

ÖZET

ZARARLI BÖCEKLERLE MÜCADELE EDİLMESİ İÇİN KULLANILABİLEN FARKLI BAKULOVİRÜS TÜRLERİNİN GENOMLARINI İÇEREN VİRİYONLARI TIKAYAN VİRÜS OKLÜZYON KORLARININ ÜRETİMİ

5

Zararlı böceklerle mücadele etmek üzere kullanılabilen farklı bakulovirüs türlerinin genomlarını içeren viryonları tıkayan virüs oklüzyon korlarının üretimi. Farklı bakulovirüs türlerinin genomları eş zamanlı bir şekilde içeren, bakulovirüslerin karakteristiği olan yapısal ve morfolojik özelliklere sahip bir viral oklüzyon korunda (OB) tıkalı olan oklüzyon viryonları (ODVler) üretimine yönelik bir yöntem sunulmaktadır. Karşıklı genom ODV'leri ve OB'leri, iki veya ikiden fazla farklı bakulovirüs türleri kullanılarak böcek hücrelerini veya böcek konaklarını birlikte enfekte ederek üretilebilmektedir. Birlikte enfeksiyona, farklı bakulovirüslerin eş zamanlı nokülasyonu vasıtasıyla veya inokülasyonlar arasındaki bir süre aralığı ile ulaşabilmektedir, bu da üretilen ODV'lerde ve OB'lerde her bir türün genomlarının farklı branşları neden olmaktadır. Üretilen OB'ler, bir insektisidin doğrudan hazırlanmaya veya büyük miktarlarda karşıklı genom ODV'lerini ve OB'lerini üretmek üzere, ayrıca zararlı böceklerle mücadele etmek için faydalı olan duyarlı böcekleri enfekte etmeye yönelik olarak kullanılabilmektedir.

10

15

İSTEMLER

1. Aynı viryonda birlikte sarımlanan en az iki farklı bakulovirüs türünden genomlar içeren karşı virüs oklüzyon viryonları (ODV) üretimine yönelik ve/veya söz konusu karşı en az bir virüs oklüzyon viryonunun tıkanmış virüs oklüzyon korları üretimine yönelik bir yöntem olup, burada tüm enfekte edici bakulovirüsler, çoklu nükleopolihedrovirüstür ve burada virüs oklüzyon korları aşağıdakiler ile üretilmektedir:

- üretilen en az bir oklüzyon viryonunda birlikte sarımlanan bakulovirüs genomları ile bir böcek türünün larvaları veya kültür hücrelerinin birlikte enfekte edilmesi, burada belirli bir türe ait olan her bir bakulovirüs genomu, aynı veya birbirinden farklı bir ODV'de olabilmektedir;
- polihedroz dolayısıyla ölüme kadar enfekte larvaları yetiştirilmesi veya hücrelerin kültürlenmesi;
- ölümlerinden sonra larvalardan üretilen OB'lerin veya kültürlenmiş hücrelerin izole edilmesi;

burada hücreler veya larvalar, genomları, üretilen oklüzyon viryonlarından en az birinde sarımlanacak bakulovirüslerden herhangi biri ile enfeksiyona duyarlıdır

2. Aynı ODV'de dahil olan en az iki farklı genomun her birinin, bir enfektif bakulovirüs partikülüne neden olabilen, farklı bir genomu içeren bir ikinci bakulovirüs ile birlikte enfeksiyona ihtiyaç duymadan bir hücrede bir tam viral döngüyü üretebilen genomlar olduğu, İstem 1'e göre yöntem.

3. Önceki istemlerden herhangi birine göre yöntem olup, burada bakulovirüs genomları sağlanmaktadır veya nükleokapsidleri oluşturan böcek hücrelerine veya böcek larvaları inoküle edilmektedir, ve burada bakulovirüs genomları aşağıdakiler vasıtasıyla sarılmaktadır

- aşırı viryonları (BV'ler) oluşturulması veya
- ODV'lerin oluşturulması, burada ODV'ler, oklüzyon korlarında tıkanabilmektedir veya oklüzyon korlarında tıkanmayan serbest ODV'lerin oluşturulması

4. Bakulovirüs genomları, oklüzyon korlarında tıkanan ODV'leri oluşturarak sarıldığı

ve en az bir inoküle oklüzyon korunun, birden fazla türde genomun birlikte sarıldığı en az bir ODV'yi içerdiği, İstem 1 veya 3'e göre yöntem.

5. İstemler 1, 3 veya 4'ten herhangi birine göre yöntem olup, belirli bir türe ait bakulovirüs genomuna sahip nükleokapsidler, aşağıdaki şekilde böcek hücrelerine veya böcek larvalarına inoküle edilmektedir

a. en az bir oklüzyon viryonunda birinci olan ile sarılacak olan diğer bakulovirüs genomlarına sahip nükleokapsidlerle eş zamanlı olarak, veya

b. en az bir oklüzyon viryonunda birinci olan ile sarılacak olan diğer bakulovirüs genomlarına sahip nükleokapsidlere göre zamanla ayrı bir şekilde.

6. Belirli bir türde bakulovirüs genomuna sahip nükleokapsidlerin, farklı bir bakulovirüs türünün genomuna sahip birinci inoküle nükleokapsidlerine göre 48 saatten daha az bir süre aralığında böcek hücresi kültürüne veya böcek larvalarına inoküle edildiği, İstem 5'e göre yöntem.

