia* bakterisi enfeksiyonu tespit edildiği için telitokinin bakteri tarafından indüklendiği sonucuna varıldı.

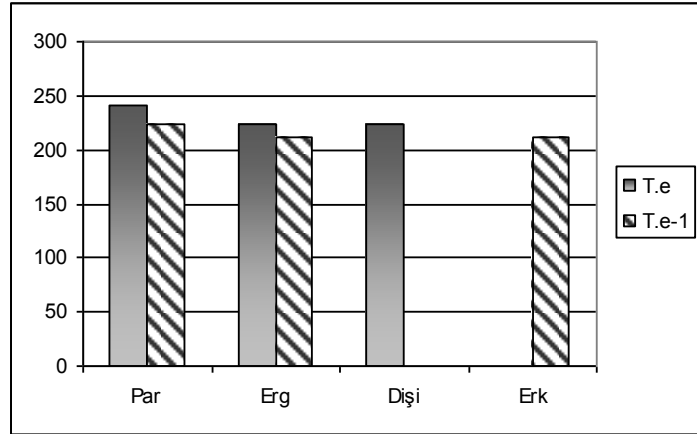


Şekil 4.7. *T. embryophagum* (T.e) ve *T. cacaoeciae* (T.c) çiftleşmemiş dişi bireylerinin parazitlenme sayısı, ergin, dişi ve erkek birey çıkışları

4.5. *T. embryophagum* Dişilerinde Sıcaklık Uygulaması

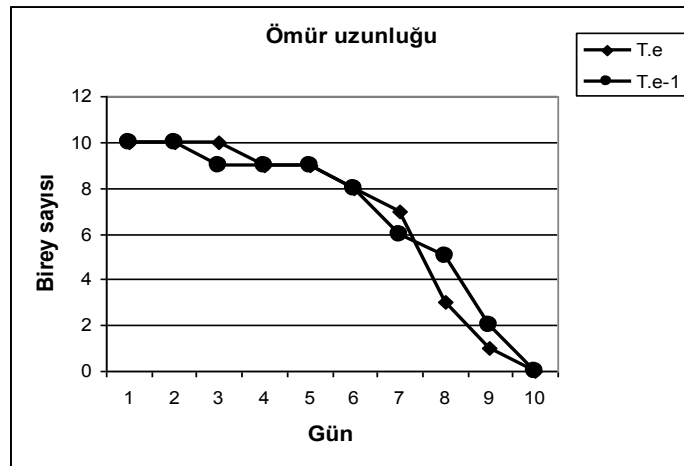
T. embryophagum, larval gelişimi sırasında (konukçu yumurtası içerisinde 1-3 gün arası) >30 °C sıcaklığa maruz bırakıldı. Konukçudan çıkış yapan çiftleşmemiş dişilere 50 ± 5 adet taze (0-24 saatlik) *E. kuehniella* yumurtası verildi ve çıkan döl takip edildi (denemeler onar tekrarlı kurulmuştur). Uygulamadan sonraki ilk dölde (F_2) %100 erkek döl olduğu tespit edildi. Bu durum *Wolbachia* enfeksiyonunun sıcaklık uygulamasıyla birlikte ortadan kalktığı sonucunu ortaya çıkarmaktadır. 25 ± 1 °C ve % 70 ± 5 neme ayarlı uzun gün aydınlatmalı (16L:8D) iklimlendirme kabinde yetiştirilen *T. embryophagum* dişi bireyleri ile larval gelişimi sırasında >30 °C sıcaklığa maruz bırakılan dişiler ömür uzunluğu ve parazitlemeleri açısından karşılaştırıldı.

Parazitlenme denemesinde, toplam parazitlenme sayısı ve ergin çıkışı açısından iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P > 0,05$). 25 ± 1 °C'de yetiştirilen *T. embryophagum* dişiler sadece dişi döl, >30 °C sıcaklığa maruz bırakılan dişiler ise sadece erkek döl verdiği için iki özellik açısından iki grup arasındaki fark önemlidir ($P < 0,05$).



