

T.C.
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ORTA AFRİKA ÜLKESİ ÇAD'DA DOMATES GÜVESİ *TUTA*
ABSOLUTA (LEPIDOPTERA: GELECHİİDAE)
POPÜLASYONLARINDA ENDOSİMBİYONT
BAKTERİ TÜRLERİNİN BELİRLENMESİ

Mahamat Nour Abdallah DİRGUİ

Danışman
Prof. Dr. Erhan KOÇAK

ISPARTA - 2023



© 2023 [Mahamat Nour Abdallah DĪRGUĪ]

ETİK BEYANI

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak ve bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın hazırladığım bu tez çalışmasında;

Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, tezime ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

16/08/2023

Mahamat Nour Abdallah DİRGÜİ

.....

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	7
2.1. <i>Wolbachia</i>	8
2.2. <i>Rickettsia</i>	10
2.3. <i>Spiroplasma</i>	10
2.4. Lepidoptera'daki Bakteriyel Simbiyont Çeşitliliği.....	11
2.5. <i>Tuta absoluta</i> 'da Endosimbiyontlar	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM	15
3.1. Böcek Örneklerinin Toplanması	15
3.2. Laboratuvar Çalışmaları.....	17
3.2.1. Dna ekstraksiyonu	17
3.2.2. Kademeli sıcaklık düşürme PCR (Touchdown PCR protokolü).....	18
3.2.3. Jel elektroforezi protokolü	21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	23
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	27
KAYNAKLAR	28
ÖZGEÇMİŞ	37

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ORTA AFRİKA ÜLKESİ ÇAD'DA DOMATES GÜVESİ *TUTA ABSOLUTA* (LEPIDOPTERA: GELECHİİDAE) POPÜLASYONLARINDA ENDOSİMBİYONT BAKTERİ TÜRLERİNİN BELİRLENMESİ

Mahamat Nour Abdallah DİRGUİ

**Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Erhan KOÇAK

Güney Amerika orijinli olan domates güvesi *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), domateste zararlı en önemli türlerden birisidir. Bu zararlı, domates sektörünün çok önemli bir sosyo-ekonomik ve beslenme rolü oynadığı Çad'da ilk defa bu çalışma ile belirlenmiştir. Çad'daki surveylerde domates üreticileri ile yapılan görüşmelerde *T. absoluta* nedeniyle domates üretiminde çok büyük ekonomik kayıpların olduğu ve kimyasal mücadelede de genellikle başarısız oldukları anlaşılmıştır.

Bu tez çalışması, istilacı egzotik bir tür olan *T. absoluta*'nın Çad popülasyonlarında endosimbiyont bakterilerden *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma*'nın belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Bu amaçla yapılan surveylerde, *T. absoluta* larvaları Çad'ın sadece Am-timan ve Moundou bölgelerinden toplanabilmıştır. Moundou lokasyondan 10 larva Am-timan lokasyondan altı larva olmak üzere toplam 16 larvada endosimbiyotik bakteriler *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma*'nın varlığı ve bulunma oranları PCR reaksiyonu ile belirlenmiştir.

Toplam bulunma oranı *Wolbachia* enfeksiyonu için ortalama %87.5, *Rickettsia* enfeksiyonu için %100 ve *Spiroplasma* enfeksiyonu için %93.75 olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, Çad'da ilk kez belirlenmiş olan *T. absoluta*'nın simbiyontları olarak *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* tespit edilmiştir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalara bakıldığında *Spiroplasma* ve *Rickettsia* çalışmamızda yüksek oranlarda belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Tuta absoluta*, *Wolbachia*, *Rickettsia*, *Spiroplasma*, Afrika

2023, 37 sayfa

ABSTRACT

Master's Thesis

DETERMINATION OF ENDOSYMBIONT BACTERIA SPECIES OF *Tuta absoluta* (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) POPULATIONS FROM CENTRAL AFRICAN COUNTRY CHAD

Mahamat Nour Abdallah DIRGUI

Isparta University of Applied Sciences
The Institute of Graduate Education
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Erhan KOÇAK

The South American tomato leaf miner *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) is one of the most harmful to tomato. The pest was determined within this study first time in Chad, in which the tomato plays a very important socio-economic and nutritional role. In the interviews made with tomato producers in the surveys in Chad, it was understood that there were great economic losses in tomato production due to *T. absoluta* and that they were generally unsuccessful in chemical control.

The thesis study was carried out to determine the endosymbiont bacteria *Wolbachia*, *Rickettsia* and *Spiroplasma* in the populations of *T. absoluta* in Chad. In the surveys made for this purpose, *T. absoluta* larvae could only be collected from Am-timan and Moundou regions of Chad. Presence and presence rates of endosymbiotic bacteria *Wolbachia*, *Rickettsia* and *Spiroplasma* were determined by PCR reaction in a total of 16 larvae, 10 larvae from Moundou settlement and six larvae from Am-timan region

The mean incidence in each region was determined as 87.5% for *Wolbachia* infection, 100% for *Rickettsia* infection and 93.75% for *Spiroplasma* infection. As a result, *Wolbachia*, *Rickettsia* and *Spiroplasma* have been detected in the records of *T. absoluta* in Chad. *Spiroplasma* and *Rickettsia* progressed at a high rate in our study, which have been little explored to date.

Key Words: *Tuta absoluta*, *Wolbachia*, *Rickettsia*, *Spiroplasma*, Africa

2023, 37 pages

TEŞEKKÜR

Tezimin y¼r¼t¼lmesinde desteğini ve emeğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danıŐmanım sayın hocam Prof. Dr. Erhan KOçAK'a, ęalıŐma s¼resince bana desteklerinden dolayı teŐekk¼rlerimi sunarım.

2022-YL1-0172 No`lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Y¼netim Birimi BaŐkanlıęı'na teŐekk¼r ederim.

Tezimin her aŐamasında beni yalnız bırakmayan babam Abdallah DİRGUI'ye, her zaman varlığıyla beni destekleyen babaannem Abou Hawa SABOUR'a ve laboratuvar'da yanımda olan Z¼lal TAT'a sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Mahamat Nour Abdallah DİRGUI
ISPARTA, 2023

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.4. <i>Tuta absoluta</i> 'nın Afrika ülkelerindeki dağılımı.....	4
Şekil 3.1. Çad'da <i>Tuta absoluta</i> popülasyonlarının toplandığı lokasyonlar	15
Şekil 3.2. Domates güvesi (<i>Tuta absoluta</i>) larvası ve zararı.....	16
Şekil 3.3. PCR cihazı	19
Şekil 3.4. Jel elektroforezi yükleme ve görüntüleme	22
Şekil 3.5. UV jel görüntüleme kabini.....	22
Şekil 4.1. İki farklı popülasyondan elde edilen <i>Wolbachia</i> görüntüleri.....	24
Şekil 4.2. İki farklı popülasyondan elde edilen <i>Rickettsia</i> görüntüleri	24
Şekil 4.3. İki farklı popülasyondan elde edilen <i>Spiroplasma</i> görüntüleri.....	25

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Touchdown PCR analizi için protokol.....	20
Çizelge 3.2. <i>Wolbachia</i> , <i>Rickettsia</i> ve <i>Spiroplasma</i> hakkında temel bilgiler	20
Çizelge 3.3. PCR protokolü	20
Çizelge 4.1. Popülasyonlardaki bireylerin endosimbiyonlarla bulaşma durumları ..	23
Çizelge 4.2. Popülasyonlardaki endosimbiyont sayıları ve bulunma oranları.....	23



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

bp	Nükleik asit uzunluğu
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CI	Sitoplazmik Uyumsuzluk
CK	Sitokinin Seviyesi
DNA	Deoksiriboz Nükleik Asit
G	Gama
HGT	Gen Transferi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (Saflık birimi, Kalite)
mA	Miliamper
MCL	Maksimum Bileşik Olabilirlik
MK	Erkek Öldürme
ml	Mililitre
MLST	Çok Odaklı Dizi Tipleme
mM	Milimolar
MtDNA	Mitokondriyal Genom
Ne	Popülasyon boyutu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDE	Filogenetik Mesafe Etkisi
pH	Bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesini tarif eden ölçü birimi
RNA	Ribo Nükleik Asit
rRNA	Ribozomal RNA
sp.	Taksonomide bir cinse ait türü ifade eder
T _m	Primer annealing sıcaklığı
um	Mikromolar
UV	Ultraviyole
wsp	<i>Wolbachia</i> yüzey proteini
xg	Santrifüj cihazında hız birimi
µL	Mikrolitre
%	Yüzde

1. GİRİŞ

Domates (*Solanum lycopersicum* L.) (Solanales: Solanaceae) Güney Amerika'nın And Dağları'na özgüdür (Naika vd., 2005). Meksika'da kiraz domatesinden evcilleştirilmiştir (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) (Blanca vd., 2012) ve 1544'te Avrupa'ya getirilmiştir. Oradan Güney Asya ve Doğu Afrika ve Orta Doğu'da ekimi yayılmıştır (Naika vd., 2005). 1753'te Linnaeus onu *Solanum* cinsine dahil etmiştir ve bir yıl sonra Miller onu tekrar *Lycopersicon* cinsine yerleştirilmiştir (Ranc, 2010). Modern moleküler biyoloji tekniklerine dayanan mevcut taksonomi, domatesi *Solanum* cinsine yerleştirmiştir (Spooner vd., 1993).

Güney Amerika'da tek veya çok yıllık olarak yetiştirilen otsu bir bitkidir. Bununla birlikte, iki tür büyüme vardır: belirli büyüme ve belirsiz büyüme (Naika vd., 2005). İlk çiçeklenme (4-12 çiçek), bitki 7-14 bileşik yaprağa sahip olduğunda veya çeşide bağlı olarak 56-70 günde gerçekleşir. Meyve olgunlaşması, tam çiçek gelişiminden sonraki 42 ila 56 gün arasındadır. 80-120 günlük bir üretim döngüsü ile (Spooner vd., 1993), büyümenin başlangıcında dik bir alışkanlığa sahiptir, daha sonra gövde geliştikçe ve dallara bağlı olarak değişken ortam gerektiren dallar gelişmektedir.

İyi su tutma kapasitesine sahip, havalandırması iyi, tuzsuz ve pH değeri 5.5 ile 6.8 arasında olan mineralli toprakları tercih eder. Ayrıca derin, iyi drene edilmiş tınlı topraklarda iyi yetişir (Naika vd., 2005). Mahsul, 30 ila 50 t.ha-1 organik madde ve 300 kg.ha-1 NPK (12-22-22 veya 14-23-14) içeren bazal pansuman gerektirir (Rouamba vd., 2013). Optimal sıcaklıklar 21 ile 24°C arasında ve 10°C'nin altında ve 38°C'nin üzerinde bitki dokuları zarar görür (Naika vd., 2005).

Örtü altı üretimin gelişmesi sayesinde nispeten soğuk bölgeler de dâhil olmak üzere dünyanın tüm iklim bölgelerinde (5 030 545 ha, 180 766 329 ton, 2019'da 178 ülke) domates üretilmektedir. En büyük üreticiler Çin (%34.8), Hindistan (%10.5), Türkiye (%7.1), Amerika Birleşik Devletleri (%6.0) ve Mısır (%3.8)'dir. Dünya üretiminin %62.1'i bu beşli tarafından sağlanmaktadır. Afrika üretimi (1 612 512 ha, 21 664 774 ton) dünya üretiminin yalnızca %12'sini temsil etmektedir (FAOSTAT, 2021).

Çad, Orta Afrika'da bulunan bir ülkedir. Kuzeyde Libya, güneyde Kamerun ve Orta Afrika Cumhuriyeti, atıdan Niger ve Nijerya ve doğuda sudan olmak üzere altı ülkeyle sınır paylaşmaktadır.

Ülkenin yaklaşık $\frac{3}{4}$ 'ü çöl veya yarı-çöl bölgelerinden oluşmaktadır. Sahra Çölü'nün güneyinde yer alan ve genellikle kurak iklim koşullarına sahiptir. Tarım, Çad'ın ekonomisi ve nüfusunun büyük bir bölümü için önemli bir ekonomi kaynağıdır. Çiftçilik genellikle küçük ölçekte aile işletmeleri tarafından gerçekleştirilmekte olup temel gıda maddelerinin üretimi üzerine yoğunlaşmıştır.

Çad'da domates en popüler sebzelerden biridir ve yetiştiriciliği, Çad ekonomisine katkı sağlamakta ve en önemlisi yerel pazarlarda temel bir gıda kaynağı olarak önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle sulama imkânlarına sahip bölgelerden Njamena, Am-timan, Moundou ve Abeche'de bulunan göletler ve diğer su rezervlerinin çevresinde soğuk iklim dönemleri dışında üretim gerçekleştirilmektedir.