7. İstemler 1 veya 3 ila 6'dan herhangi birine göre yöntem olup, burada nükleokapsidler, böcek larvalarına inoküle edilmektedir ve burada

i) nükleokapsidler, aşırı viryonlar (BV'ler) veya serbest ODV'lerin formundadır ve enjeksiyon ile böcek larvalarına inoküle edilmektedir, veya

ii) nükleokapsidler, böcek larvalarına oral olarak inoküle edilmektedir ve oklüzyon korlarında tıkanan ODV'leri oluşturarak sarılmaktadır

8. İstemler 1 ila 7'den herhangi birine göre karışık OB'lerin üretilmesine yönelik yöntem olup, aşağıdaki adımları içermektedir

a) eşzamanlı inokülasyon veya birinci enfeksiyonun belirtilerinin ortaya çıkması

için gerekli süreden daha az bir süre gecikmesi ile sıralı inokülasyon vasıtasıyla iki farklı bakulovirüs türü ile böcek larvalarını birlikte enfekte edilmesi, ve

b) polihedroz dolayısıyla belirgin hastalığa veya ölüme kadar gerekli koşullarda inoküle larvaların yetiştirilmesi.

9. Dördüncü dönem *Spodoptera exigua* larvalarında her iki bakulovirüsün birlikte

enfeksiyonu ve polihedroz dolayısıyla belirgin hastalığa veya ölüme kadar böceğin yetiştirilmesi **ile karakterize edilen**, *Spodoptera exigua* çoklu nükleopolihedrovirüsün (SeMNPV) bakulovirüs varyantı SeUS2-A'nın ve *Spodoptera frugiperda* çoklu nükleopolihedrovirüsün (SfMNPV) varyantı SfNIC-C'nin karşı OB'lerinin üretilmesine yönelik bir yöntem.

10. *Spodoptera frugiperda* larvalarında her iki bakulovirüslerin birlikte enfeksiyonu ve daha sonrasında polihedroz dolayısıyla ölüme kadar böceğin yetiştirilmesi **ile karakterize edilen**, *Autographa californica* çoklu nükleopolihedrovirüsün (AcMNPV) varyantı AcC6 ve *Spodoptera frugiperda* çoklu nükleopolihedrovirüsün (SfMNPV) varyantı SfNIC-B'nin karşı ODV'lerin ve karşı OB'lerin üretimine yönelik bir yöntem.

11. Nükleokapsidlerin, böcek larvalarına inoküle edildiği ve üretilen OB'lerin, suda ölü larvaların öğütülmesi, elde edilen süspansiyonun filtrelenmesi, OB'lerin süspansiyondan ayrılması ve sedimantasyon, santrifüjleme veya ilgili bir teknik ile çöktürülmesine olanak sağlanması veya neden olunması ve OB topaklarının süpernatanttan ayrılması vasıtasıyla izole edildiği, İstemler 1 ila 10'dan herhangi birine göre yöntem.

12. Nükleokapsidlerin, böcek larvalarına inoküle edildiği ve serbest, tıkalı olmayan ODV'lerin, üretilen izole OB'leri alkaline lizise tabi tutarak elde edildiği ek bir adım içeren, İstemler 1 ila 9'dan herhangi birine göre yöntem.

13. Aynı viryonda birlikte sarımlanan en az iki farklı bakulovirüs türünden genomları içeren, genomları, çoklu nükleopolihedrovirüslerin genomları olduğu, bir karşı virüs oklüzyon viryonu (ODV).

14. AcMNPV'nin varyantı AcC6'nın en az bir genom kopyası ve SfMNPV'nin varyantı SfNIC-B'nin en az bir genom kopyası içeren, İstem 13'e göre bir ODV.

15. İstem 13'e göre en az bir oklüzyon viryonunun tıkalı bir karşı virüs OB'si.

16. İstem 15'e göre karşı virüs OB'lerini ve/veya İstem 13 ila 14'ten herhangi birine göre ODV'leri içeren bir bileşim.

17. Ek olarak, her birinin, tek virüs türünden genomları içerdikleri OB'leri içeren, İstem 16'ya

göre bir bileşim.

- 18.** Zararlıböceklerin kontrolü için, İstem 15'e göre karşıvirüs OB'lerinin veya İstemler 16 veya 17'ye göre bir bileşimin kullanılması

5

- 19.** İki veya daha fazla zararlıböcek türünün eş zamanlımücadelesine yönelik, İstem 18'e göre kullanılması.

10

TARİFNAME

ZARARLI BÖCEKLERLE MÜCADELE EDİLMESİ İÇİN KULLANILABİLEN FARKLI BAKULOVİRÜS TÜRLERİNİN GENOMLARINI İÇEREN VİRİYONLARI TIKAYAN VİRÜS OKLÜZYON KORLARININ ÜRETİMİ

TEKNİK ALAN

Buluş, bakulovirüslerin belirli türlerine veya suşlarına duyarlı olan zararlı böceklerin istilalarını kontrol etmek üzere biyolojik insektisidlerin üretim ve kullanımı alanı ile ilgilidir. Daha belirgin olarak, buluş, aynı viryon içerisinde birlikte sarımsı olan en az iki farklı bakulovirüs türünden genomları içeren karışık virüs oklüzyon viryonları (ODV) üretimine yönelik ve/veya söz konusu en az bir karışık virüs oklüzyon viryonunun taşıdığı virüs oklüzyon korları (OB'ler) üretilmesine yönelik bir yöntemin yanı sıra, bu tarz ODV'ler ve OB'lerle, bunları içeren bileşimle ve zararlı böceklerle mücadele etmek üzere kullanılmaları ile ilgilidir.

ÖNCEKİ TEKNİK

Bakulovirüsler (Bakuloviridae familyası) tarım ve tıbbi veya veteriner öneme sahip böcekler dahil olmak üzere, çeşitli böcek türlerinin doğal popülasyonlarında önemli bir mortalite faktörünü temsil eden böcek patojenlerdir. Bakulovirüsler, dört cinsten birisine sınıflandırılmaktadır: Pulkanatlılar *alfabakulovirüs* (nükleopolihedrovirüsler [NPV]), *Betabakulovirüs* (Pulkanatlılar granulo virüsleri [GV]), *Gammabakulovirus* (Çiftkanatlılar NPV'leri) ve *Deltabaculovirus* (Zarkanatlılar NPV'leri). Belirli bakulovirüsler, patojenesiteleri (ölümcül doz metrikleri ile ölçüldüğü gibi), virülans (öldürme hızı) ve endüstriyel bir ölçekte biyolojik insektisidlerin temeli olarak gelişimlerine yol açan oklüzyon koru (OB) üretimi gibi böcek öldürücü özelliklere sahiptir. Bu ürünler, zararlı böceklerin kontrolünde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Moscardi 1999). Bir biyolojik insektisid olarak bir alfabakulovirüs kullanılarak zararlı böcek kontrolünün özellikle başarılı örnekleri, soyada *Anticarsia gemmatalis* kontrolünü (Moscardi 1999) veya pamukta *Helicoverpa armigera* kontrolünü (Sun & Peng, 2007) içermektedir.