Şekil 4.8. 25±1 °C (T.e) ve >30 °C (T.e-1) sıcaklıklarda yetiştirilen *T. embryophagum* dişi bireylerinin parazitlenme sayısı, ergin, dişi ve erkek birey çıkışları

25±1 °C ve >30 °C sıcaklıklarda yetiştirilen *T. embryophagum*'a ait bireylerin ömür uzunluklarının karşılaştırıldığı deneme sonuçları Şekil 4.9.'da gösterilmiştir. 8. günde 25±1 °C'de yetiştirilen *T. embryophagum*'a ait bireylerin %30'u yaşarken, aynı süre içinde >30 °C'de yetiştirilen *T. embryophagum*'a ait bireylerin %50'si yaşamaktadır. 25±1 °C'de yetiştirilen *T. embryophagum*'a ait bireylerin 6.70±3.89,'u yaşarken >30 °C'de yetiştirilen *T. embryophagum*'a ait bireylerise 6.80±3.49'u yaşamıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak önemli değildir ($P>0,05$).



Şekil 4.9. 25±1 °C ve >30 °C sıcaklıklarda yetiştirilen *T. embryophagum* (T.e ve T.e-1) dişi bireylerinin ömür uzunluğu

5. TARTIŞMA – SONUÇ VE ÖNERİLER

Trichogramma türleri değişik ürünlerde zararlı olan güve ve kelebek yumurtaları başta olmak üzere pek çok böceğe karşı etkin olan en önemli biyolojik mücadele ajanlarından biridir. Trichogrammatidae familyasının 80 cinsinden biri olan *Trichogramma*, yaklaşık olarak 180 türe sahiptir [16]. Bu önemli doğal düşmanın teşhisi çok benzer morfolojik karakterlere sahip olmaları ve küçük boyutlarından (0,5 mm) dolayı oldukça zordur. Biyolojik mücadele çalışmalarında *Trichogramma* teşhisinin doğru yapılması ve dolayısıyla en uygun türün seçilerek araziye salınması çalışmanın başarısı açısından en önemli basamaktır.

Teşhiste erkek genital organının kullanılması *Trichogramma* sistematığının aydınlatılması açısından oldukça önemli bir adım olmuştur [15]. Bu yöntemin en önemli dezavantajı, dişi *Trichogramma*'nın aynı yolla teşhis edilememesidir [18]. Bu durum telitoki üreme moduna sahip olan, dolayısıyla sadece dişi bireylerden meydana gelen *Trichogramma* popülasyonları için teşhisi olanaksız hale getirir.

rDNA'nın ITS2 sekans analizine dayalı moleküler yöntemin geliştirilmesiyle *Trichogramma* sistematığında güvenilir ve cinsiyet ayırt etmeksizin bütün bireylerin teşhis edilebildiği bir yöntem keşfedilmiştir [18]. Bu yöntem kullanılarak yeni bir *Trichogramma* türü olan *T. itsybitsi* bulunmuştur [44]. Sümer ve ark. (2009) tarafından *Trichogramma* teşhisinde kullanılmak üzere ITS2 sekans analizine dayalı bir moleküler anahtar geliştirilmiştir [45].

ITS2 bölgesi, *Trichogramma* türlerinde tür içi oldukça benzerken türler arası farklılık göstermektedir ve bu farklılık tür teşhisinde belirleyicidir. Bu gen bölgesi kullanılarak pek çok *Trichogramma* teşhisi gerçekleştirilmiştir [46-50]. rDNA-ITS2 bölgesine göre İran'da 11 tane *Trichogramma* türü tespit edilmiştir ve bunlardan dördü İran için yeni kayıttır (*T. ingricum*, *T. tshumakovae*, *T. principium* ve *T. dendrolimi*). *T. embryophagum*'da telitokiye neden olan *Wolbachia* varlığı PCR ile gösterilmiştir [51].