Domates üretimi, yerel çiftçiler için istihdam ve gelir kaynağı oluşturarak kırsal kalkınmaya katkıda bulunmaktadır. Ancak, Çad'da tarımsal üretimde hala birçok zorluk bulunmaktadır, su kaynaklarının yetersizliği, kuraklık, tarım arazilerinin sınırlı olması ve teknolojik altyapının yetersizliği gibi faktörler, domates üretimini de olumsuz yönde etkilemektedir. *T. absoluta* gibi zararlılara karşı mücadele, tarım uzmanları, çiftçiler ve ilgili kurumlar arasında iş birliği gerektiren bir süreçtir. Bu şekilde zararlıyı kontrol altına almak ve domates meyve üretimini korumak mümkün olabilir (Muniappan, 2013).

İlk olarak 1917'de Huancayo'dan (Peru) toplanan böceklere Meyrick *Phthorimaea absoluta* adını vermiştir. Bu cins daha sonra 1962'de *Gnorimoschema*, 1964'te *Scrobipalpula* ve 1987'de *Scrobipalpuloides* olarak adlandırılmıştır. 1994'te Povolný tarafından Güney Amerika domates yaprak güvesi olarak adlandırılmıştır (Povolny, 1994; Biondi vd., 2018).

Gelechiidae familyasında 4000'den fazla tür mevcuttur ve Bunlardan *Tecia solanivora* ve *Phthorimaea operculella* patatete, *Keiferia lycopersicella* ise domateste zararlı türlerdir. Bu son iki zararlı morfolojik olarak *T. absoluta* ile aynıdır ve sitokrom

oksidaz (COI) gen barkodlamasının kullanılması veya erkek cinsel organındaki kapakçık ve vinculum şeklinin incelenmesi onları ayırt etmeye yardımcı olabilir (Badaoui ve Berkani, 2011; Zhang vd., 2013; Crespo-Pérez vd., 2014; Son vd., 2017; Biondi vd., 2018).

Povolný (1994)'ye göre, *T. absoluta*'nın sistematik konumu aşağıdaki gibidir:

Alem: *Hayvanlar*

Şube: Arthropoda

Sınıf: Insecta

Takım: Lepidoptera

Alt takım: Glossata

Üstfamilya: Gelechioidea

Familya: Gelechiidae

Altfamilya: Gelechiinae

Cins: *Tuta*

Tür: *Tuta absoluta* Meyrick (1917)

Zararlıının larvaları, olgun ve olgunlaşmamış meyveler de dahil olmak üzere domatesin vegetatif ve generatif organlarını yok ederek bitkinin tüm kısımlarıyla beslenirler (Desneux vd., 2010). Bu zararlıının ana konukçu bitkisi domates (*Solanum lycopersicum* L.) olarak bilinmektedir, fakat aynı zamanda patates (*S. tuberosum* L.), patlıcan (*S. melongena* L.), pepino (*S. muricatum* Aiton) ve it üzümü (*S. nigrum* L.) gibi diğer bitkilerle de beslenirler (Cherif ve Verheggen, 2019).

Yüksek çoğalma kapasitesi (yılda 10 - 12 nesil, 260 yumurta/dişi) (Fernandez ve Montagne, 1990; Uchoa-Fernandes vd., 1995; Germain vd., 2009) ve özellikle insektisit direnci göz önüne alındığında (Guedes vd., 2019; Sawadogo vd., 2020), uygun zamanda ve dozda kullanıldıklarında bile başarı düşük olabilmekte ve üretim maliyetlerinde önemli bir artış ortaya çıkmaktadır (Germain vd., 2009; Desneux vd., 2010; Badaoui ve Berkani, 2011).

Tuta absoluta'nın yüksek biyotik potansiyeli, çeşitli iklim koşullarına uyum sağlama yeteneği ve hızlı tüm afrika ülkelerine istila etmektedir. Bu böcek, domates tarlalarında büyük zararlara neden olduğu için ciddi bir zararlı olarak kabul edilmiştir. Zararlıının yayılımı zaman içinde durmamış ve uluslararası düzeyde de görülmüştür. Bu zararlı, hızlı üreme potansiyeline ve yüksek hareket kabiliyetine sahiptir, bu da yayılmasını kolaylaştırmıştır. Ayrıca, tarım ürünlerinde geniş bir bitki yelpazesine zarar verebilme yeteneği, çeşitli bölgelerde ekonomik kayıplara neden olmuştur. *T. absoluta*'nın kontrol altına alınması, uluslararası işbirliği ve bilgi paylaşımı gerektiren bir konudur. Bu şekilde, zararlı böceklerle mücadelede başarılı sonuçlar elde edilebilir ve domates üretiminde oluşabilecek zararlar azaltılabilir (Germain vd., 2009; Desneux vd., 2010). Bu nedenle, bu istilacı zararlıya yalnızca önemli zarar vermemesini sağlamak için değil, aynı zamanda sebze yetiştiricilerinin geçim kaynaklarını garanti edebilecek çevre dostu yönetim stratejileri aramak için de özel dikkat gösterilmelidir. Bu nedenle, biyolojisi, ekolojisi, gelişmesi ve yayılması için olumlu ve olumsuz faktörler ve bu zararlıya karşı etkili ve sürdürülebilir entegre mücadele stratejileri ile ilgili çalışmalar yapılmalıdır. Bunlardan birisi de endosimbiyont bakteriler olabilir.

Alfaproteobakterilerin en temsili cinsi konukçu böceklerde üreme fenotipleri ile ilişkili olan *Wolbachia* ve *Rickettsia*'dır (Jeyaprakash ve Hoy, 2000; Engelstädter ve Hurst, 2009). Ayrıca diğer taksonomik sınıflar, Bacteroidetes'ten Sphingobacteria *Cardinium* (Zchori-Fein ve Perlman, 2004) ve *Spiroplasma* (Mollicutes sınıfı) (Duron ve Hurst, 2013) gibi sitoplazmik uyumsuzluğu teşvik eden üreme endosimbiyontlarını içermektedirler. Bu mikroorganizmalardan *Wolbachia*, en yaygın endosimbiyozdur ve eklembacaklıların yarısından fazlasını enfekte ettiği düşünülmektedir (Weinert vd., 2015). Sitoplazmik uyumsuzluk zararlı böceklerle mücadelede kullanılacak uygulamalardan birisidir (Bourtzis, 2008). Çalışmamızda yer verdiğimiz endosimbiyontlar (*Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma*) ebeveynlerden yeni nesillere aktarılmaktadır. Bu sayede simbiyontlar, konukçu böceğin cinsiyet tayinini manipüle etmekte, üreme sürecini yönetmekte ve kendi devamlılıklarını sağlamaktadırlar (Zhou vd., 1998; Stouthamer vd., 1999; Werren vd., 2008). *Wolbachia*'nın Avrupa'ya girmesi ve Kuzey Afrika'ya yayılması sonucunda Belçika ve Tunus'ta domates güvesi popülasyonlarında partenogenez bildirilmiştir (Caparros-Megido, 2013; Abbes ve Chermiti, 2014).

Tuta absoluta (Škaljac vd., 2012; Carvalho vd., 2018; Erasmus vd., 2022; Cagnotti vd., 2023; Kavak ve Koçak, 2023) dahil olmak üzere, Lepidoptera türlerinin yaklaşık %80'inin *Wolbachia* ile enfekte olduğu tahmin ediliyor (Ahmed vd., 2016; Paniagua Voirol vd., 2018). Çalışmamız kapsamında olan diğer endosimbiontlar *Spiroplasma* ve *Rickettsia*, Škaljac vd. (2012) ve Merkhov vd. (2021) tarafından *T. absoluta*'da belirlenmemişken, ilk defa Kavak ve Koçak (2023) tarafından belirlenmiştir.

Tarımsal mücadelede geleceğe yönelik olarak çeşitli stratejilerin araştırılması ve geliştirilmesi, *T. absoluta* ve diğer zararlı böceklerin kontrolünü sağlamak için önemlidir. Bu şekilde tarımsal üretimde ekonomik kayıpların azaltılması ve gıda güvenliğinin sağlanması hedeflenmektedir. *Tuta absoluta*'nın Afrika'da yayılmasıyla mücadele etmek için çeşitli stratejiler üzerinde çalışılmaktadır. *Wolbachia* nedeniyle partenogenetik üreme gösteren bireylerin üreme kapasiteleri oldukça düşük olmaktadır, Afrika ülkelerinden güney Afrika'daki partenogenesis çalışma sonucu baktığımızda, çiftleşmemiş dişilerin yumurtladığı yumurtaların hiçbiri canlı kalmaması bu zararlılığın yok etmek için en umut verici yoldur (Erasmus vd., 2022). *Wolbachia* gibi endosimbiontların kullanımı, bu zararlı böcekle mücadelede gelecekte potansiyel bir yaklaşım olabilir. *Wolbachia*, böcek popülasyonları üzerinde etkili olan bir bakteridir ve böceklerin üreme kapasitelerini etkileyerek popülasyonlarını kontrol altına almayı sağlayabilir Shokal vd. (2016), tüm böcek türlerinin sırasıyla %20 ve %70'inde bulunan *Spiroplasma* ve *Wolbachia*'nın konaklarını patojenik ve patojenik olmayan bakterilerden koruduğunu, Chen vd. (2012), ise *Wolbachia*'nın bozulması durumunda böcek gelişiminin olumsuz etkilenebileceğine dikkat çekmektedirler. Günümüze kadar *T. absoluta*'da endosimbiontların varlığı konusunda yapılan çalışmalarda *Wolbachia*'nın Hırvatistan'da %100, Karadağ'da %95, Brezilya popülasyonlarında %100, Güney Afrika'da %95, Türkiye, İran ve Batı Azerbaycan'da yapılan çalışmada %100 ve Arjantin *T. absoluta* popülasyonlarında 3-55% ile ülkelerde belirlendiği (Škaljac vd., 2012; Carvalho vd., 2018; Merkhov vd., 2021; Erasmus vd., 2022; Cagnotti vd., 2023), *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma*'nın ise sadece Türkiye'de (Kavak ve Koçak, 2023) belirlendiği görülmektedir.

Bu çalışmada gelecekte alternatif mücadeleye temel oluşturacağı düşünülerek *T. absoluta*'nın Çad popülasyonlarında endosimbiontlardan *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* varlığı araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Tuta absoluta diploid bir güvedir ($2n = 58$ kromozom), erkek cinsiyet kromozomları çifti ZZ ve dişilerinki WZ'dir (Paladino vd., 2016). Erginleri 7 mm boyutlarında, kanat açıklığı 10-11 mm ve ön kanatları 4.5-4.7 mm olan güvelerdir. Kantları bazı siyah noktalarla birlikte kül grisi renktedir. Halkalı antenler vücutlarının 5/6'sı uzunluğundadır. Türün kesin olarak tanımlanmasında, aedeagus önemlidir (Germain vd., 2009). Dişiler erkeklerden daha iri olup 10-15 gün, erkekler ise 6-7 gün yaşarlar (Estay, 2000; Koudjil vd., 2015). Üreme için iletişim dişi cinsiyet feromonlarına dayanmakta olup çiftleşme birkaç dakikadan altı saate kadar sürmekte (Lee vd., 2014) ve 260 kadar yumurta bırakabilmektedirler (Silva, 2008). Yumurtalar küçük, 0.36 mm uzunluğunda ve 0.22 mm genişliğinde, silindir şeklinde ve kremden sarımsı renge kadar değişkenlik göstermektedir. Tek tek veya beşli gruplar halinde, tercihen bitkinin üst kısımlarında genç yaprakların alt tarafına veya gövdelere, çanak yapraklara ve daha az ölçüde meyvelere bırakılırlar (Cocco vd., 2015; Biondi vd., 2018). Yumurta inkübasyonu ortam sıcaklığına bağlı olarak 4-5 gün sürmektedir (Cuthbertson vd., 2013). Larvalar başlangıçta krem rengindedirler (1. dönem), sonra yeşilimsi ve açık pembeye dönerler (2.-4. dönem). Baş kapsülünün genişliği 0.12-0.6 mm, uzunluğu ise 0.42-7.25 mm arasında değişmekte olup, L4 larvasının boyutu L1 larvasından 10 kat daha büyüktür (Grissa-Lebdi vd., 2011). Larvalar yaprağın mezofilini kazarak beslenirler (Estay, 2000). Zamanla galeriler nekrotik hale gelir ve kahverengiye döner (Torres-vila vd., 2002). Bu, bitkinin fotosentetik kapasitesini önemli ölçüde azaltabilir. Gövde, genellikle bitkinin gelişimine zarar veren yaprağın veya pedinkülün yerleştirilmesinde saldırıya uğrar. Larva, ayrıca meyvede galeriler açarak meyveyi ikincil patojenlerin saldırısına açık hale getirmektedir. Sonuç olarak meyvelerin ticari değeri düşmektedir (Grissa-Lebdi vd., 2011). Herhangi bir mücadele önlemi alınmadığı takdirde %100'e varan oranda zarar oluşturabilirler (Desneux vd., 2010; Han vd., 2019b). Larva dönemi sıcaklığa bağlı olarak 13-15 gün sürer (Desneux vd., 2010; Tropea Garzia vd., 2012).