Bakulovirüslerin bir diğer faydalı özelliği, yüksek biyo güvenlik seviyeleri ve transgen ekspresyon vektörleri olarak gelişimlerine yol açan *in vitro* sistemlerde hücre kültüründe özel genlerin oldukça yüksek ekspresyonudur (Summers and Smith, 1987; van Oers, 2011). Çoğu

bakulovirüs ekspresyon sistemi, *Autographa californica* MNPV kullanılarak dayanmaktadır (Rohrmann, 2008). Rekombinant bakulovirüsler (rBac) mevcut olarak insan dahil olmak üzere daha büyük hayvanlarla paylaşımlar dönüşüm sonrası protein modifikasyon sistemlerindeki avantajlarından dolayı böcek hücrelerinde yüzlerce ökaryotik proteinin üretimi için kullanılmaktadır (Miller ve diğ., 1997; Ahn ve diğ., 2008). rBac tarafından üretilen proteinler, insan aşılarda üretiminde (Harper ve diğ., 2009; Kantoff ve diğ., 2010; Madhan ve diğ., 2010), teşhis araçlarının geliştirilmesinde ve son zamanlarda potansiyel gen tedavi vektörleri olarak (Hitchman ve diğ., 2011; Kaikkonen ve diğ., 2011) bu virüslerin insektisidal özelliklerini geliştirmek için (Jiang ve diğ., 2008) işlevsel çalışmalarda (van Oers, 2011) kullanılmaktadır

Bakulovirüsler, böcek hücrelerinin çekirdeğinde çoğalan çift sarmal DNA virüsleridir. Dairesel genom, virüs türlerine bağlı olarak 80 ve 180 kbp arasında değişkenlik göstermektedir ve bir protein nükleokapsidde aşırı sarı hale getirmek ve yoğunlaştırılmaktadır (Rohrmann, 2008). Nükleokapsid (NC), düzenleme ve olgunlaşma esnasında bir harici membran edinmektedir, bu da bakulovirüslerin prensip bulaşıcı olarak varlığını oluşturan viryon formasyonuna neden olmaktadır (Şekil 1). Bakulovirüslerin biyolojik döngüsü, morfolojik olarak iki ve işlevsel olarak ayrı viryonları içermektedir: (1) böcek hemosöller enfekte hücrelerin membranlarından aşıl原因 ve enfekte böcekte enfeksiyona duyarlı dokularda ve organlarda diğer hücreleri enfekte etmek üzere dağıtılan aşırı viryonlar (BV), (2) oklüzyon türevi viryonlar (ODV), ortamda ODV'leri koruyan ve böcekte böceğe iletme olarak sağlayan oklüzyon korunu (OB) oluşturan bir proteinaköz matriste tutulmaktadır. Alfabakulovirüslerin OB'leri, polihedrin proteinini içermektedir ve genel olarak, düzinelerce ODV'leri tutulmaktadır. Bu virüsler, iki türden birine ayrılır (Şekil 1): (i) tek nükleokapsid nükleopolihidrovirüsleri (SNPV), her bir ODV içerisinde tek bir nükleokapsidi içermektedir veya (ii) çok sayıda nükleokapsid nükleopolihidrovirüsleri (MNPV), her bir ODV içerisinde bir veya birden fazla nükleokapsidi içerebilmektedir.

Bakulovirüsler, büyük çoğunluğunun Pulkanatlı olduğu artropod konaklarda sadece enfeksiyon üretebilmektedir. Omurgalılar, küfler veya bitkilerde bakulovirüslerin sindiriminden veya enjeksiyonundan sonra patojenik etkiler gözlemlenmemiştir. Bu şekilde, bakulovirüsler, hedef zararlı böceğin hariç tutulmasıyla insan sağlığı veya diğer hayvanların sağlığı için minimum risk içermesinden dolayı biyolojik kontrol maddelerinin geliştirilmesine yönelik olarak önemli derecede güvenli görülmektedir (Burges ve diğ., 1980; Leuschner ve diğ., 2010).

Bakulovirüs bazı insektisidlerin ticarileştirilmesine dair önemli bir durum, genel olarak tek bir veya bir kaç oldukça yakın ilişkili zararlı böcek türünü enfekte edebilen ve öldürebilen bu virüslerin yüksek konak özgüllüğüdür (Gröner, 1986). Sonuç olarak, iki veya ikiden fazla zararlı böceğin bir kompleksinin kontrol edileceği bitki koruma durumlarında, iki veya ikiden fazla farklı bakulovirüsün OB'lerini eş zamanlı olarak veya ayrı uygulamalarda uygulamak, değişmez bir şekilde zorunludur. Zararlı böceklerin çok sayıda türünün kontrolüne yönelik biyolojik kontrol maddelerin üretimi, neredeyse değişmez bir şekilde farklı böcek kolonilerinde çok sayıda bakulovirüs türünün üretimini içermektedir, her birisi kendi maliyetlerini içermektedir, böylelikle çok sayıda virüs türünü kullanan biyolojik kontrol, geniş spektrumlu bir sentetik insektisid kullanımla kıyasla kontrol maliyeti ile rekabet etmemektedir.