Çalışmamızda ilk olarak, kullanacağımız *Trichogramma* kültürlerinin hangi türe ait olduğunu ITS2 sekans analizine bağlı olarak tespit ettik. Dizi sonuçları NCBI

sitesinde mevcut türlere ait diziler arasında değerlendirildiğinde kültürlerin *T. embryophagum* ve *T. cacocciae* türlerini içerdiğini belirlendi. *T. embryophagum* GenBank'da AY244465 kodlu tür ile, *T. cacocciae* ise EU547671 kodlu tür ile örtüşmüştür. ITS2 sekanslarının uzunluk olarak farklı olduğu belirlendi; *T. embryophagum*'un sekans uzunluğu 471 bp, *T. cacocciae*'nin 477 bp olarak tespit edildi.

ve *T. cacocciae* türleri, *Trichogramma*'nın pretiosum grubu içerisinde yer alan yakın ilişkili türler olarak tanımlanmaktadır [52]. Bu iki tür üreme modları açısından birbirlerinden farklıdır. *T. cacocciae* telitoki ile ürerken, *T. embryophagum*'un bazı bireylerinde telitoki görülür ama çoğu biseksüel üreme moduna sahiptir. *T. embryophagum*'da telitoki *Wolbachia* enfeksiyonundan kaynaklanırken, *T. cacocciae*'da görülen telitoki mikrop bağımlı değildir [53].

Çalışmamızda wsp (*Wolbachia* outer surface protein precursor) gen bölgesine bağlı olarak *T. embryophagum*'da *Wolbachia* enfeksiyonunun varlığını belirlendi. *T. embryophagum*'un B supergrubu'nun ve Sib grubundaki *Wolbachia* tarafından enfekte olduğu daha önce belirlenmiştir [34]. Bizim çalışmamızda kullandığımız *T. embryophagum*'un da aynı gruba dahil olan *Wolbachia* tarafından enfekte olduğunu tespit edildi. NCBI sitesinde mevcut diziler arasında değerlendirildiğinde *T. embryophagum*'un GenBank'da AF245165 kodlu *Wolbachia* ile enfekte olduğunu belirlendi. Almeida ve Stouthamer (2003) aynı yöntemle *T. cacocciae*'da *Wolbachia* enfeksiyonunun olmadığını ortaya koymuşlardır [11]. Bu çalışmada *T. cacocciae* kültürleri aynı yöntem kullanılmış *Wolbachia* enfeksiyonunun olmadığı görülmüştür. *T. cacocciae* gördüğümüz telitokinin ise *Wolbachia* bağımsız olduğu sonucuna varıldı. Bu durum literatürle uygunluk göstermektedir [53].

Çalışmamızda *T. embryophagum* ve *T. cacocciae*, ömür uzunluğu, ömür boyu parazitlenme oranı ve günlük parazitlenme oranı özelliklerine göre karşılaştırılmıştır. Parazitlenme denemesinde, toplam parazitlenme sayısı, ergin çıkışı ve dişi çıkışı açısından iki tür arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0,05$). Ömür boyu parazitlenme denemesinde de aynı şekilde toplam parazitlenme sayısı, ergin çıkışı ve dişi çıkışı açısından iki tür arasındaki fark istatistiksel olarak önemli

bulunmuştur ($P<0,05$). Her iki türde de denemelerde hiç erkek birey çıkışı olmamıştır.

Trichogramma türlerinin ömür uzunluklarıyla ilgili yapılan çalışmalarda, konukçu temin edilip, besin verilmeyen *T. carverae* erginlerinin 7 gün içinde öldüğü, hem konukçu hem besin (bal) verildiğinde ise erginlerin 11 güne kadar yaşadıkları belirtilmiştir [54]. *T. evanescens*'in farklı popülasyonlarının ömür uzunluğu açısından karşılaştırıldığı çalışmada erginlerin besin (bal) varlığında 10 güne kadar yaşadığı, besin olmadığında ise en fazla 6 gün yaşadığı belirlenmiştir [1]. Çalışmamızda besin varlığında ve yokluğunda *T. cacoeciae*, dişilerinin *yophagum*'a göre daha uzun yaşadığını, ancak bu farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını tespit edildi. *T. cacoeciae* dişileri besin varlığında 12 güne kadar yaşarken besin yokluğunda ancak 6 gün yaşamıştır.