Olgun larvalar genellikle ipeksi bir iplik kullanarak yere düşerler ve burada ince, ipeksi bir koza oluştururlar ve sonra bunun içerisinde pupa haline gelirler. Ancak bazı olgun larvalar galerilerin içinde pupaya dönüşerek gelişim döngülerini tamamlarlar (Desneux vd., 2010; Grissa-Lebdi vd., 2011).

Rickettsiae organizmaları daha önce küçük boyutları, kötü Gram boyaması ve ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında hayatta kalmaları nedeniyle virüsler olarak değerlendirilmişlerdir. Ancak Gram-negatif basillere yapısal olarak benzer olmaları, DNA, RNA, enzimler, ribozomlar içermeleri ve antibiyotikler tarafından inhibe edilmeleri nedeniyle bakteri sınıfına aittirler. Çalışma aralığında incelenen bakteriler (*Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma*) bu grup içerisinde yer almakta olup sekonder simbiyotik özellikler göstermektedirler (Stouthamer vd., 1999; Fukatsu vd., 2001).

Böcekler ve mikroorganizmalar arasındaki simbiyotik ilişkilerde endosimbiyontlar konukçularının biyolojisini ve ekolojisini etkileme potansiyeline sahiptirler. Endosimbiyontlar, simbiyotik birlikteliklerin biçimine bağlı olarak besinsel faydalar, konukçu bitki tercihi, üreme değişikliği ve çevresel koşullara adaptasyonun yanı sıra insektisit direnci sağlamada yer alabilirler (Kontsedalov vd., 2008). *Wolbachia* ve *Rickettsia*, yaygın isteğe bağlı ortakyaşam böcekleridir (Anderson ve Karr, 2001). Bu iki simbiyont, yalnızca böcek partenogenezinde değil, aynı zamanda insektisit direncinde de rol oynamaktadır (Kontsedalov vd., 2008; Li vd., 2018). Simbiyoz aracılı insektisit direnci ve duyarlılığı, böcek türleri, ortakyaşam türleri ve bileşikler arasında değişiklik gösterir (Liu ve Guo, 2019).

Böceklerin mikrobiyal faunasının saptanması, bu mikroorganizmaların konukçularına yol açtığı sorunların aydınlatılması açısından önemlidir. Bakteriyel mikroorganizmalar ve konukçuları arasındaki etkileşimler, konukçunun uygunluğu, ekolojisi ve evrimsel biyolojisi açısından önemlidir (Gurung vd., 2019). Eklembacaklıları enfekte eden endosimbiyontların çeşitliliği (*Wolbachia*, *Rickettsia*, *Spiroplasma*, *Arsenophonus*, *Flavobacterium*, *Cardinium* ve *Microsporidia*) fazla olmasına rağmen, *Wolbachia*'ya daha fazla odaklanılmıştır. *Wolbachia*, birçok tarımsal zararlıdaki varlığı ve konukçularındaki üreme manipülasyonlarının çeşitliliği nedeniyle kapsamlı bir şekilde incelenmiştir.

2.1. *Wolbachia*

Wolbachia, esas olarak böcekler gibi eklembacaklı türlerini ve bazı nematodları enfekte eden bir hücre içi bakteri türüdür. Bu bakteriler son derece yaygındır ve böcek türlerinin yaklaşık %60'ı *Wolbachia* ile bulaşıktır. İlginç bir şekilde, *Wolbachia*

bakterilerinin, üremelerini manipüle etmek, onları diğer enfeksiyonlardan korumak ve hatta davranışlarını etkilemek de dahil olmak üzere konukçuları üzerinde bir dizi etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Örneğin, *Wolbachia*, enfekte erkeklerin enfekte olmayan dişilerle çiftleşme başarısında azalmaya yol açabilen sitoplazmik uyumsuzluğu indükleyebilir ve böylece bir popülasyondaki enfekte dişilerin oranını artırabilir. *Wolbachia*, sivrisineklerde dang humması ve Zika virüsleri gibi diğer patojenlerin çoğalmasını da engelleyebilir ve bu hastalıkların yayılmasını kontrol etmek için bir strateji olarak kullanılabilir. Genetik bilgilere dayanarak, *Wolbachia* 16 süper gruba ayrılmıştır (Werren vd., 2008; Glowska vd., 2015; Mateos vd., 2020) A ve B süper grupları ile sadece eklem bacaklıları enfekte eder (Baldo vd., 2006; Werren vd., 2008). *T. absoluta* dahil (Škaljac vd., 2012; Carvalho vd., 2018; Erasmus vd., 2022), lepidoptera türlerinin yaklaşık %80'inin *Wolbachia* ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir (Ahmed vd., 2016; Paniagua Voirol vd., 2018). Endosimbiontlar (*Wolbachia*, *Rickettsia*, *Cardinium* ve *Spiroplasma*) maternal olarak döllere aktarılmaktadır. Bu sayede simbiyontlar, kendi aktarımlarını geliştirmek için konukçada cinsiyet belirleme sürecini, üremesini ve gelişimini manipüle ederek kalıcı olmaktadır (Zhou vd., 1998; Stouthamer vd., 1999; Werren vd., 2008). Konukçularında sitoplazmik uyumsuzluk, dişileştirme, erkek öldürme ve partenogenetik üremeye neden olurlar (Werren, 1997; Stouthamer vd., 1999). Sitoplazmik uyumsuzluk açısından *Wolbachia*, enfekte erkeklerle çiftleşen enfekte olmayan dişilerin yavrularında embriyonik ölüme neden olur. Ayrıca potansiyel erkekleri dişilere dönüştürebilir (Bailly-Bechet vd., 2017). Cinsiyet oranı bozulması, *Wolbachia*'nın konukçu böceklerde üreme hücrelerini etkileyerek erkek veya dişi bireylerin oranını değiştirmesi anlamına gelir. Bu durum, bazı *Wolbachia* türlerinin erkekleri öldürerek veya üreme yeteneklerini azaltarak dişi bireylerin sayısını artırmasıyla gerçekleşebilir (Jiggins vd., 2000a; Dyson ve Hurst, 2004). *Wolbachia*, konukçularının mtDNA varyasyonunu etkilemede de önemli bir rol oynar (Hurst ve Jiggins, 2005; Moran vd., 2008), ayrıca besin sentezine de yardımcı olmaktadır (Moriyama vd., 2015).

Wolbachia'nın türleşmeyi teşvik etme etkisi de dikkate alınmaktadır. *Wolbachia*, hibridizasyon yoluyla yeni bir türe girdiğinde, çift yönlü sitoplazmik yetersizlik adı verilen bir durum ortaya çıkabilir. Bu durum, iki farklı uyumsuz *Wolbachia* ırkının melezlerin embriyonik ölümüne neden olmasıyla üreme izolasyonu sağlayarak

türleşmeyi teşvik eder (Bordenstein vd., 2001). Ancak, belirli türler ve *Wolbachia* suşları arasındaki etkileşimlerin karmaşıklığı göz önüne alındığında, *Wolbachia*'nın tüm Lepidoptera türlerinde aynı etkileri göstermeyeceği unutulmamalıdır. Bu konuda daha fazla araştırma ve çalışma yapılması gerekmektedir. *Wolbachia*, cinsiyet hücrelerini bozmadaki rolüyle yaygın olarak sevmene rağmen, farklı etkiler sergiliyor. *Wolbachia* ile enfekte olan türler, artan konukçu ömrü ve doğurganlık gösterir. Artışın riboflavin sağlanması yoluyla meydana geldiği değerlendirilmiştir (Moriyama vd., 2015).

2.2. Rickettsia

Rickettsial bakteriler, ökaryotların hücre içi simbiyontlarıdır. Bu cins, α -Proteobacteria şubesinde *Rickettsiaceae*'ye aittir (Williams vd., 2007). Ayrıca diğer taksonomik sınıflar, üreme endosimbiyontlarını içerir, örneğin sphingobacteria *Cardinium* sp. Bacteroidetes grubu (Zchori-Fein ve Perlman, 2004) ve *Spiroplasma* Mollicutes sınıfı (Duron ve Hurst, 2013). Eklembacıklılarda *Rickettsiae* çeşitliliğini ve yeni suşlarını ortaya çıkarmak için yapılan taramada *Rickettsia*'nın Lepidoptera'da yaygın olmadığı görülmüş ve incelenen 32 türden sadece bir türde varlığı belirlenmiştir (Cho vd., 2007). Karasal eklembacıklı türlerinin %13'ünün *Rickettsia* ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir (Weinert vd., 2015).

2.3. Spiroplasma

Spiroplasma, hücre duvarları olmayan sarmal veya sarmal hücrelerden oluşur. Spiral şekilli, hareketli, Gram pozitif bir bakteridir. Hem hücre içi hem de hücre dışı olarak çeşitli böcek türleri ile etkileşime girer. Böceklerde spiroplazma dışıdan yavruya dikey geçiş yapmaktadır. *Spiroplasma*'nın yapısını inceleyen araştırmacılar, onun sadece uzun sarmal bir yapıya sahip olmadığını, aynı zamanda Y şeklinde bir yapıya sahip olduğunu ve böceklerde bulunduğunu belirlemişlerdir (Ramond vd., 2016). Araştırmacılar, *Drosophila melanogaster* ile *Spiroplasma* arasındaki ikili ilişkiyi incelemeleri sonucunda, *Spiroplasma*'nın böcekte cinsiyet genlerini etkileyerek popülasyonda sadece dişi bireylere neden olduğunu (feminizasyon) belirlemişlerdir (Martin vd., 2013). Başka bir çalışmada, tüm böcek türlerinin %20'sinde bulunan

Spiroplasma'nın, konukçusunu patojenik ve patojenik olmayan bakterilerin neden olduğu enfeksiyondan koruduğu belirlenmiştir (Shokal vd., 2016).

2.4. Lepidoptera'daki Bakteriyel Simbiyont Çeşitliliği

Lepidoptera, dünyadaki en yıkıcı ikinci tarım zararlısıdır (Sree ve Varma, 2015). Lepidopteran biyolojisinde temel bir rol oynayan bakteriyel simbiyozun kanıtı azdır. Lepidoptera'nın bağırsak mikrobiyomun işlevsel rolü, tırtılların diğer böceklerle kıyasla çok az yerleşik bakteri barındırdığını veya hiç bakteri barındırmadığını bildiren yakın tarihli bir çalışma ile sorgulanmıştır (Hammer vd., 2017). Tanıman 157 424 Lepidoptera türünün <math><0.1</math> bakteriyel ortaklar için taranmış ve Lepidoptera'daki bakteriler hakkında sınırlı bilgi ortaya çıkmıştır. Lepidoptera, ekonomik ve ekolojik öneme sahip kelebekleri ve güveleri içeren oldukça çeşitli ve etkili bir türdür. Lepidopteran biyolojisinin birçok yönü iyi çalışılmış olsa da, bu gruptaki konukçuyla ilgili zararlıların yaygınlığı daha yakın zamanlarda incelenmiştir. Genetik endosimbiyoz kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Bandi vd., 2001; Moran, McCutcheon ve Nakabachi, 2008; Duron ve Hurst, 2013).

Bu çalışmaların çoğu, *Wolbachia* ve *Spiroplasma* gibi eklembacaklılarda yaygın olduğu bilinen spesifik endosimbiyontlara odaklanılmıştır. Bazı çalışmalar larvalara odaklanırken, diğerleri konak özellikleri üzerindeki potansiyel etkileri ele almıştır (Mitter vd., 2017). Lepidopteran larvalarının beslenme eksiklikleri, konukçu bitki değişiklikleri ve doğal düşman saldırısı gibi zorluklarla başa çıkmalarına yardım etmede ortak yaşamların rolünü anlamak esastır. Lepidoptera türlerinin tahminen %80'i *Wolbachia* ile enfektedir (Ahmed vd., 2015). Yakın tarihli bir çalışmada, Lepidoptera takımında toplam 90 farklı suş içeren çok sayıda *Wolbachia* suşu tanımlanmıştır (Ahmed vd., 2016). Lepidoptera'da ortalama enfeksiyon oranının (popülasyon yaygınlığı) yaklaşık %27 olduğu bildirilmiştir (Ahmed vd., 2015). Lepidoptera türleri ve ilgili *Wolbachia* suşlarının genel filogenetik analizi sırasında, *Wolbachia* suşlarını içeren Lepidoptera takımının konukçu taksonunun uzaktan eşleşme olması nedeniyle uyumsuzluğun meydana geldiği görülmüştür (Ahmed vd., 2016). Gözlemlenen bulgu, aynı türün bireyleri arasında değil, farklı Lepidoptera grupları ve diğer böcek takımları arasındadır (Jiggins vd., 1998; Jiggins vd., 2000a; Dyson ve Hurst, 2004; Charlat vd., 2007). *Danaus chrysippus*'ta, hücre içi bakteri

Spiroplasma tarafından cinsiyet oranının bozulmasına bağlı olarak erkek ölümü gözlemlenmiştir (Jiggins vd., 2000b). Bakteriyolojik bir bakış açısından, cinsiyet oranındaki düşüş, böcek popülasyonlarında hızlı yayılmayı kolaylaştırmıştır. Çünkü *Wolbachia* ile enfekte olmuş dişiler, hastalığı enfekte olmayan dişi hastalara göre daha fazla sayıda yaymaktadırlar (Jiggins vd., 2000a).