Bakulovirüs OB'leri de hem tek katmanlı kültürlerde hem de süspansiyon kültürlerinde hassas böcek hücrelerinin kültürlerinden elde edilebilmektedir. Bakulovirüsler, yabancı gen ekspresyon vektörleri olarak kullanılabilir, bu şekilde özellikle böcek hücre kültürlerinden, fakat ayrıca böcek larvalardan, nispeten kolay bir biçimde geniş miktarda rekombinant proteini elde edilmektedir (bakınız <http://www.pitt.edu/~super7/32011-33001/32731.ppt> linkinde veya Jarvis DL (2009) incelemesinde mevcut Yadav ve diğerlerine ait "Baculovirus expression system" adlı sunum).

Diğer virüslerden genlerin, konak böcek genomundan veya diğer organizmaların veya sentetik genlerin genomlarından eklenmesi, delesyonu veya ara değişimi ile bakulovirüslerin insektisidal özelliklerini modifiye etmek mümkündür (Inceoglu ve diğ., 2006).. Çalışmanın konusu, uzatılmış bir konak aralığında bakulovirüslerin geliştirilmesi olmuştur ve bazı durumlarda, virüsün, özel bir bakulovirüse doğal bir şekilde geçirgen olmayan konak türlerinde üretken bir enfeksiyonu elde edebilme kabiliyetini etkilemek için genetik modifikasyonu kullanılmıştır. Bir birinci adım olarak, *Autographa californica* MNPV'nin konak aralığı, ipek böceği kelebeği *Bombyx mori*ni içermek üzere helikaz geninin bölgesinde rekombinasyon yoluyla uzatılmıştır (Kondo and Maeda, 1991; Croizier ve diğ., 1992; Kamita and Maeda, 1996; Argaud ve diğ., 1998). Sonraki çalışmalar, bakulovirüslerde konak aralığını belirleyen genetik faktörleri incelemek üzere benzer yaklaşımlar kullanılmıştır (Watanabe ve diğ., 2010) Genel olarak, bu çalışmalar, konak aralığında dahil olan genlerin hali hazırda tanımlanmaması ve spesifik bir zararlı böceği içermek üzere konak aralığını uzatılmasına gerekli olan spesifik genetik modifikasyonlar belirsizliğini korumaktadır.

Bir bireysel böcek hücresi, bir virüsten daha fazlasıyla eş zamanlı olarak enfekte edilebilmektedir (Garzon and Kurstak, 1972; Arella ve diğ., 1983; Kanthong ve diğ., 2010). Bakulovirüslerde, biri sokak türü olmak üzere ve biri genetik olarak modifiye edilmiş olarak aynı virüs türlerinin iki genotipi ile böceklerin birlikte enfeksiyonu, ortamda modifiye edilmiş genotip olarak sağlanabilmektedir (Hamblin ve diğ. 1990). Bu sonraki durumda, aynı virüs türlerinin iki genotipi dahil edilmiştir. Çalışmanın yazarları, gerçekte sadece birlikte enfeksiyonu gösterilmiş olmasına rağmen, birlikte tıkanmanın meydana geldiğini göstermektedir.

- 10 Benzer bir yaklaşım, WO 88/02030 sayılı Patent Dokümanı ve Amerika Birleşik Devletleri 5071748 sayılı Patent Dokümanı ailesinde açıklanmıştır (Miller, 1991). Söz konusu dokümanlarda açıklanan buluş, en az iki genetik olarak ayrı bakulovirüsün nükleokapsidlerinin bir karışımını içeren bir polihedral inklüzyon koru (inklüzyon korunun (OB) bir eş anlamlı olan PIB) ile ilgilidir. PIB'lerin (mPIB) karışık bileşimi, enfekte böcek hücrelerinde polihedrin
- 15 üretimini yönlendiremeyen en az bir "rekobimnant" bakulovirüsün nükleokapsidlerini ve enfekte hücrelerde polihedrin üretimini yönlendirebilen bir sokak türü, mutant veya genetik olarak modifiye edilmiş virüs olabilen en az bir bakulovirüsün nükleokapsidlerini içermektedir. Prensipte olarak, buluş, farklı bakulovirüs türlerinin genotip kullanımıyla uyumlu olmasına rağmen, sağlanan tek örnek, *utographa californica*, AcMNPV'sini (bahsi geçen
- 20 dokümanlarda AcNPV olarak kısaltılmaktadır) enfekte eden nükleer polihedroz olan, aynı türün iki genotipini içeren böcek hücrelerinin enfeksiyonunu açıklamaktadır. Kullanılan virüslerden birisi, bir sokak türü virüstür ve diğeri, AcMNPV'nin L-1 varyantı olan bir rekombinant virüstür, burada polihedrin geni, bir cDNA kodlayıcı insan toku türü plazminojen aktivatörü ile değiştirilmektedir. WO 88/02030 sayılı Patent Dokümanının Örnek 2'sine göre,
- 25 elde edilen mPIB'ye sahip olan *Heliothis virescens* tıkanmanın enfeksiyonu, her iki AcMNPV genotipinin nükleokapsidlerini içeren yavru PIB'lere neden olmaktadır. Bu özel durumda, sokak türü virüs oranı orijinal orana göre artmıştır. Sokak türü virüsün kademeli artışı oranı sonraki mPIB yavrusu üzerinden seri geçiş yapıldıktan sonra bulunmaktadır. Açıklanan deneyler, elde edilen PIB'ler, her iki genotipin nükleokapsidlerinin, birlikte tıkanmadığı veya
- 30 birlikte tıkanmadığı viryonları içerip içermediğinden açıkça bahsetmemektedir; bu önemli durum doğrulanmamıştır.