Aynı zamanda partenogenetik üreme modunun belirlenmesi için yapılan deneme sonucunda her iki türün de telitoki üreme moduna sahip olduğu belirlenmiştir. *Trichogramma* türlerinde telitoki üreme modunun iki farklı nedeni belirlenmiştir; hibridizasyon ve mikrobiyal enfeksiyon. Birincisi, bazı *Trichogramma* türlerinde kalıcı telitokiye neden olur [16]. Bu durum tedavi edilemeyen telitoki formu olarak tanımlanmıştır [9]. İkinci durumda ise partenogenetik hat, spesifik antibiyotiklere maruz bırakıldığında ya da yetiştirme sıcaklığının yükseltilmesiyle normal biseksüel üreme moduna çevirilebilir [17].

Çalışmamızda *Wolbachia* enfeksiyonuna bağlı telitoki gösterdiği wsp-PCR yöntemi ile tespit edilen *T. embryophagum* dişileri normal yetiştirme sıcaklığı olan 25 ± 1 °C ve >30 °C sıcaklık olmak üzere iki farklı yetiştirme sıcaklığına tabi tutulmuştur. 25 ± 1 °C'de yetiştirilen dişilerin bir sonraki dölde tamamen dişi bireyler vermeye devam ettiği, larval gelişme evresinde >30 °C sıcaklık koşuluna maruz bırakılan dişilerin ise bir sonraki dölde tamamen erkek birey oluşturduğu görülmüştür. Bu durum iki farklı hipotezle açıklanmaktadır; 1. yüksek sıcaklık ya da spesifik antibiyotik kullanımı dişi bireye çevre koşullarının değişmek üzere olduğu sinyali verir ve birey arhenotoki üreme modunu tercih eder, 2. yüksek sıcaklık ya da spesifik antibiyotik, telitoki

üreme modunun arhenotokiye dönüşmesine neden olan bazı kromozomal hasarlara neden olur [17].

Stouthamer ve ark, (1990) >30°C sıcaklık ya da antibiyotik uygulamasıyla dört farklı *Trichogramma* türünde telitoki üreme modunu arhenotokiye çevirmişlerdir [17]. Biz de *T. embryophagum* dişilerini larval gelişme evresinde >30°C sıcaklığa maruz bırakarak telitoki üreme modunu arhenotokiye çevirdik.

Hohmann ve ark, (2001) yaptıkları çalışmada antibiyotik uyguladıkları *T. kaykai* Pinto ve Stouthamer, dişilerinin diğerlerine göre daha fazla sayıda döl verdiği ancak daha kısa yaşadığı sonucuna varmışlardır [31]. Grenier ve ark, (2002) ise *T. evanescens* Westwood'in antibiyotik uygulanan ve uygulanmayan bireyleri arasında üretkenlik açısından fark olmadığını bulmuşlardır [55]. *T. deion* Pinto ve Oatman'un üretkenliği üzerine *Wolbachia*'nın negatif etkisi olduğu Silva ve ark, (2000) tarafından ortaya konmuştur [56]. *T. cordubensis*'de *Wolbachia* enfeksiyonunun üretkenliği etkilemediği [57], *T. oleae*'de ise pozitif bir etkiye yol açtığı belirlenmiştir [58]. Çalışmamızda *Wolbachia*'nın *T. embryophagum*'un üretkenliği etkilemediği sonucuna ulaşıldı.