Dişilerin %95'inin *Wolbachia* ile enfekte olduğu *A. encedana* güve popülasyonlarında üreme başarılı olmuştur (Jiggins vd., 2000a). *Wolbachia*, konukçu davranışını ve patojenik böceklere karşı bağışıklığı etkilenmektedir (Zug ve Hammerstein, 2015). Ayrıca bitki fizyolojisini lepidopteran konukçu lehine manipüle etmektedir (Kaiser vd., 2010). Domates güvesi *Phyllonorycter blancardella*'nın beslenmesi esnasında, elma yaprağı dokusundaki sitokinlerin endosimbiyont tarafından manipülasyonu, bitki besin maddelerinin hareketliliği teşvik edilerek tırtılların beslendiği alanlarda yaprağın kartlaşma süreci yavaşlatılmıştır (Body vd., 2013).

Wolbachia çoğunlukla bilinen bakteri olmasına rağmen, *Spiroplasma* düşük seviyelerde bulunurken, *Rickettsia* da Lepidoptera'da yalnızca iki türde saptanmıştır (Russel vd., 2012; Weinert vd., 2015; Kavak ve Koçak, 2023).

2.5. *Tuta absoluta*'da Endosimbiyontlar

Tuta absoluta örnekleri Hırvatistan ve Karadağ'daki domates seralarından toplanıp, gene-özgü primerler (16S veya 23S rDNA) kullanılarak bakteriyel simbiyontlardan *Rickettsia*, *Hamiltonia*, *Arsenophonus*, *Wolbachia*, *Cardinium* ve *Fritschea*'nın varlığı test edilmiştir. Hırvatistan popülasyonundaki tüm larvalar *Wolbachia* enfeksiyonu gösterirken, Karadağ popülasyonundaki bireylerin %95'i enfekteli bulunmuştur. Değerlendirilen tüm *T. absoluta* popülasyonları, %70-100 oranlarında *Wolbachia* enfeksiyonu sergilemiştir. Ancak Hırvatistan popülasyonlarında *Rickettsia*, *Hamiltonella*, *Arsenophonus*, *Cardinium* ve *Fritshea* tespit edilmemiştir (Škaljac vd., 2012).

Brezilya'daki farklı domates üretim alanlarındaki *T. absoluta* popülasyonlarının %100'ünün *Wolbachia* ile enfekte olduğu ancak tespit edilen *Wolbachia*'nın Brezilya

popülasyonlarında partenogeneze neden olduğuna dair bir kanıt elde edilememiştir. (Carvalho vd., 2018).

Güney Afrika popülasyonunda yapılan bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Güney Afrika *T. absoluta* popülasyonlarında *Wolbachia* enfeksiyon oranı yüksektir (\geq %95). Bu çalışmada tanımlanan *Wolbachia* ırkı ST41, tüm Brezilya *T. absoluta* popülasyonlarından da rapor edilmiştir. Bu çalışmada Parthenogenesis çalışması bu şekilde sonuç elde edilmiştir, çiftleşen dişilerin doğurganlık oranı %94.64 olurken, çiftleşmemiş dişilerin yumurtladığı yumurtaların hiçbiri canlı kalmamaktadır o halde partenogenesis tespit edilmemiştir (Erasmus vd., 2022).

Türkiye'de yapılan bir çalışmada, *T. absoluta*'nın popülasyonlardaki genetik çeşitliliğini ve farklılaşmasını araştırmak için 2019-2020 yılları arasında İran (Batı Azerbaycan) ve Türkiye'de (Van, Muğla, İzmir) 15 farklı bölgeden domates güveleri toplanmıştır. *Wolbachia* enfeksiyonunun varlığı ve prevalansı, yaklaşık 600 bp uzunluğunda bir amplikon üreten *T. absoluta* wsp geni kullanılarak belirlenmiştir. Popülasyonlarda *Wolbachia* %100 oranında bulaşma göstermişken *Arsenophonus*, *Cardinium*, *Hamiltonella* ve *Spiroplasma* enfeksiyonlarına rastlanmamıştır (Mehrkhov vd., 2021).

Arjantin'de *T. absoluta*'nın larvaları, La Plata ve Mar del Plata, Bella Vista ve Yuto bölgelerinden ticari domates tarlalarından toplanmıştır. *T. absoluta*'nın üreme endosimbiontlarının (*Wolbachia*, *Spiroplasma*, *Arsenophonus*, *Cardinium* ve *Rickettsia*) varlığı açısından standart PCR ile değerlendirilmiştir, Standart PCR ile amplifikasyon ve 16S rRNA geninin (600 bp) bir iç bölgesinin sekanslanmasından elde edilen sonuç Arjantin'den *T. absoluta*'da *Wolbachia* varlığını doğrulanmıştır. Test edilen diğer üreme simbiyotları (*Spiroplasma* ve *Rickettsia*) için pozitif sonuç elde edilmemiştir. *Wolbachia* endosymbiont, Arjantin domates güvesi popülasyonlarında 3-55% frekans aralığında pozitif olarak tespit edilmiş, Plata bölgesinde 27 örnekten 15 *Wolbachia* pozitifle en yüksek sıklık gözlenmiştir %55.6, ardından Bella Vista'da 33 örnekten 15 pozitif tespit edilmiştir %45.4 en son Yuto bölgesinden 30 örnek larvadan iki pozitifle en düşük %6.7 olarak tespit edilmiştir (Cagnotti vd., 2023).

Kavak ve Koçak (2023) tarafından Batı Akdeniz Bölgesinde Antalya, Isparta, Muğla ve Burdur illerinden 11 lokasyondan *T. absoluta* larvalarında endosimbiont bakterilerden *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* taranmıştır. *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* bulunma oranları sırasıyla %76.3, %78.1 ve %90.9 olarak belirlenmiştir. *Rickettsia* ve *Spiroplasma*'nın *T. absoluta* için dünyada ilk kayıt olduğu tespit edilmiştir. *Wolbachia*'nın, denize yakın iller olan Antalya ve Muğla illerinde Isparta ve Burdur illerine göre daha yüksek enfeksiyon olduğu vurgulanmıştır.

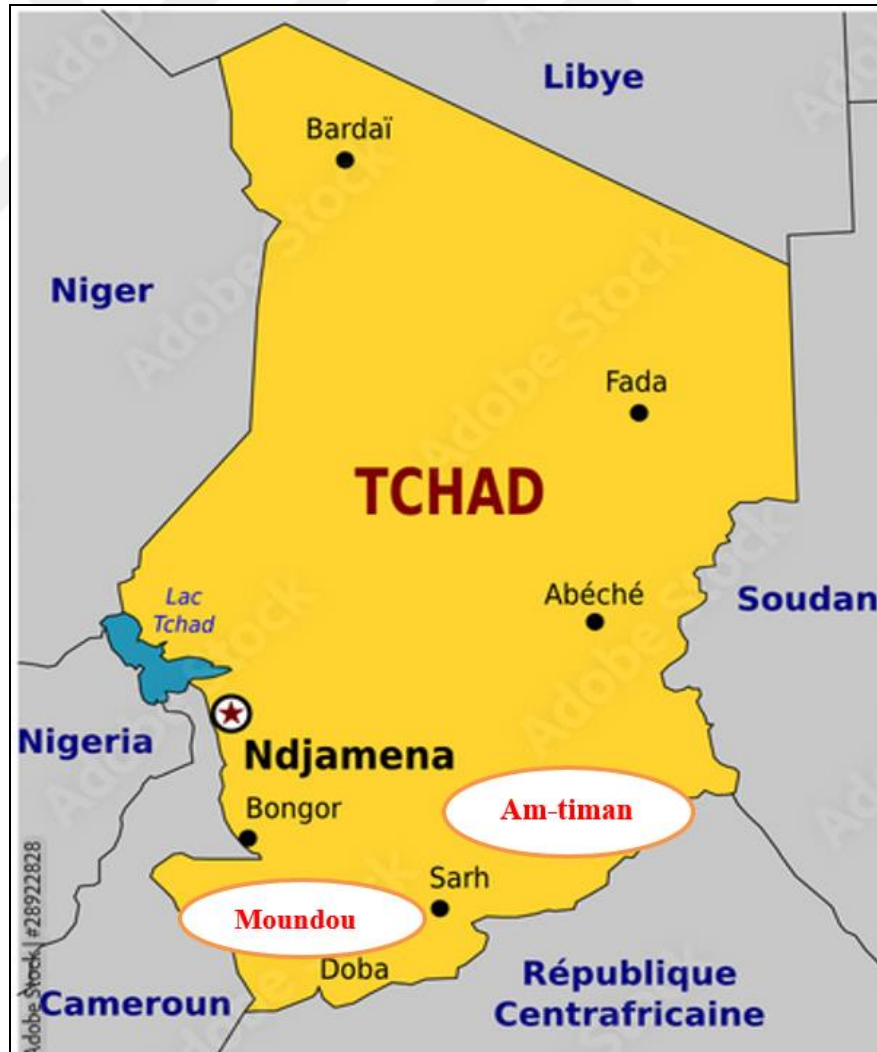


3. MATERYAL VE YÖNTEM

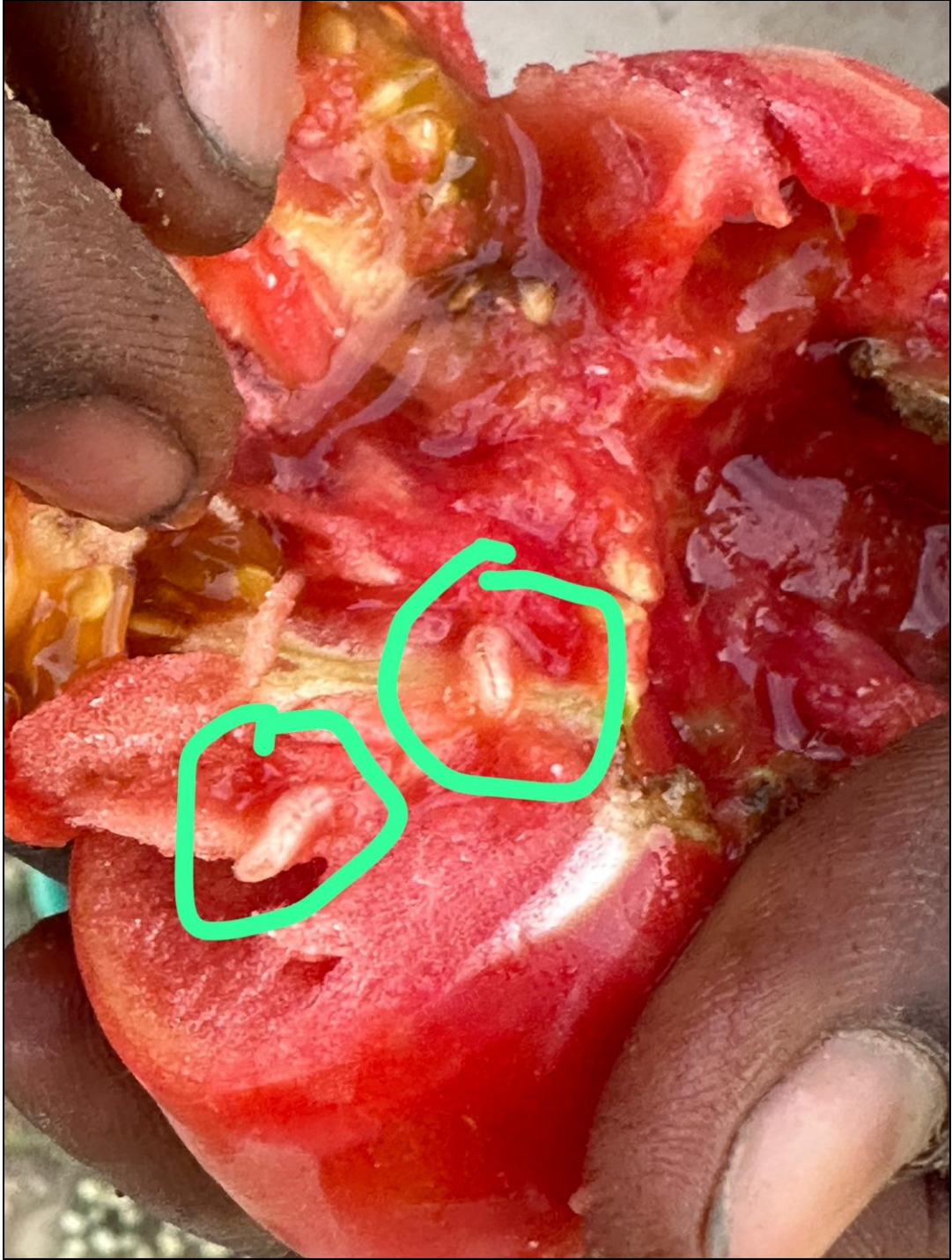
3.1. Böcek Örneklerinin Toplanması

Domates güvesi larvaları Çad'da 2023 yılı Şubat - Mart aylarında Moudou ve Am-timan bölgelerindeki (Şekil 3.1) domates tarlalarından toplandıktan sonra (Şekil 3.2) içerisinde %96 etanol bulunan ependorf tüplere alınarak muhafaza edilmişlerdir.