Bu sebepten ötürü, temel olarak, Hamblin ve diğ. (1990) veya Miller (WO 88/02030) tarafından sunulan bilgi, kullanılan her iki genotipin mevcut olduğunu ve deneysel

35 inokülümde sağlandığını göstermektedir, fakat genotipler arasında fiziksel bir ilişkiye dair

bir kanı sunamamışlardır belirgin olarak bu iki genotip, tek bir OB'de (PIB) mevcut olmuştur veya bu her iki genotip, tek bir ODV'de mevcut olmamıştır

Diğer yazarlar (López-Ferber ve diğ., 2003), aynı türlerin farklı genotiplerinin tek bir viryonunda birlikte tıkanmış keşfetmiştir, fakat önceki durumlarda olduğu gibi en az bir genotip, sağlıklı için esas olan genlerden mahrum olan kusurlu bir genotip olmuştur. Bu şekilde, kusurlu genotip, tam virüs genotipi ile birlikte enfeksiyona ve replikasyonlarından ve iletimlerinden dolayı sonrakinin gen ürünlerinin kullanıma bağlı olmaktadır. Daha güncel olarak, bir virüs türünün farklı genotiplerinin, sonrasında bir OB'de (Clavijo ve diğ., 2009) tıkanmış olan bir ODV'de mevcut olabildiği gösterilmiştir, bir başka ifadeyle her birisinin ayrı bir genotipi içeren nükleokapsidler, bir karşı genotip ODV'sini oluşturmak üzere bir membranda birlikte sarılabilmektedir.

Bakulovirüslerinin iki türü ile tek bir böceğin birlikte enfeksiyonu, *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) ve *Spodoptera exigua* MNPV'sini (SeMNPV) (Yanase ve diğ., 1998) içeren deneylerde açıklanmıştır. Bu çalışmada, bu virüslerden birisinin kopyalanmadığı ve enfekte böcek içerisinde rekombinasyonların üretiminin gözlemlenmemesi ile sonuçlanmıştır. Benzer bir şekilde, hücre kültürü çalışmaları, bakulovirüslerin iki farklı türü ile birlikte enfeksiyonlar, prensip olarak hücreler için patolojik etkiler açısından bildirilmiştir ve her bir virüs dahil edilmiştir (McClintock & Dougherty 1987; Salem ve diğ., 2012).

Simón ve diğ. (2004) tarafından yapılan sonraki iş, belirli koşullar altında, nükleopolihedrovirüslerin iki farklı türünün (*S. exigua* MNPV ve *S. frugiperda* MNPV), tek başına inoküle olduğunda *S. exigua* MNPV'ye duyarlı olmayan *S. frugiperda* larvaları birlikte enfeksiyonuna olanak sağlamak üzere etkileşime geçebildiğini göstermiştir. Fakat, bu çalışmada, bu virüslerin, aynı hücrede eşzamanlı olarak kopyalanamadığı veya bu virüsler ile birlikte enfeksiyonun, karşı virüs ODV'lerine veya karşı virüs OB'lerin birlikte tıkanması neden olabildiğine dair kanı sunmamıştır

Bu şekilde, Yanase ve meslektaşları (Yanase ve diğ., 1998) tarafından bildirilen işler gibi önceki teknik, farklı türlere ait olan bakulovirüslerin, aynı böceği birlikte enfekte edebildiğini göstermektedir, fakat aynı OB'ye tıkanan her iki türün nükleokapsidlerini içeren karşı ODV'lerin üretimi için herhangi bir kanı sunulmamıştır. Fakat, özellikle birden fazla böcek türü mevcut olduğunda, ayrı insektisid uygulamaları önlemek için ve zararlı böceklerle mücadele etmek için, birden fazla farklı türü içeren bakulovirüslere dayalı, böceklerin

birden fazla türü vasetasyla veya aynı bakulovirüsün farklı genotiplerine değişken bir duyarlılık sergileyen böcekler vasetasyla istilaya duyarlı olan bitkiler için kullanılabilen insektisid bileşimlerinin hazırlanması faydalı olacaktır. Dahası, bu tarz bileşimler, bileşimlerin, geniş spektrumlu bir sentetik insektisid kullanımı ile ilişkili maliyetlerle rekabet edebilmesine olarak sağlayan bir yöntem kullanılarak üretilmelidir. Tercihen, üretim yöntemi, farklı böcek kolonilerinde bakulovirüslerin çok sayıda üretimini önlemelidir, her birisi kendi maliyetini içermektedir.

Mevcut buluş, bu probleme bir çözüm sağlamaktadır.

BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Mevcut buluş, mevcut uygulamada tarif edilen, iki filogenetik olarak yakından ilişkiye sahip çok sayıda nükleopolihedrovirüslerinin (örneğin, SeMNPV ve SfMNPV), ayrıca iki uzaktan ilişkili çok sayıda nükleopolihedrovirüslerinin (benzer bir şekilde, örneğin AcMNPV ve SfMNPV) birlikte enfekte olabildiğine ve her birisinin, özel bir böcek hücrede üretken bir enfeksiyonu ürettiğine dair bir bağlantı vardır. Bu, OB'lere tüklenen karşıt virüs ODV'lerine neden olmaktadır. Karşıt virüs OB'leri, uzatılmış bir konak aralığı fenotipine sahiptir ve tek bir OB inokülümünü kullanarak hedef zararlı böceklerle mücadele etmek üzere kullanılabilmektedir.

Bu sebepten ötürü, bir birinci yönünde, mevcut buluş, aynı viryonda birlikte sarılaban en az iki farklı bakulovirüs türlerinden genomu içeren karşıt virüs oklüzyon viryonlarından (ODV) üretimine yönelik ve/veya söz konusu karşıt virüs oklüzyon viryonlarından en az birisinin tükandığı virüs oklüzyon korlarından üretimine yönelik bir yöntemi ifade etmektedir, burada tüm enfekte edici bakulovirüsler, çok sayıda nükleopolihedrovirüsleridir. Tercihen, aynı ODV'de mevcut olan en az iki farklı genom, her birisinin bulaştıran bir bakulovirüs partikülüne neden olabildiği, farklı bir genomu içeren bir ikinci bakulovirüs ile birlikte enfeksiyona ihtiyaç olmadan, bir hücrede bir tam viral döngüyü üretebildiği genomlardır. Virüs oklüzyon korları (OB'ler), aşağıdakiler ile üretilmektedir:

- a. her bir bakulovirüs genomunun ait olduğu en az bir üretilen oklüzyon viryonunda birlikte sarılabacak olan bakulovirüs genomlarından içeren bir böcek türünün larvalarından veya kültür hücrelerinin birlikte enfekte edilmesi
- b. belirli bir türe, aynı veya birbirinden farklı bir ODV olabilmektedir;
- c. enfekte larvaların yetiştirilmesi veya polihedroz ile ölüme kadar hücrelerin

yetiştirilmesi;

d. ölümlerinden sonra larvalardan veya yetiştirilmiş hücrelerden üretilmiş OB'lerin izole edilmesi;

- 5 burada hücreler veya larvalar, genomlar¹¹, üretilmiş en az bir oklüzyon viryonunda birlikte sarı¹²lacağ¹³ bakulovirüslerden birisi ile enfeksiyona duyarlı¹⁴

Mevcut buluşun bir diğer yönü, aynı viryonda birlikte sarı¹⁵olan en az iki farklı bakulovirüs türünün genomlar¹⁶ıçeren bir karışık virüs oklüzyon viryonudur (ODV), burada genomlar, çok sayıda nükleopolihedrovirüsün genomudur: mevcut buluşun bir ODV'si.

Benzer bir şekilde, aynı viryonda birlikte sarı¹⁷olan en az iki farklı bakulovirüs türünün genomlar¹⁸ıçeren en az bir ODV'yi taşıyan bir karışık virüs oklüzyon koru (OB), mevcut buluşun bir yönüdür, burada genomlar, çok sayıda nükleopolihedrovirüsün genomudur: mevcut buluşun bir karışık OB'si.

Mevcut buluşun bir diğer yönü, mevcut buluşun en az bir ODV'sini ve/veya mevcut buluşun en az bir OB'sini içeren bir bileşimdir. Bu tarz bir bileşim, mevcut buluşun bir bileşimidir.

- 20 Ayrıca mevcut buluşun bir yönü, mevcut buluşun OB'lerin kullanımı ve/veya zararlı böceklerle mücadeleye yönelik, mevcut buluşun bir bileşimidir.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

- 25 **Şekil 1**, nükleopolihedrovirüslerinin mikroskopik yapılarını göstermektedir.

- Panel a (şeklin üst bölümü), bireysel şematik sunumunun, mikrografiğin sağında gösterildiği oklüzyon korları¹⁹ (OB) bir mikrografiğini göstermektedir. Panelin sağ tarafında, iki oklüzyon koru sunulmaktadır; bu da dairelerin ve dikdörtgenin ODV'leri (oklüzyon viryonları²⁰ bulunduğu iç tarafları²¹ göstermektedir.
- Panel b (şeklin alt bölümü), ODV'lerin iki farklı türünü temsil etmektedir. Tek bir nükleopolihedrovirüse (SNPV) tekabül eden soldan birisi, genomik DNA (bir sarmal olarak temsil edilen) ve birleşik proteinler ile oluşturulan tek bir nükleokapsidi (NC) içermektedir. Çok sayıda nükleopolihedrovirüse (MNPV) tekabül eden sağ taraftan birisi, ODV başında bir nükleokapsidi veya birden fazla nükleokapsidi (NC) (her birisi,

içinde bir sarmalla bir dikdörtgen olarak gösterilmektedir) içermektedir.

Şekil 2 *Spodoptera exigua* nükleopolihedrovirüs varyant SeUS2-A (şerit 1) ve *Psfl* içeren *Spodoptera frugiperda* nükleopolihedrovirüs varyant SfNIC-C (2) genomik DNA işleminden sonra üretilen kütalama endonükleaz profilleri. Moleküler işaretleyici (M), Hiperladder I'dir (Bioline).

Şekil 3. OB'lerden ekstrakte edilen DNA'nın *Psfl* I ve elektroforez ile işleminden sonra virüs genomik DNA'nın kütalama fragman uzunluk polimorfizmi. Şeritler:

- M: moleküler ağırlık işaretleyici Hiperladder I (Bioline)
- Şerit 1: SeUS2-A OB'lerden ekstrakte edilen DNA'nın *Psfl* kütalama profili.
- Şerit 2: SfNIC-C OB'lerden ekstrakte edilen DNA'nın *Psfl* kütalama profili.
- Şerit 3: SeUS2-A ve SfNIC-C ODV'lerle *S. exigua* larvalarının birlikte enfeksiyonundan sonra üretilen OB'lerden ekstrakte edilen DNA'nın *Psfl* kütalama profili. Sadece SeUS2-A profili gözlemlenmektedir, fakat PCR amplifikasyonu, SfNIC-C DNA mevcudiyetini onaylamıştır (veri, tekrar #1'den gösterilmektedir).
- Şerit 4: SeUS2-A ve SfNIC-C ODV'leri ile birlikte enfeksiyon esnasında üretilen OB'ler kullanılarak *S. frugiperda* ikinci dönem larvalarının inokülasyonundan sonra üretilen OB'lerden ekstrakte edilen DNA'nın *Psfl* kütalama profili.
- Şerit 5: Şerit 3 ile aynıdır fakat veri, tekrar #2 için gösterilmektedir.
- Şerit 6: Şerit 4 ile aynıdır fakat veri, tekrar #2 için gösterilmektedir.

Şekil 4: *ie-0* gen sekanslarında hedeflenen spesifik primerler kullanılarak *Spodoptera exigua* veya *S. frugiperda* larvalarında üretilen OB'lerden ekstrakte edilen SeUS2-A ve SfNIC-C DNA'nın PCR tespiti.