Bir biyolojik mücadele programının başarıya ulaşmasında doğru tür seçimi en önemli basamaktır. Bu türün biyolojik özelliklerinden ömür uzunluğu ve parazitlenme oranı onun bir parazitoit olarak etkinliğinin en önemli göstergesidir. Özellikle ürettiği eşey oranı etkinliğin belirleyicisidir. Çünkü sadece dişi bireylerin konukçu yumurtasını parazitlenme özelliği vardır. Dolayısıyla bir parazitoit ne kadar çok dişi döl verirse o kadar çok zararlıyı etkisiz hale getirir denebilir. Çalışmamızda *T. cacoeciae*'nin *T. embryophagum*'a göre gerek ömür uzunluğu gerekse parazitlenme kapasitesi açısından daha başarılı olduğu sonucuna varıldı ($P>0,05$). *T. cacoeciae*, *Wolbachia* enfeksiyonu olmaksızın telitokinin görüldüğü bilinen tek *Trichogramma* türüdür. Aynı zamanda yüksek sıcaklık uygulamasıyla arhenotoki üreme moduna sahip *T. embryophagum* populasyonları elde edildi .

pulasyonlarla *Wolbachia* enfeksiyonuna sahip *T. embryophagum* populasyonları arasında ömür uzunluğu ve parazitlenme açısından bir fark olmadığı sonucuna ulaşıldı. ($P>0,05$).

Tüm sonuçları göz önüne alırsak *T. cacoeeciae*'nin biyolojik mücadele programlarında başarıyla kullanılabileceği görülmektedir. *T. embryophagum* türü için *Wolbachia* varlığı türün bazı biyolojik özellikleri üzerine negatif ya da pozitif etkiye sahip değildir ancak sadece dişi bireyler oluşmasına neden olduğu için biyolojik mücadele çalışmalarında *Wolbachia* ile enfekteli *T. embryophagum* popülasyonlarının kullanılması daha başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Sümer, F., Farklı Lokasyonlardan Toplanan *Trichogramma evanescens* Westwood Populasyonlarının Esteraz Düzeylerinin Tespiti, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 54, 2004.
2. Li, Li-Ying., Worldwide use of *Trichogramma* for biological control on different crops: A survey. In Biological Control with Egg Parasitoids, eds. E. Wajnberg and S. A. Hassan, pp. 37-53. Oxon, U.K., CAB International, 1994.
3. Pinto, J.D., Systematics of North American species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Memoirs of the Entomological Society of Washington, 22.287pp, 1998.
4. Luck, R.F., Stouthamer, R. and Nunney, L., Sex determination and sex ratio patterns in parasitic Hymenoptera. In: Wrench, D.L., and Ebert, M.A., (eds.), Evolution and diversity of sex ratio in haplodiploid insects and mites. Chapman and Hall, Inc., New York, pp. 442-476, 1992.
5. Werren, J.H., Biology of *Wolbachia*. Ann. Rev. Entomol. 42: 587-609, 1997.
6. Werren, J.H., Windsor, D.M., *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of global equilibrium? Proc. R. Soc. Lond. B 267: 1277-1285, 2000.
7. Stouthamer, R., The use of sexual versus asexual wasps in biological control. Entomophaga., 38: 3-6, 1993.
8. Birova, H., A contribution to the knowledge of the reproduction of *Trichogramma embryophagum*, Acta. Entomol. Bohemoslov. 67: 70-72, 1970.
9. Stouthamer, R., Pinto, J.D., Platner, G.R., Luck, R.F., Taxonomic status of thelytokous forms of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), Ann. Entomol. Soc. Am. 83: 475-581, 1990.
10. Pintureau, B., Chaudier, S., Lassabliere, F., Charles, H., Grenier, S., Addition of wsp sequences to the *Wolbachia* phylogeny tree and stability of the classification. J. Mol. Evol. 51: 374-377, 2000.
11. Almeida, R.P. de, Stouthamer, R., Molecular identification of *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hymenoptera: Trichogrammatidae): A new record for Peru. Neotrop. Entomol. 32: 269-272, 2003.
12. Li, L., Worldwide use of *Trichogramma* for biological control on different crops: A survey. In: Biological Control with Egg Parasitoids, eds. E. Wajnberg and S. A. Hassan, pp. 37-53. Oxon, U.K., CAB International, 1994.
13. Oztemiz, S., Ercan, F.S., Lazarevska, S. "Faunistic records of Trichogrammatidae (Hymenoptera) species in Turkey". Plant Protection Society of the Republic of Macedonia, Vol XXIII 24/25, 7-13, 2012.