Toplanacak domates güvesi hedef sayısından az toplanmış olması nedenleri, ÇAD'da domates üretim kapasitesi düşük olması, eski yöntem insan el gücüyle üretimi devam ettirilmesi, ÇAD'in yarısından fazlası çöl bölge olması ve diğer bölgelerin saha gezimizde domates güvesi olmadığını tespit ettik, sadece Moundou ve Am-timan bölgesinden bulunmuştur ve laboratuvar çalışmamızda örnek kayıplarımız olmuştur.



Şekil 3.1. Çad'da *Tuta absoluta* popülasyonlarının toplandığı lokasyonlar



Şekil 3.2. Domates güvesi (*Tuta absoluta*) larvası ve zararı

3.2. Laboratuvar Çalışmaları

3.2.1. Dna ekstraksiyonu

- A) Alkolden alınan larvalar 5 ml ticari renksiz deterjan ve 1 gr tuz ve 5 ml saf su içeren karışımın içerisinde 56°C'de 30 dakika su banyosu inkübasyonuna tabi tutulmuştur.
- B) Karışımın içerisinde çıkarılan örnekler önce safsu ile yıkanmış ve ardından kurutma kâğıdında kurutulmuştur.
- C) Örnekler 1.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüpüne koyulacak ve yine steril olan ezme aparatları ile ezilmiştir.

Ezilen örnekler ticari kit protokolüne göre;

- 1) İçerisine 180 µl Digestion Solution eklenmiştir. Peşinden 25 µl Proteinaz K eklenip hemen vortekslenmiştir.
- 2) Daha sonra 60 dakika 56°C'de su banyosu inkübasyonuna tabi tutulmuştur. Takiben 20 µL RNase A Solution eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- 3) Ardından 200 µL Lysis Solution eklenerek karışımın homojenleşmesi için 15 saniye vortekslenmiştir.
- 4) Daha sonra 400 µL %50'lik ethanol eklenerek vortekslenmiştir.
- 5) Hazırlanan karışım mikropipet yardımıyla alınarak altında 2 ml'lik toplama tüpünde bulunan saflaştırma kolonuna (steril) aktarılmıştır.
- 6) İçerisine daha önceden %96 ethanol eklenmiş 500 µL Wash Buffer 1 eklenerek 8000g'de 1 dakika santrifüj edilip saflaştırma kolonuna alınarak toplama tüpündeki lizat atılmıştır.
- 7) İçerisine 500 µL Wash Buffer 2 (daha önceden %96 ethanol eklenmiş) ilave edilerek 12 000g'de üç dakika santrifüj edilmiş ve saflaştırma kolonu alınarak toplama tüpündeki lizat atılmıştır.
- 8) Saflaştırma kolonu tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiş ve hiçbir buffer eklenmeden 12 000g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- 9) Ardından toplama tüpü atılmış ve saflaştırma kolonu steril olan 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. Saflaştırma kolonunun filtresine yavaşça 50 µL Elution Buffer eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir.
- 10) İnkübasyonun ardından 8000g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.

11) Mikrosantrifüj tüpünde artık saf DNA bulunmaktadır. Kısa süreli muhafaza için +4°C’de veya uzun süreli muhafaza içinse -20°C’de muhafaza edilmiştir.

DNA’nın kalitesi için A (260/280) değerine bakılmaktadır. Saf bir DNA’da A (260/280) oranı 1.80 ile 2.00 arasında olmalıdır. Çünkü 1.8’in altında elde edilen A (260/280) değeri protein kontaminasyonunu, 2’nin üzerinde elde edilen A (260/280) değeri de RNA kontaminasyonunu işaret etmektedir. Ekstraksiyondan sonra elde edilen DNA’lar kalite ve miktar analizine (Nanodrop) tabii tutulmuş olup 1.7-1.9 değerleri belirlenmiştir. Bu değerlerin ana sebebi söz konusu böcek türünün oldukça küçük bir yapıda olmasıdır.

Çalışmada Moundou bölgesinden 10 larva Am-timan bölgesinden altı larva olmak üzere her bir larvanın DNA izolasyonu yapılmıştır.

3.2.2. Kademeli sıcaklık düşürme PCR (Touchdown PCR protokolü)

Bu teknik, standart PCR çalışmalarına çok benzemektedir. Bu PCR’da farklı olarak primer sıcaklıkları ilk önce çok yüksek tutularak primerlerin spesifik şekilde hedef diziye bağlanması amaçlanmaktadır. Primerin bağlanma sıcaklığı ilk önce 60°C tutulmakta ve her döngüde 1°C azaltılarak (10 döngü) 50°C’ye kadar düşürülmektedir. 50°C’den sonra ise derece standart olan 55°C’ye gerilip 25 döngü yapılarak PCR tamamlanmaktadır. Bu PCR tekniği, DNA dizileri üzerindeki belirli bir bölgenin spesifik olarak tespit edilmesinde kullanılmaktadır (Don vd., 1991).

Şekil 3.3’te çalışmanın yapıldığı cihaz görülmektedir.



Şekil 3.3. PCR cihazı

Literatür taraması sonucunda en yaygın görülen endosimbiyont bakterilerinin *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* primer dizileri incelenip uygun olan primerler HPLC saflıkta sentezletirilmiştir. HPLC saflıkta kurutulmuş olarak gönderilen primerler 100 μ M stok haline getirilmek için belirtilen miktarda (508-675 μ L) nuclease-free water ile çözdürülmüştür. Çözdürülen primerler -20°C’de muhafazaya alınmıştır. PCR uygulaması için ticari kit’in malzemeleri ve protokolü kullanılmıştır.

Bromophenol Blue (6x) hazırlanışı; 10mM Tris-HCl (pH 7.6), %0.03 Bromophenol Blue, %0.03 Xylene cyanol FF, %60 Glycerol, 60mM EDTA tartılıp ısıtmalı inkübatörde çözdürülmüştür. PCR işleminden sonra örneklerin bulunduğu her PCR

tüpüne 5 µl 5x bromophenol blue (Yürütme Boyası) ilave edildikten sonra mikropipetler ile karışması sağlanmıştır.

Çizelge 3.1. Touchdown PCR analizi için protokol

Touchdown PCR Analizi
Initial Denaturation: 94°C 3dk
Denaturation 94°C 1dk
Annealing 60°C 1dk (11x: -1°C) (60°C-50°C)
Extension 72°C 1 dk
11x
Denaturation 94°C 1dk
Annealing 55°C 1dk
Extension 72°C 1 dk
25x
Final Extension 72°C 10 dk
4°C ∞

Çizelge 3.2. *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* hakkında temel bilgiler

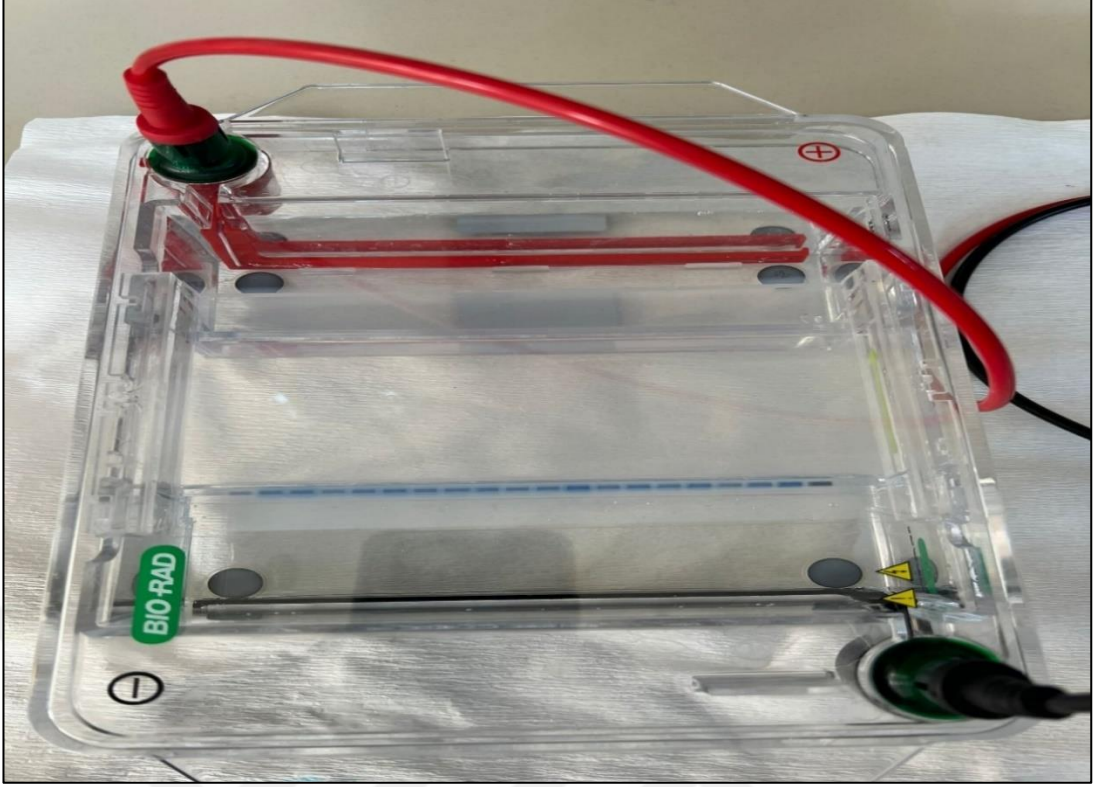
Bakteri suşları	Primerler
<i>Wolbachia</i> F; Tm:58°C	5'TGGTCCAATAAGTGAAGAACTAGCTA-3'
<i>Wolbachia</i> R; Tm:59°C	5'-AAAAATTAACGCTACTCCAGCTTCTGCAC-3'
<i>Rickettsia</i> F; Tm:51°C	5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'
<i>Rickettsia</i> R; Tm:52°C	5'-CATCCATCAGCGATAAATCTTTC-3'
<i>Spiroplasma</i> F; Tm:51°C	5'-GCGCAGACGGTTTAACAAG-3'
<i>Spiroplasma</i> R; Tm:53°C	5'-TCCGCCACTGGTGTTTCCTC-3'

Çizelge 3.3. PCR protokolü

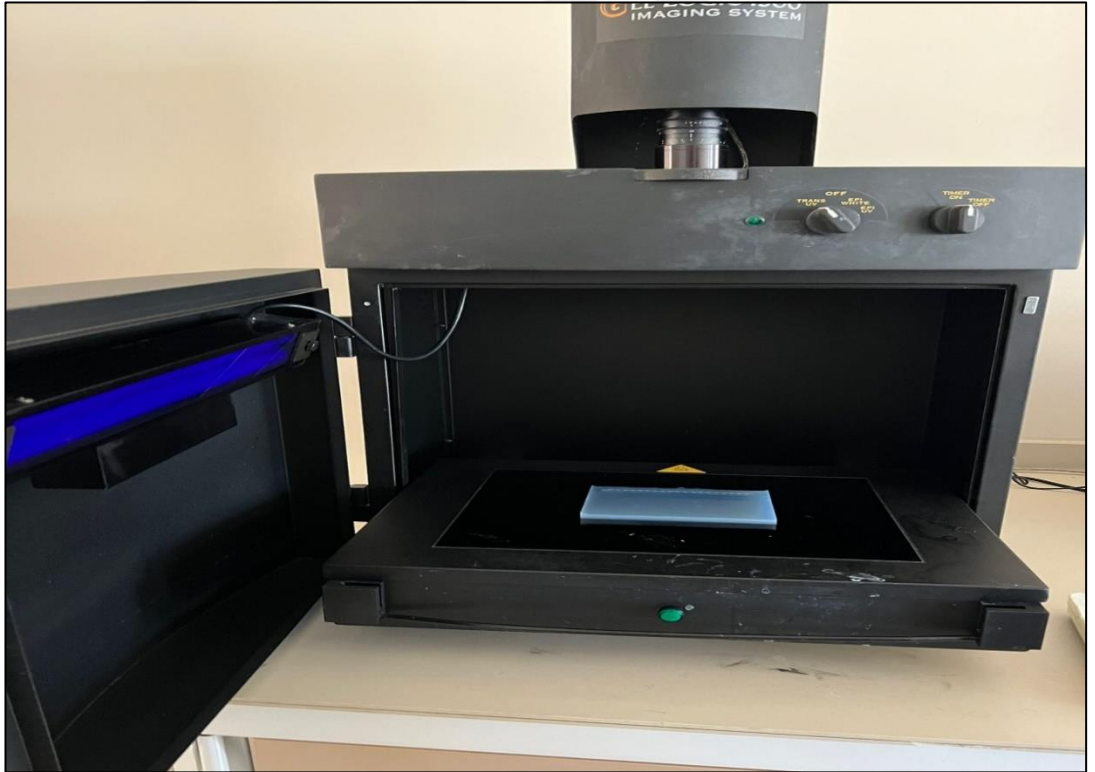
5 µl Taq PCR Master Mix (2.5 units Taq DNA Polymerase, 1x PCR Buffer, 200 µM of each dNTP, 1.5mM MgCl ₂)
5 µl 10x Primer Mix (2 µM of each primer) (2.5 µl F- 2.5 µl R)
15 µl RNase-free water
5 µl Template DNA
Son hacim; 50 µl