- M: moleküler ağırlık işaretleyici Hiperladder I (Bioline)
- Şerit 1: SeUS2-A OB'lerden ekstrakte edilen DNA (herhangi bir spesifik amplifikasyon ürünü yoktur)
- Şerit 2: SfNIC-C OB'lerden ekstrakte edilen DNA.
- Şerit 3: SeUS2-A ve SfNIC-C ODV'lerle *S. exigua* larvalarının birlikte enfeksiyonundan sonra üretilen OB'lerden ekstrakte edilen DNA. Tekrar #1'den gelen sonuçlar.
- Şerit 4: SeUS2-A ve SfNIC-C ODV'leri ile birlikte enfekte olan larvalardan OB'ler kullanılarak *S. frugiperda* ikinci dönem larvalarının inokülasyonundan sonra üretilen

OB'lerden ekstrakte edilen DNA. Tekrar #1'den gelen sonuçlar.

- Şerit 5: Şerit 3 ile aynıdır fakat sonuçlar, tekrar #2'den gelmektedir.
- Şerit 6: Şerit 4 ile aynıdır fakat sonuçlar, tekrar #2'den gelmektedir.

5 **Şekil 5** OB'lerde SeUS2-A ve SfNIC-C virüslerinin birlikte tükünması farklı OB karışımlarında 100 ng SeUS2-A genomu başına nispi SfNIC-C genomu bolluğu. *Spodoptera exigua* larvalarda ilgili geçiş sayıları (P0 ila P6), x eksenin altında gösterilmektedir, P0, SeUS2-A ve SfNIC-C OB'lerin 1:1 oranında karışımlarından salınan ODV'ler kullanılarak birlikte enfeksiyona tekabül etmektedir. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

10 **Şekil 6:** Birlikte tükünmiş karışık virüs OB'lerinden (AcMNPV+SfMNPV) ekstrakte edilen AcC6 (AcMNPV), SfNIC-B (SfMNPV) ve DNA'dan güçlendirilen PCR ürünlerinin elektroforezi. Hiperladder I, sol tarafta gösterilen fragman uzunluğuna sahip bir moleküler boyut işaretleyicisini göstermektedir.

Şekil 7: SfNIC-C ve AcC6 virüsleri ile *S. frugiperda* larvalarında birlikte enfeksiyonundan sonra üretilen karışık virüs OB'lerinde tükünan karışık virüs ODV'lerinin diyagramatik örneği. Dikdörtgenler ve daireler, sırasıyla bir ön (yan) veya üst (uç) görünümde ODV'leri temsil etmektedir. Dikdörtgenlerin içerisinde yatay hatlar veya daireler içerisindeki noktalar, nükleokapsidler temsil etmektedir, koyu olanlar, tek türlere aittir ve açık olanlar, bir diğer türe aittir.

20 **Şekil 8:** Uç nokta seyrelti numunelerinden (3 tekrar) ekstrakte edilen DNA'dan güçlendirilen PCR ürünlerinin elektroforezi. Hiperladder I, moleküler boyut işaretleyicisini (Bioline) göstermektedir. Nihai iki şerit, AcC6 (AcMNPV) ve SfNIC-B (SfMNPV) genomik DNA'ya yönelik pozitif kontrolleri göstermektedir. Üst şeritleri, SfNIC-B spesifik primerler kullanılarak amplifikasyonları gösterirken, alt şeritler, AcC6 spesifik primerler kullanılarak amplifikasyonları göstermektedir.

25 **Şekil 9:** *S. frugiperda* larvalarında tek, eş zamanlı veya geciktirilmiş süperenfeksiyonundan sonra gözlemlenen larva mortalitesi. İşlemler, birinci ve ikinci inokülasyon arasındaki zaman aralığında birinci virüsün baş harfleri ve inoküle ikinci virüsün baş harfleri ile gösterilmektedir, örneğin Ac12Sf, ilk olarak AcC6 OB'leri ile enfekte edilmiş ve daha sonrasında SfNIC-B OB'lerle 12 saat sonra inoküle edilmiş larvaları göstermektedir. Sütunlar üzerindeki değerleri, virüs ile indüklenmiş mortalite yüzdesini göstermektedir. Özdeş harflerin takip ettiği değerleri önemli ölçüde farklı göstermemiştir (ANOVA, Tukey, $p>0.05$).

30 **Şekil 10:** Bu virüslerin OB inokülümü kullanılarak tekil enfeksiyonlar, eş zamanlı enfeksiyon ve gecikmiş süperenfeksiyonlar (12 - 72 saat) esnasında üretilen OB'lerden ekstrakte edilen AcC6 (AcMNPV) genomik DNA ve SfNIC-B (SfMNPV) genomik DNA'nın log oranı Benzer

harflere sahip olan sütunlar önemli ölçüde farklılık göstermemiştir (ANOVA, Tukey, $p>0.05$).

Şekil 11: Eş zamanlı ve gecikmiş birlikte enfeksiyon deneyinde üretilen karışık virüs OB'lerinden alınan ODV'lerin bileşimi.

5 BULUŞUN AYRINTILI AÇIKLAMASI

Farklı bakulovirüs türlerinin genomları içereni bakulovirüslerin özelliği olan yapısal ve morfolojik özelliklerle aynı viral oklüzyon koru (OB) içerisinde bulunan viryonları elde edilebildiği bir yöntem temsil edilmektedir. Mevcut buluşun yöntemi ile elde edilen karışık genom OB'leri, nükleopolihedrovirüslerin farklı türlerinden veya suşlarından iki veya ikiden fazla farklı genomun bir karışımını içermektedir.

Yanase ve meslektaşları (Yanase ve diğ., 1998) gibi önceki çalışmalarda bulunan sonuçlara aksine, mevcut buluşta sunulan deneyler, bakulovirüslerin iki tür, belirgin olarak çok sayıda nükleopolihedrovirüslerin iki türü ile tek bir böceğin birlikte enfeksiyonunun, aynı hücrelerde her iki virüsün çoğalması ve hatta, aynı oklüzyon viryonunda (ODV) farklı viral genomları içeren nükleokapsidlerin paketlenmesine neden olabilmektedir.