14. Sümer, F., Çukurova bölgesindeki *Trichogramma* türlerinin (Hymenoptera: Trichogrammatidae) teşhisinde moleküler yöntemlerin kullanımı, Doktora tezi, Kayseri, 125, 2009.
15. Nagarkatti, S. and Nagaraja, H., Redescription of some known species of *Trichogramma*, showing the importance of male genitalia as a diagnostic character, *Bull. Entomol. Res.*, 61: 13-31, 1971.
16. Pinto, J.D. and Stouthamer, R., Systematics of the Trichogrammatidae with emphasis on *Trichogramma*, In: E. Wajnberg and S.A. Hassan (eds.), *Biological Control with Egg Parasitoids*, CAB International, Wallingford, pp. 1-36, 1994.
17. Stouthamer, R., Luck, R.F. and Hamilton, W.D., Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* to revert to sex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 2424-2427, 1990.
18. Stouthamer, R., Hu, J., Kan, F.J.P.M van, Platner, G. R. and Pinto, J. D., The utility of internally transcribed spacer 2 DNA sequences of the nuclear ribosomal gene for distinguishing sibling species of *Trichogramma*, *BioControl*, 43: 421-440, 1999.
19. Knutson, A., *The Trichogramma manual*, Agricultural communication, The Texas A&M University System, 42 pp., Texas, 1998.
20. O'Neill, S.L., Hoffmann, A.A. & Werren, J.H., *Influential passengers*. Oxford University Press, Oxford. pp 214, 1997.
21. Martin, G., Juchault. P. & Legrand, J.J., Mise en évidence d'un microorganisme intracytoplasmique symbiote de l'Oniscoïde *Armadillidium vulgare* Latr. dont la présence accompagne l'intersexualité ou la féminisation totale des mâles génétiques de la lignée thélygène. *C.r. Acad. Sci., Paris* 276: 2312-2316, 1973.
22. Sironi, M., Bandi, C., Sacchi, L., Di Sacco, B., Damiani, B. & Genchi, C., Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Mol. Biochem. Parasitol.* 74: 223-227, 1995.
23. Breeuwer, J.A.J. & Jacobs, G., *Wolbachia*: intracellular manipulators of mite reproduction. *Exp. Appl. Acarol.* 20: 421-434, 1996.
24. Breeuwer, J.A.J. & Werren, J.H., Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature, Lond.* 346: 558-560, 1990.
25. Giordano, R., O'Neill, S.L. & Robertson, H.M. *Wolbachia* infections and the expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila sechellia* and *D. mauritiana*. *Genetics* 140: 1307-1317, 1995.
26. Rousset, F. Bouchon, D., Pintureau, B., Juchault, P. & Solignac, M. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B* 250: 91-98, 1992.