3.2.3. Jel elektroforezi protokolü

- 1) 10x TBE tamponu hazırlanışı; Tris 54 gr, Borik asit 27.5 gr, EDTA 7.5 gr. Tartılan kimyasallar deiyonize saf suda çözdürülmüş ve pH 8.3'e ayarlanmış olup, son hacmi 1 litreye tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.
- 2) Agaroz jel hazırlanışı; 10 ml TBE+90ml saf su eklenmiştir. %1.5 gr Agaroz eklenmiştir. Çözündükten 5 dk sonra 3 µl etidyum bromür eklenerek karıştırılmıştır. Etidyum bromür eklendikten 5 dk sonra ise tarağı takılı ve etrafı kapatılmış olan jel, kabarcık oluşturmada yavaş bir şekilde tanka dökülmüştür. Jel, tankın içinde donana kadar (20 dk) bekletilmiştir. Jel tamamen donduktan sonra önce tarak çıkartılmış ardından tankın etrafındaki bantlar çıkartılarak elektroforez cihazına yerleştirilmiştir.
- 3) 70 ml TBE + 630 ml Saf su eklenmiş olan jel solüsyonu elektroforez cihazında jelin üstünü kaplayacak seviyeye gelinceye kadar yavaşça ilave edilmiştir.
- 4) Moundou popülasyondan 10 birey, Am-timan popülasyondan altı birey, pozitif kontrol için üç ve ledder için bir birey taraması yapıldığı için toplam 20 kuyucuk gerekli olmuştur. Çalışmada 20 kuyucuk oluşturan bir tarak kullanılmış, her birinde bir popülasyon ve bir endosimbiyont çalışılmıştır. Sağ'dan ledder ve sol'dan uçlarda bulunan üç kuyucuklara ise pozitif kontrol yüklenerek arada kalan kuyucuktan 10 Moundou 6 Am-timan olmak üzere toplam 16 bireyi üç farklı tür bakteri tarafından analizi için kullanılmıştır.
- 5) PCR'dan çıkan örneklerin son hacmi 50 µl'dir. PCR'dan çıkan 50 µl örnekten her bir birey için 2.5 µl alınıp 2.5 µl Bromophenol Blue ile karıştırıp elde edilen 5 µl örnek kuyucuklara yüklenmiştir. Sağ uçlarda bulunan 1 kuyucuğa 2 µl markör yüklemesi yapılmıştır. Arada kalan 19 kuyucuğun her birine elde edilen 5µl ürünü yüklenmiştir. *Wolbachia* 90 Volt, 150 mA'de 60 dakika boyunca, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* için ise 60 Volt, 100 mA ve 40 dakika jel elektroforezi cihazında koşurma işlemi yapılmıştır.
- 8) Jel elektroforezi biten popülasyonlar UV kabin kullanılarak görüntülenmiştir.



Şekil 3.4. Jel elektroforezi yükleme ve görüntüleme



Şekil 3.5. UV jel görüntüleme kabini

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Orta Afrika ülkesi Çad'da iki bölgeden elde edilen *T. absoluta* larvalarının endosimbiont (*Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma*) taramasına tabi tutulması sonucu elde edilen veriler Çizelge 4.1'de görülmektedir. Moundou bölgesine baktığımızda bireylerde *Wolbachia* ve *Spiroplasma* sadece M1'de negatif olup *Rickettsia* ise tüm bireylerde pozitifdir. Am-timan bölgesindekilere baktığımızda *Wolbachia* A2 bireyinde negatif olup *Spiroplasma* ve *Rickettsia* ise tüm bireylerde pozitif çıkmıştır.

Çizelge 4.1. Popülasyonlardaki bireylerin endosimbiontlarla bulaşma durumları

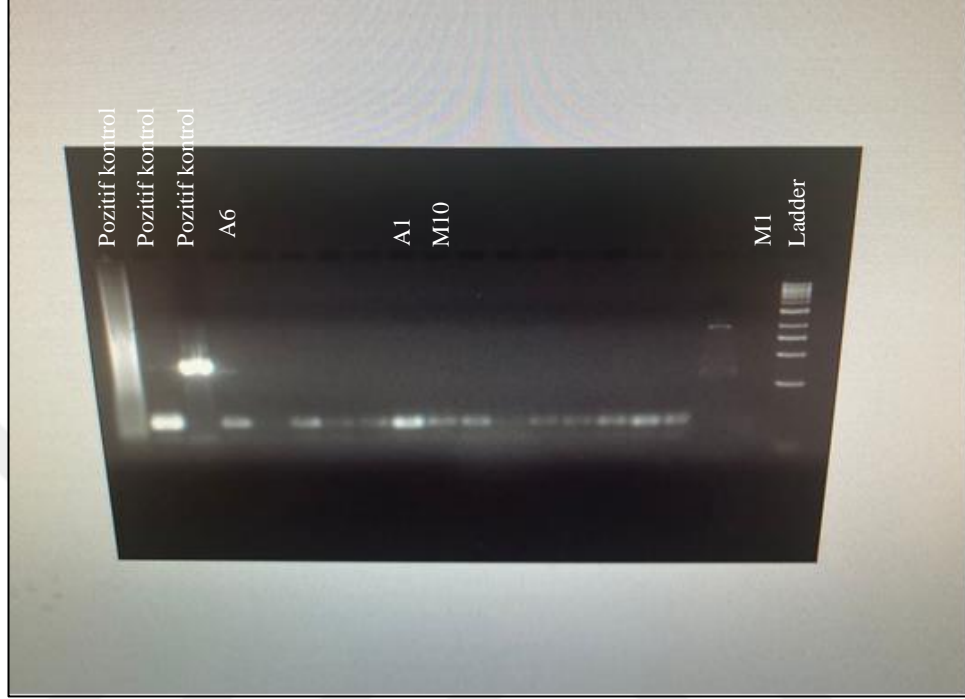
Popülasyonlar	Endosimbiontlar	Larvalar									
		M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆	M ₇	M ₈	M ₉	M ₁₀
Moundou (M1)	<i>Wolbachia</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Rickettsia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Spiroplasma</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Am-timan (A)		A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆				
	<i>Wolbachia</i>	+	-	+	+	+	+				
	<i>Rickettsia</i>	+	+	+	+	+	+				
	<i>Spiroplasma</i>	+	+	+	+	+	+				

Moundou ve Am-timan bölgelerinde *Wolbachia*'nın bulunma oranları sırasıyla %90 ve %90; *Rickettsia* %100 ve %100; *Spiroplasma* ise %90 ve %100 olarak belirlenmiştir. Bu oranlar toplamda *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* için sırasıyla ortalama %87.5, %100 ve %93.75 olmuştur (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Popülasyonlardaki endosimbiont sayıları ve bulunma oranları

Popülasyonlar	Endosimbiontlar		
	<i>Wolbachia</i>	<i>Rickettsia</i>	<i>Spiroplasma</i>
Moundou	10	10	10
Toplam	9 (%90)	10 (%100)	9 (%90)
Am-timan	6	6	6
Toplam	5(%83.3)	6 (%100)	6 (%100)
Toplam pozitif sayısı ve Oranı %	14 (%87.5)	16 (%100)	15 (93.75)

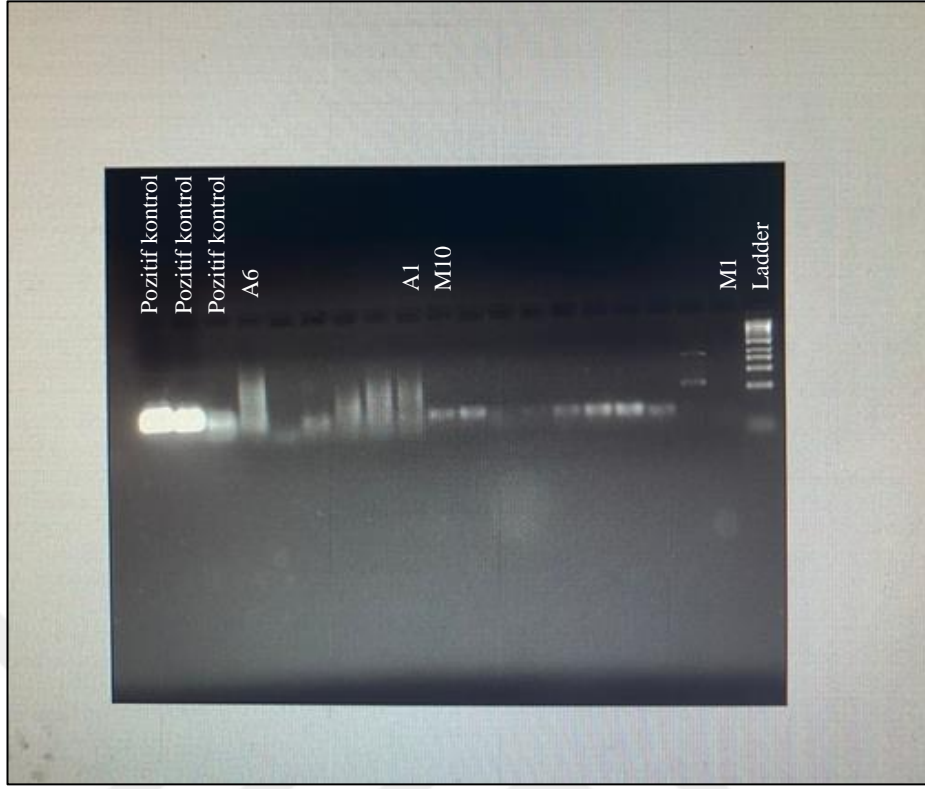
Çalışmada PCR sonucu primer ile yapılan elektroforez çalışması sonucu bölgelere göre domates güvesindeki simbiyontların bulunma durumları *Wolbachia* için Şekil 4.1’de, *Spiroplasma* için Şekil 4.2’de ve *Rickettsia* için ise Şekil 4.3’te verilmiştir.



Şekil 4.1. İki farklı popülasyondan elde edilen *Wolbachia* görüntüleri



Şekil 4.2. İki farklı popülasyondan elde edilen *Rickettsia* görüntüleri



Şekil 4.3. İki farklı popülasyondan elde edilen *Spiroplasma* görüntüleri

Bu çalışmada *Wolbachia*'nın Moundou (Merkezinde) ve Am-timan (Merkezine) aynı derecede enfeksiyon oranına sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Hırvatistan ve Karadağ'da enfeksiyon oranları %70-100 arasında değişirken (Škaljac vd., 2012) çalışmamızda %87.5 olarak bulunan *Wolbachia* enfeksiyon oranına paralellik göstermiştir.

Türkiye'de, Batı Akdeniz Bölgesinden Antalya, Isparta, Muğla ve Burdur illerinde 11 lokasyondan toplam 55 adet Domates güvesi *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) bireylerinde *Wolbachia*'nın, denize yakın yer alan Antalya ve Muğla illerinde Isparta ve Burdur illerine göre daha yüksek enfeksiyon oranlarında olduğunu tespit edilmiştir. *T. absoluta*'da endosimbiontlardan *Spiroplasma* ve *Rickettsia* ilk olarak bu çalışma ile saptanmıştır. Bu çalışmada, farklı domates güvesi popülasyonlarında *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* bulunma oranları sırasıyla %76.3, %78.1 ve %90.9 oranlarında yüksek ölçüde kontamine olduğu görülmüştür (Kavak ve Koçak, 2023). Bizim çalışmamızda da bu çalışmaya paralel olarak tüm endosimbiontlar belirlenmiştir. Ayrıca, bulunma oranlarının yüksekliği de *Wolbachia*,

Rickettsia ve *Spiroplasma* için sırasıyla %87.5, %100 ve %93.75 oranlarıyla benzerlik göstermektedir.

Türkiye, İran ve Azerbaycan'ının batısından toplanan örnekler üzerinden yapılan çalışmada, *T. absoluta* popülasyonlarında *Arsenophonus*, *Cardinium*, *Hamiltonella*, *Pantoea*, *Spiroplasma* ve *Wolbachia* enfeksiyonuna bakıldığında, *Wolbachia* ve *Pantoea*'nın %100 oranında bulaşı gösterdiğini ancak diğer simbiyotların belirlenmediği bildirilmiştir. *Wolbachia* ve *Pantoea* enfeksiyonlarının yüksek oranlarda bulunmasına sahip *T. absoluta* popülasyonları arasında yüksek genetik homojenlik bulguları, her iki bakteriyel enfeksiyonun da mtDNA varyasyonları üzerinde daha az etkiye sahip olduğunu ima ediyor gibi görünmektedir (Mehrkhov vd., 2021).

Brezilya'da yapılan çalışmada *Wolbachia* suşları ile tutarlı olarak değerlendirilen domates güvesinin Brezilya popülasyonlarında partenogenez kanıtı elde edilmemiştir. Brezilya domates güvesinde tespit edilen iki *Wolbachia* suşu, partenogenez ile değil, sitoplazmik uyumsuzluk ile ilişkilidir (Carvalho vd., 2018).

Arjantin'de *T. absoluta*'nın endosimbiyotlarından sadece *Wolbachia* 3-55% aralığında tespit edilmişken diğer simbiyotlar *Spiroplasma* ve *Rickettsia* tespit edilmemiştir. Tüm popülasyonlarında çiftleşmemiş dişilerin fekonditesinin, çiftleşmiş dişilerin fekonditesinden önemli ölçüde düşük olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, çiftleşmemiş dişilerin bıraktığı yumurtalarda açılma olmamıştır. Sonuç olarak, temsili coğrafi popülasyonlardan *T. absoluta*'da partenogenesis bulunmaması, Arjantin'de bu zararlıya karşı etkili kontrol stratejileri olarak uygulanmasını ve çiftleşmenin engellenmesini desteklemektedir (Cagnotti vd., 2023).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Domates güvesi mikrobiyotasının karakterizasyonunun yanı sıra simbiyotik kompozisyonu etkileyen faktörler ve simbiyotik bakterilerin konukçu üzerindeki beslenme, fizyoloji ve davranış gibi etkileri, bu istilacı zararlı için alternatif mücadele stratejileri geliştirmede önemli olmaktadır (Mehrkhoul vd., 2021).

Zararlılarla mücadelede çevreye duyarlı ve daha etkin yeni mücadele yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Böcek endosimbiontlarının zararlı böceklerle mücadelede kullanım olanakları yapılan çalışmalarla olası hale gelmektedir. Tarım ürünlerine zarar veren *T. absoluta*'nın endosimbiontları ile kurduğu ilişkinin tam olarak aydınlatılması önemlidir.

Endosimbiontlardan *Rickettsia*'nın *Bemisia tabaci*'de sıcaklığa tolerans göstermede rol aldıkları bildirilmektedir (Brumin vd., 2011). Çad'da *Rickettsia*'nın domates güvesi popülasyonlarında %100 oranında belirlenmesi sıcaklığa toleransta rol oynayabileceğine işaret etmektedir diyebiliriz.

Özetlemek gerekirse; Çad'da *T. absoluta* popülasyonları arasında ciddi bir bakteri yoğunluğu bulunmaktadır. Böcek endosimbiontlarının zararlı mücadelesinde parthenogenesis açısından kullanım olanaklarını arttırması beklenmektedir. Tarımsal ürünlerde zararlı olan *T. absoluta*'nın endosimbiontları ile kurdukları ilişkinin tam olarak aydınlatılması büyük önem arz etmektedir. Çünkü zararlı ile mücadelede yeni çevreye duyarlı ve daha etkili mücadele yöntemleri gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbes, K., & Chermiti, B. (2014). Propensity of three Tunisian populations of the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) for deuterotokous parthenogenetic reproduction. *African Entomology*, 22(3), 538–544. <https://doi.org/10.4001/003.022.0301>
- Ahmed, M.Z., Araujo-Jnr, E.V., Welch, J.J., & Kawahara, A.Y. (2015). *Wolbachia* in butterflies and moths: geographic structure in infection frequency. *Frontiers in Zoology*, 12(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s12983-015-0107-z>
- Ahmed, M.Z., Breinholt, J.W., & Kawahara, A.Y. (2016). Evidence for common horizontal transmission of *Wolbachia* among butterflies and moths. *BMC Evolutionary Biology*, 16(1), 1-16.
- Anderson, C.L., & Karr, T.L. (2001). *Wolbachia*: evolutionary novelty in *Rickettsial* bacteria. *BMC Evolutionary Biology*, 1(10), 1-6.
- Badaoui, M.I., & Berkani, A. (2011). Morphologie et comparaison des appareils génitaux de deux espèces invasives *Tuta absoluta* Meyrick 1917 et *Phthorimaea operculella* Zeller 1873 (Lepidoptera : Gelechiidae). *Entomology Faun*, 63, 191-194.
- Bailly-Bechet, M., Martins-Simoes, P., Szollosi, G.J., Mialdea, G., Sagot, M.F., & Charlat, S. (2017). How long does *Wolbachia* remain on board? *Molecular Biology and Evolution*, 34(5), 1183-1193.
- Baldo, L, Hotopp, J.C.D., Jolley, K.A., Bordenstein, S.R., Biber, S.A., Choudhury, R. R., Hayashi, C., Maiden, M.C.J., Tettelin, H., & Werren, J. H. (2006). Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied Environmental Microbiology*, 72, 7098-110.
- Bandi, C, Dunn, A.M, Hurst, G.D., & Rigaud, T. (2001). Inherited microorganisms, sex-specific virulence and reproductive parasitism. *Trends in Parasitology*, 17(2), 88–94. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(00\)01812-2](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(00)01812-2)
- Biondi, A., Guedes, R.N.C., Wan, F., & Desneux, N., (2018). Ecology, worldwide spread, and management of the invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*: past, present, and future. *Annual Review of Entomology*, 63, 239-258. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-034933>
- Blanca, J., Cañizares, J., Cordero, L., Pascual, L., Diez, M.J., & Nuez, F. (2012). Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PLoS One*, 7(10), 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048198>
- Body, M., Kaiser, W., Dubreuil, G., Casas, J., & Giron, D. (2013). Leaf-miners co-opt microorganisms to enhance their nutritional environment. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 969-977. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0307-y>

- Bordenstein, S.R., O'Hara, F.P., & Werren, J.H. (2001). *Wolbachia* -induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. *Nature*, 409(6821), 707-710. <https://doi.org/10.1038/35055543>
- Bourtzis, K. (2008). *Wolbachia*-based technologies for insect pest population control. In *Transgenesis and the Management of Vector-Borne Disease*. (pp. 104-113)
- Brumin, M., Kontsedalov, S., & Ghanim, M. (2011). Rickettsia influences thermotolerance in the whitefly *Bemisia tabaci* B biotype. *Insect Science*, 18(1), 57-66.
- Cagnotti, C., Conte, C., Kramar, J., Lanzavecchia, S., & López, S. (2023). Molecular detection of reproductive symbionts and parthenogenesis experiments in *Tuta absoluta* from Argentina: facing potential for sustainable and specific pest control strategies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 171(9), 681-690.
- Caparros-Megido, R., Haubruge, E., & Verheggen, F.J. (2013). Pheromone-based management strategies to control the tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 17(3), 475-482.
- Carvalho, G.A., Corrêa, A.S., Oliveria, L.O., Chediak, M., Siqueira, H.A.A., & Guedes, R.N.C. (2018). *Wolbachia* strains, and lack of genetic diversity and parthenogenesis in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Applied Entomology*, 142, 905-910.
- Charlat, S., Hornett, E.A., Fullard, J.H., Davies, N., Roderick, G.K., Wedell, N., & Hurst, G.D. (2007). Extraordinary flux in sex ratio. *Science*, 317(5835), 214-214. <https://doi.org/10.1126/science.1143369>
- Chen, S.J., Lu, F., Cheng, J.A., Jiang, M.X., & Way, M.O. (2012). Identification and biological role of the endosymbionts *Wolbachia* in rice water weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*, 41(3), 469-477. <https://doi.org/10.1603/EN11195>
- Cherif, A., & Verheggen, F. (2019). A review of *Tuta absoluta* (Lepidoptera : Gelechiidae) host plants and heir impact on management strategies. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 23(4), 270-278.
- Cho, N.H., Kim, H.R., Lee, J.H., Kim, S.Y., Kim, J., Cha, S., & Kim, I.S. (2007). The *Orientia tsutsugamushi* genome reveals massive proliferation of conjugative type IV secretion system and host–cell interaction genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(19), 7981-7986. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611553104>
- Cocco, A., Deliperi, S., Lentini, A., Mannu, R., & Delrio, G. (2015). Seasonal phenology of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in protected and open-field crops under Mediterranean climatic conditions. *Phytoparasitica*, 43, 713-724.

- Crespo-Pérez, V., Régnière, J., Chuine, I., Rebaudo, F., & Dangles, O. (2014). Changes in the distribution of multispecies pest assemblages affect levels of crop damage in warming tropical Andes. *Global Change Biology*, *21*(1), 82-96.
- Cuthbertson, A.G., Mathers, J.J., Blackburn, L.F., Korycinska, A., Luo, W., Jacobson, R.J., & Northing, P. (2013). Population development of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) under simulated UK glasshouse conditions. *Insects*, *4*(2), 185-197.
- Desneux, N., Wajnberg, E., Wyckhuys, K.A.G., Burgio, G., Arpaia, S., Narvaez-Vasquez, C.A., Gonzalez-Gabrera, J., Ruescas, D.C., Tabone, E., Frandon, J., Pizzol, J., Poncet, C., Cabello, T., & Urbaneja, A. (2010). Biological invasion of European tomato crops by *Tuta Absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *Journal of Pest Science*, *83*, 197-215.
- Duron, O., & Hurst, G.D. (2013). Arthropods and inherited bacteria: from counting the symbionts to understanding how symbionts count. *BMC Biology*, *11*(1), 45. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-45>
- Dyson, E.A., & Hurst, G.D. (2004). Persistence of an extreme sex-ratio bias in a natural population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(17), 6520-6523. <https://doi.org/10.1073/pnas.0304068101>
- Engelstädter, J., & Hurst, G.D. (2009). The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *40*, 127-149. doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.110308.1202.06.
- Erasmus, R., Berg, J.V.D., & Plessis, H.D. (2022). *Wolbachia* strains associated with *Tuta absoluta* in South Africa: lack of genetic diversity and parthenogenesis. *Entomologia Generalis*, *42*(5), 835-838.
- Estay, P. (2000). Polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick). Inf. *INIA La Platina*, *9*, 2-5.
- FAOSTAT (2021). Crops and livestock products. Food Agric. Organ. United Nations (FAO).
- Fernández, S., & Montagne, A. (1990). Preferencia de oviposición de las hembras y duración, crecimiento y sobrevivencia de las larvas de *Scrobipalpa absoluta* (Meyrick)(Lepidoptera: Gelechiidae) en diferentes solanáceas. *Boletín de Entomología Venezolana*, *5*(13), 100-106.
- Fukatsu, T., Tsuchida, T., Nikoh, N., & Koga, R., (2001). *Spiroplasma* symbiont of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(3), 1284-1291.
- Germain, J.F., Lacordaire, A.I., Cocquemot, C., Ramel, J.M., & Oudard, E. (2009). Un nouveau ravageur de la tomate en France: *Tuta absoluta*. *Phm-Revue Horticole*, *512*, 37-41.