27. Juchault, P., Frelon, M., Bouchon, D. & Rigaud, T. 1994. New evidence for feminizing bacteria in terrestrial isopods. *C. R. Acad. Sci. Paris* 317: 225-230.
28. Hurst, G.D.D., Jiggins, F.M., Von der Schulenburg, J.H.G., Bertrand, D., West, S.A., Goriacheva, I.I., Zakharov, I.A., Werren, J.H., Stouthamer, R. & Majerus, M.E.N. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266: 735-740, 1999.
29. Islam, M.S. *Wolbachia*-mediated reproductive alterations in invertebrate hosts and biocontrol implications of the bacteria: an update, *Univ. j. zool. Rajshahi Univ.* Vol. 26, pp. 1-19, 2007.
30. Huigens, M.E., Luck, R.F., Klaassen, R.H.G., Maas, M.F.P.N., Timmermans, M.J.T.N. & Stouthamer, R.. Infectious parthenogenesis. *Nature, Lond.* 405: 178-179, 2000.
31. Hohmann, C.L., R.F. Luck & R. Stouthamer. Effect of *Wolbachia* on the Survival and Reproduction of *Trichogramma kaykai* Pinto and Stouthamer (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Neotrop. Entomol.* 30: 607-612, 2001.
32. Laraichi, M. L'effet de hautes temperatures sur le taux sexuel de *Ooencyrtus fecundus* (Hym: Encyrtidae). *Entomol Exp Appl*, **23**, 237-242, 1978.
33. Pintureau, B., Grenier, S., Heddi, A. & Charles, H., Biodiversity of *Wolbachia* and of their effects in *Trichogramma* (Hymenoptera : Trichogrammatidae) *Ann. Soc. entomol. Fr.* (n.s.), 38 (4) : 333-338, 2002.
34. Meer, M.M.M. van, Witteveldt J., Stouthamer, R. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. *Insect Molecular Biology*, 8: 399-408, 1999.
35. Jager C.R., Pintureau, B., Heddi, A.. Comparison Between Phylogenetic Trees of Some *Trichogramma* Species And Their *Wolbachia* Endosymbionts. *Russian Entomological Journal*, **7** : 163-168, 1998.
36. Pintureau B., Chaudier S., Lassabliere F., Charles H., Grenier S. Addition of *Wsp* Sequences to The *Wolbachia* Phylogenetic Tree and Stability of The Classification. *Journal Of Molecular Evolution*, 51: 374-377, 2000.
37. Stouthamer R. *Wolbachia*-induced parthenogenesis. In: S.L. O'Neill, A.A. Hoffmann & J.H. Werren (eds.), *Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction*, p. 102-124. Oxford Univ. Press: Oxford (UK), 1997.
38. Vavre, F., de Jong, J.H. and Stouthamer, R., Cytogenetic mechanism and genetic consequences of thelytoky in the wasp *Trichogramma cacoeciae*. *Heredity*, 93, 592-596, 2004.
39. Werren, J.H., Zhang, W. & Guo, L.R.. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc. R. Soc. Lond B* 261: 55-71, 1995.

40. Zhou, W., Rousset, F. & O'Neill, S.L. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265: 509-515, 1998.
41. Baldo L, DunningHotopp J, Jolley K, Bordenstein S, Biber S, Ray Choudhury R, Hayashi C, Maiden M, Tettelin H, Werren J. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl Environ Microbiol* 72:7098-7110, 2006.
42. Hall, T.A., BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment [ed.], and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98, 1999.
43. SPSS for Windows, Release 10.0.1 Standart Version, SPSS, Inc, 223, S. Wacker Drive, Chicago, Illinois, 1999.
44. Pinto, J.D., Koopmanschap, A.B., Platner, G.R., and R. Stouthamer. The North American *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) parasitizing certain Tortricidae (Lepidoptera) on apple and pear, with ITS2 DNA characterization and description of a new species. *Biol. Control.* 23, 134-142, 2002.
45. Sumer, F., Tuncbilek, A.S., Oztemiz, S., Pintureau, B., Jones, P.R., and R. Stouthamer. A molecular key to the common species of *Trichogramma* of the Mediterranean region. *BioControl.* 54, 617-624, 2009.
46. Thomson, L., Rundle, B.J., Carew, M.E., and A.A. Hoffmann, Identification and characterization of *Trichogramma* species from south-eastern using the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of the ribosomal gene complex. *Entomol Exp Appl.* 106(3), 235-240, 2003.
47. Chang, S.C., Hu, N.T., Hsin, C.Y., and C.N. Sun, Characterization of differences between two *Trichogramma* wasps by molecular markers. *Biol. Control.* 21, 75-78, 2001.
48. Ciociola, J.R.A.I., Querino, R.B., Zucchi, R.A., and R. Stouthamer, Molecular tool for identification of closely related species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae): *T. rojasi* Nagaraja & *T. lasallei* Pinto. *Neotrop. Entomol.* 30(4):, 575-578, 2001.
49. Ercan, F.S., Oztemiz, S., Tuncbilek, A.S & Stouthamer, R. "Sequence analysis of Ribosomal DNA ITS2 region of the two *Trichogramma* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae)". *Archives of Biological Sciences*, Belgrade, 63 (4), 949-954. 2011.
50. Ercan, F.S., Oztemiz, S., A.S. Tuncbilek, "Mitochondrial and ribosomal DNA sequence analysis for discrimination of *Trichogramma euproctidis* Girault and *Trichogramma brassicae* Bezdenko (Hymenoptera: Trichogrammatidae)". *Turkish Journal of Entomology*, 37 (2), 195-201, 2013.
51. Ebrahimi, E., The species of *Trichogramma* Westwood in Iran, *Proceedings of XX International Congress of Entomology Haly*, p.639, 1996.