- Glowska, E., Dragun-Damian, A., Dabert, M., & Gerth, M. (2015). New *Wolbachia* supergroups detected in quill mites (Acari: Syringophilidae). *Infection Genetics and Evolution*, *30*, 140–146.
- Grissa-Lebdi, K., Skander, M., Mhafdhi, M., & Belhadj, R. (2011). Lutte intégrée contre la mineuse de la tomate, *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) en Tunisie. *Entomologie Faunistique-Faunistic Entomology*, *63*, 125-132.
- Guedes, R.N.C., Roditakis, E., Campos, M.R., Haddi, K., Bielza, P., Siqueira, H.A.A., Tsagkarakou, A., Vontas, J., & Nauen, R. (2019). Insecticide resistance in the tomato pinworm *Tuta absoluta*: patterns, spread, mechanisms, management and outlook. *Journal of Pest Science*, *92*(4), 1329-1342.
- Gurung, K., Wertheim, B., & Falcao Salles, J. (2019). The microbiome of pest insects: it is not just bacteria. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *167*(3), 156-170. <https://doi.org/10.1111/eea.12768>
- Han, P., Desneux, N., Becker, C., Larbat, R., Le Bot, J., Adamowicz, S., Zhang, J., & Lavoit, A.V. (2019). Bottom - up effects of irrigation, fertilization and plant resistance on *Tuta absoluta*: implications for Integrated Pest Management. *Journal of Pest Science*, *92*, 1359-1370.
- Hammer, T.J., & Bower, M.D. (2015). Gut microbes may facilitate insect herbivory of chemically defended plants. *Oecologia*, *179*(1), 1-14. <https://doi.org/10.1007/004420015-3327-1>
- Hammer, T.J., Janzen, D.H., Hallwachs, W., Jaffe, S.P., & Fierer, N. (2017). Caterpillars lack a resident gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(36), 9641-9646.
- Hurst, G.D., & Jiggins, F.M. (2005). Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *272*(1572), 1525-1534. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3056>
- Jiggins, F.M. (2006). Adaptive evolution and recombination of *Rickettsia* antigens. *Journal of Molecular Evolution*, *62*(1), 99-110. <https://doi.org/10.1002/jevol.2005.005-0080-9>
- Jiggins, F.M., Hurst, G.D.D., Dolman, C.E., & Majerus, M.E.N. (2000a). Highprevalence male-killing *Wolbachia* in the butterfly *Acraea encedana*. *Journal of Evolutionary Biology*, *13*, 495–501. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2000.00180.x>.
- Jiggins, F.M., Hurst, G.D.D., Dolman, C.E., & Majerus, M.E.N. (2000b). High-prevalence male-killing *Wolbachia* in the butterfly *Acraea encedana*. *Journal of Evolutionary Biology*, *13*(3), 495–501. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2000.00180.x>.

- Jiggins, F.M., Hurst, G.D., & Majerus, M.E. (1998). Sex ratio distortion in *Acraea encedon* (Lepidoptera: Nymphalidae) is caused by a male-killing bacterium. *Heredity*, 81(1), 87–91. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.1998.00357.x>
- Kaiser, W., Huguet, E., Casas, J., Commin, C., & Giron, D. (2010). Plant greenisland phenotype induced by leaf-miners is mediated by bacterial symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1692), 2311–2319. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0214>
- Kavak, M., & Koçak, E. (2023). Batı akdeniz bölgesi domates güvesi *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) popülasyonlarında endosimbiyont bakteri türlerinin belirlenmesi. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18(1), 1-4. <https://doi.org/10.54975/isubuzfd.1149112>
- Kontsedalov, S., Fein, E.Z., Chiel, E., Gottlieb, Y., Inbar, M., & Ghanim, M. (2008). The presence of *Rickettsia* is associated with increased susceptibility of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides. *Pest Management Science*, 64(8), 789-792. <https://doi.org/10.1002/ps.1595>
- Koudjil, M., Boukabcha, F., & Harichane, H. (2015). Perte en rendement et déprédation par la mineuse, *Tuta absoluta* (Lepidoptera, Gelechiidae) sur la culture de tomate, dans la wilaya de Chlef (Algérie). *Nature & Technology*, 12, 73-85.
- Lee, M.S., Albajes, R., & Eizaguirre, M. (2014). Mating behaviour of female *Tuta absoluta* (Lepidoptera : Gelechiidae): polyandry increases reproductive output mating behaviour of female *Tuta absoluta* (Lepidoptera : Gelechiidae): polyandry increases reproductive output. *Journal of Pest Science*, 87, 429-439.
- Li, Q., Fan, J., Sun, J.X., Wang, M.Q., & Chen, J.L. (2018). Effect of the secondary symbiont *Hamiltonella defensa* on fitness and relative abundance of *Buchnera aphidicola* of wheat aphid, *Sitobion miscanthi*. *Frontiers in Microbiol*, 9, 582. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00582>
- Liu, X.D., & Guo, H.F. (2019). Importance of endosymbionts *Wolbachia* and *Rickettsia* in insect resistance development. *Current Opinion in Insect Science*, 33, 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.05.003>
- Mansour, R., Brévault, T., Chailleux, A., Cherif, A., Grissa-Lebdi, K., Haddi, K., Mohamed, S.A., Nofemela, R.S., Oke, A., Sylla, S., Tonnang, H.E.Z., Zappalà, L., & Kenis, M. (2018). Occurrence, biology, natural enemies and management of *Tuta absoluta* in Africa. *Entomologia Generalis*, 38(2), 83-112.
- Martin, J., Chong, T., & Ferree, P. M. (2013). Male Killing *Spiroplasma* Preferentially Disrupts Neural Development in the *Drosophila melanogaster* embryo. *PLoS One*, 8(11), 1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079368>
- Mateos, M., Martínez Montoya, H., Lanzavecchia, S.B., Conte, C., Guillén, K., Morán-Aceves, B.M., & Tsiamis, G. (2020). *Wolbachia pipientis* associated

with tephritid fruit fly pests: from basic research to applications. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1080.

- Mehrkhou, F., Güz, N., Korkmaz, E., & Çağatay, N.S. (2021). Analysis of genetic variation in an important pest, *Tuta absoluta*, and its microbiota with a new bacterial endosymbiont. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, *45*(1), 111-123.
- Mitter, C., Davis, D.R., & Cummings, M.P. (2017). Phylogeny and evolution of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, *62*, 265-283.
- Moran, N.A., McCutcheon, J.P., & Nakabachi, A. (2008). Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual Review of Genetics*, *42*, 165-190. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130119>
- Moriyama, M., Nikoh, N., Hosokawa, T., & Fukatsu, T. (2015). Riboflavin provisioning underlies *Wolbachia*'s fitness contribution to its insect host. *MBio*, *6*(6), 10-1128.
- Muniappan, R. (2013). *Tuta absoluta*: the tomato leafminer. <http://www.coraf.org/documents/ateliers/2013-05/tuta-absoluta/Tuta-absoluta-Presentation.pdf> (Son erişim tarihi: 07 Eylül 2020)
- Naika, S., de Jeude, J., de Goffau, M., Hilmi, M., & van Dam, B. (2005). *Cultivation of Tomato: Production, Processing and Marketing*. Agromisa Foundation and CTA.
- Paladino, L.Z.C., Ferrari, M.E., Lauría, J.P., Cagnotti, C.L., Šíchová, J., & López, S.N., (2016). The effect of X-Rays on cytological traits of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Florida Entomologist*, *99*, 43–53.
- Paniagua Voirol, L.R., Frago, E., Kaltenpoth, M., Hilker, M., & Fatouros, N.E. (2018). Bacterial symbionts in Lepidoptera: their diversity, transmission, and impact on the host. *Frontier in Microbiology*, *9*, 556.
- Povolný, D. (1994). Gnorimoschemini of southern South America VI: Identification keys, checklist of Neotropical taxa and general considerations (Insecta, Lepidoptera, Gelechiidae). *Stenstrupia*, *20*, 1-42.
- Ramond, E., Maclachlan, C., Rosset, C.S., Knott, G.W., & Lemaitre, B. (2016). Cell division by longitudinal scission in the insect endosymbiont *Spiroplasma poulsonii*. *MBio*, *7*(4), 16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00881-16>
- Ranc, N. (2010). *Analyse du Polymorphisme de Gènes de Composantes de la Qualité des Fruits Dans les Sources Génétiques Sauvages et Cultivées de Tomate ; Recherche D'association Gènes/ QTL*. (Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier—SUPAGRO)

- Rouamba, A., Belem, J., Tarpaga, W.V., Otoïdobiga, L., Ouedraogo, L., Konaté, Y.A., & Kambou, G. (2013). Itinéraires Techniques de Production Des Tomates D'hivernage FBT. Fiche Technique, 4p.
- Russell, J.A., Goldman-Huertas, B., Moreau, C.S., Baldo, L., Stahlhut, J.K., Werren, J.H., & Pierce, N.E. (2009). Specialization and geographic isolation among *Wolbachia* symbionts from ants and lycaenid butterflies. *Evolution*, 63, 624–640. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00579.x>
- Rwomushana, I., Beale, T., Chipabika, G., Day, R., Gonzalez-Moreno, P., Lamontagne-Godwin, J., & Tambo, J. (2019). *Tomato Leafminer (Tuta absoluta): Impacts and Coping Strategies for Africa*. Publication of CABI.
- Santana, P.A., Kumar, L., Da Silva, R.S., & Picanço, M.C. (2019). Global geographic distribution of *Tuta absoluta* as affected by climate change. *Journal of Pest Science*, 92, 1373-1385.
- Sawadogo, M.W., Somda, I., Nacro, S., Legrève, A., & Verheggen, F.J. (2020). Insecticide susceptibility level and control failure likelihood estimation of Sub-Saharan African populations of tomato leafminer: Evidence from Burkina Faso. *Physiological Entomology*, 45(4), 147-153.
- Shokal, U., Yadav, S., Atri, J., Accetta, J., Kenney, E., Banks, K., Kataham, A., Jaenike, J., & Eleftherianos, L. (2016). Effects of co-occurring *Wolbachia* and *Spiroplasma* endosymbionts on the *Drosophila* immune response against insect pathogenic and non-pathogenic bacteria. *BMC Microbiology*, 16(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0634-6>.
- Silva, S.S. (2008). *Reproductive Biology Factors Influencing The Behavioral Management of Tuta Absoluta (Meyrick) (Lepidoptera : Gelechiidae)*. (Master Thesis, Universidade Federal Rural de Pernambuco)
- Siqueira, H., Guedes, R., Fragoso, D., & Magalhaes, L. (2001). Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *International Journal of Pest Management*, 47(4), 247-251. <https://doi.org/10.1080/09670870110044634>
- Škaljac, M, Kostanjšek, R., & Žanić, K. (2012). The presence of *Wolbachia* in *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) populations from coastal Croatia and Montenegro. *African Entomology*, 20, 191-194.
- Son, D., Bonzi, S., Somda, I., Bawin, T., Boukraa, S., Verheggen, F., Francis, F., Legreve, A., & Schiffers, B. (2017). First Record of *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera : Gelechiidae) in Burkina Faso. *African Entomology*, 25(1), 259-263.
- Spooner, D., Anderson, G., & Jansen, R. (1993). Chloroplast DNA evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes, and pepinos (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 80(6), 676-688.

- Sree, K.S., & Varma, A. (2015). *Biocontrol of Lepidopteran Pests*. Switzerland: Springer International Publishing.
- Stouthamer, R., Breeuwer, J.A.J., & Hurst, G.D.D. (1999). *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Review of Microbiology*, 53, 71-102.
- Torres-Vila, L.M., Rodríguez-Molina, M.C., Lacasa-Plasencia, A., Bielza-Lino, P., & Rodríguez-del-Rincón, Á. (2002). Pyrethroid resistance of *Helicoverpa armigera* in Spain: current status and agroecological perspective. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 93(1-3), 55-66.
- Tropea Garzia, G., Siscaro, G., Biondi, A., & Zappalà, L. (2012). *Tuta absoluta*, a South American pest of tomato now in the EPPO region: biology, distribution and damage. *EPPO Bulletin*, 42(2), 205-210.
- Uchoa-Fernandes, M.A., Della Lucia, T.M.C., & Vilela, E.F. (1995). Mating, oviposition and pupation of *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyr.) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil*, 24(1), 159-164.
- Urbaneja, A., Vercher, R., Navarro, V., Mari, G.F., & Porcuna, L.J. (2007). La polilla del tomate, "*Tuta absoluta*." *Phytoma España*, 194, 16-24.
- USDA-APHIS (2011). Federal import quarantine order for host materials of tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick). Washington, DC United States Department of Agriculture, 1-6.
- Verheggen, F., & Fontus, R.B. (2019). First record of *Tuta absoluta* in Haïti. *Entomologia Generalis*, 38(4), 349-353.
- Werren, J.H. (1997). Biology of *wolbachia*. *Annual Review of Entomology*, 42(1), 587-609. <https://doi.org/10.1146/annurec.ento.42.1.587>
- Werren, J., Baldo, L., & Clark, M. (2008). *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 741-751.
- Williams, K.P., Sobral, B.W., & Dickerman, A.W. (2007): A robust species tree for the Alphaproteobacteria. *Journal of Bacteriology* 189(13), 4578-4586. <https://doi.org/10.1128/JB.00269907>
- Zchori-Fein, E., & Perlman, S.J. (2004). Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. *Molecular Ecology*, 13(7), 2009–2016.
- Zhang, G.F., Ma, D., Wang, Y., Sheng, Y., Gao, Y., Liu, H., Xue, W., Zhang, R., Fu, W., Xian, J., Qing, X., Wang, J., Kuang, M., & Wan, F.H. (2020). First report of the South American tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick), in China. *Journal of Integrative Agriculture*, 19(7), 1912-1917.

Zhang, G.F., Liu, W.X., Guo, J.Y., Zhang, Y.B., & Wan, F.H. (2013). Species-specific COI primers for rapid identification of *Tuta absoluta* (Meyrick), a significant, potential alien species. *Journal of Biosafety*, 22(2), 80-85.

Zhou, W., Rousset, F., & O'Neil, S. (1998). Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proceedings of the Royal Society*, 265, 509-515.



ÖZGEÇMİŞ