52. Pintureau, B, Phylogenetic study of the European species of the genus *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Trends in agric. Sci., Entomol., 2: 141-150, 1994.
53. Stouthamer, R., Kazmer, D.J. Cytogenetics of microbe associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. Heredity, 73: 317-327, 1994
54. Gurr, G. M., Nicol, H. I., Effect of food on longevity of adults of *Trichogramma carverae* Oatman and Pinto and *Trichogramma nr brassicae* Bezdenko (Hymenoptera: Trichogrammatidae), Australian Journal of Entomology 39, 185-187, 2000.
55. Grenier, S., Gomes, S.M, Pintureau, B, Lassabliere, F., Patrice Bolland, P., Use of tetracycline in larval diet to study the effect of *Wolbachia* on host fecundity and clarify taxonomic status of *Trichogramma* species in cured bisexual lines. Journal of Invertebrate Pathology, 80: 13-21, 2002.
56. Silva, I.M.M.S., Van Meer, M.M.M., Roskam, M.M., Hoogenboom, A., Gort, G., Stouthamer, R., Biological control potential of *Wolbachia*-infected versus uninfected wasps: laboratory and greenhouse evaluation of *Trichogramma cordubensis* and *T. deion* strains. Biocontrol Sci. Technol. 10, 223–238, 2000.
57. Neto, L., Interactions genetiques entre les Trichogrammes (Hym. Trichogrammatidae) et leurs hotes. Role d'un symbiote, These de Doctorat INSA-Lyon, Lyon, pp. 180, 1996.
58. Silva, I.M.M.S., Identification and evaluation of *Trichogramma* parasitoids for biological pest control, PhD thesis Wageningen Universiteit, Wageningen, p. 151, 1999.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Yozgat'da doğan Tuğba KAYA BARAN, ilköğretimini Mehmet Akif İlköğretim Okulu'nda ve orta ve lise öğretimini Sorgun Anadolu Lisesi'nde tamamlamıştır. 2004 yılında kazandığı Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü 2008 yılında başarıyla bitirmiştir.

2010 yılında yüksek lisans eğitimine Bozok Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında başlamıştır. Yrd. Doç. Dr. Fahriye ERCAN danışmanlığında hazırladığı “*Wolbachia* (Alpha-Proteobacteria, Rickettsiaceae) Enfeksiyonunun *Trichogramma* Türlerinde Bazı Biyolojik Özellikler Üzerine Etkisi” başlıklı tez çalışması ile halen yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.

İletişim Bilgileri

Adres Ahmet Efendi Mah. Ankara Bulvarı, Eski Buğday Pazarı Karşısı,
Gümüş Apt. No:138, Daire:2

66700 Sorgun / YOZGAT

Telefon: 0 (354) 415 50 44

E-posta: tugba_karnelyan@hotmail.com