Bu sebepten ötürü, farklı genomları, OB'lerin ve konak aralığına patojenezite, virülans üretilmesi gibi insektisidal özellikleri açısından farklılık gösteren iki veya ikiden fazla bakulovirüs türü ile enfeksiyona duyarlı olan bir böcek türünün birlikte enfeksiyonu vasıtasıyla üretilen bireysel ODV'lerde eş zamanlı olarak mevcut olabilmektedir. Bunlar, normal morfoloji ve boyuta sahip virüs oklüzyon korlarında (OB) tutulabilmektedir ve bileşen bakulovirüslerinden birisi ile enfeksiyona duyarlı böcek türlerini enfekte edebilmektedir.

Birden fazla nükleokapsidi (ve bu şekilde, birden fazla bakulovirüs genomunu) içeren ODV'ler, çok sayıda nükleopolihedrovirüsünün özelliği olurken, tek nükleopolihedrovirüsler, her bir ODV'de sadece bir nükleokapsid mevcudiyeti ile karakterize edilmektedir. Bu şekilde, mevcut buluşun yöntemini uygulamak için, kullanılan tüm bakulovirüsler, çok sayıda nükleopolihedrovirüsler (MNPV) olmalıdır.

Mevcut başvurunun örnekleri, mevcut buluşun yönteminin, filogenetik olarak yakın ilişkiye sahip bakulovirüslerle (örneğin SeMNPV ve SfMNPV) ve uzaktan ilişkili bakulovirüslerle (benzer bir şekilde, örneğin AcMNPV ve SfMNPV) işleyebildiğini göstermektedir. Her iki durumda, bakulovirüsler birlikte enfekte olabilmektedir ve her birisi, özel bir böcek

hücresinde üretken bir enfeksiyon üretmektedir. Bakulovirüsler hakkındaki mevcut bilgiye göre, mevcut buluşun yöntemi, bunların tümünün çok sayıda nükleopolihedrovirüsleri olması koşuluyla, herhangi bir bakulovirüs kombinasyonu ile uygulanabilmektedir. Bir aynı araya inoküle edilen tüm bakulovirüslerin, mevcut başvurunun örneklerinden olduğu gibi 5 alfabakulovirüsleri olması tercih edilmektedir. Alfavirüsler, aynı filogenetik gruba (Örnek 1'de olduğu gibi, burada Grup II'ye ait olan iki alfabakulovirüs kullanılmaktadır) veya farklı gruplara (Örnekler 2 ve 3'te olduğu gibi, burada Grup I'in bir alfabakulovirüsü ve Grup II'nin bir alfabakulovirüsü kullanılmaktadır) ait olabilmektedir.

- 10 Olası kombinasyonların örnekleri, söz konusu Örneklerde bulunabilmektedir: *Spodoptera frugiperda*, çeşitli ekonomik olarak önemli bitkinin bir yemci lepidopteran böceğidir. *Spodoptera frugiperda* çoklu nükleopolihedrovirüs (SfMNPV), oldukça dair bir konak aralığına sahip olduğu (aslında, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera litura* ve *Spodoptera exigua*da 15 ölümcül bir enfeksiyonunu üretebilmesi) için, tek bir kontrol maddesi ile daha fazla zararlı böcek türünü kontrol etmek üzere daha geniş bir spektruma sahip insektisidal madde ile kombinasyon halinde kullanılması tavsiye edilmektedir. Bu amaca yönelik olarak, *S. frugiperda* dahil olmak üzere en az 32 lepidopteran türünün larvalarını enfekte edebilen ve öldürebilen *Autographa californica* çoklu nükleopolihedrovirüsün (AcMNPV), ilgi çekici bir ortak olacağı görülmektedir. Fakat, tüm konak türleri, AcMNPV ile ölümcül enfeksiyona yüksek oranda 20 duyarlı değildir. Örnek 3, SfMNPV ile AcMNPV'nin eş zamanlı enfeksiyonunun, AcMNPV ile işlenen böceklerde elde edilen mortaliteyi arttırdığını göstermektedir, bu şekilde söz konusu iki virüsün genomuna sahip karışık ODV'leri içeren OB'leri içeren bileşimler, elde edilen sonuçları geliştirebilmektedir.
- 25 Mevcut buluşun yöntemi, en az bir oklüzyon viryonunda (ODV) birlikte sarılabacak olan bakulovirüs genomları ile böcek larvalarına veya böcek hücrelerinin birlikte enfekte edilmesi ile uygulanabilmektedir.

- Mevcut buluşun yönteminde, bakulovirüs genomları böcek larvalarına veya tercihen 30 nükleokapsidleri oluşturan böcek hücreleri kültürlerine sağlanmaktadır (inoküle edilmektedir). İnoküle nükleokapsidler, ODV'leri oluşturan bir zarf ile sarılgı gruplarda birleştirilebilmektedir veya yukarıda açıklandığı gibi, enfekte böcek içerisinde veya hücre kültüründe enfeksiyonun hücreden hücreye iletim için *in vivo* üretilen virüs partikülleri olan aşılı viryonlar (BV) oluşturabilmektedir. Dolayısıyla, inoküle ODV'ler, serbest ODV'ler (oklüzyon korlarıda 35 tıkanmamaktadır) olabilmektedir veya oklüzyon korları (OB) oluşturan bir proteinaköz

matrisinde tıkanabilmektedirler, her bir OB, çeşitli ODV'leri içermektedir.

5 Böcekler ve hücre kültürleri, BV'ler kullanılarak inoküle edilebilmektedir. BV'ler inoküle edildiğinde, bir kaç farklı BV kümesi de inoküle edilmelidir; her bir BV kümesi, belirli bir bakulovirüs türünün genomuna sahip nükleokapsidleri içermektedir. İnoküle edilecek BV kümesi sayısal olarak ODV'de birlikte sarımsı olan farklı bakulovirüs türlerinin genom sayısına eşit olacaktır. Bu sebepten ötürü, inokülüm olarak BV kullanılarak bir virüs türüne ait genomlar (nükleokapsidler) içeren BV'lerin ve aynı ODV'lerde birlikte sarımsı olan diğer virüs türünde (veya türlerinde) genomlar (nükleokapsidler) içeren BV'lerin inoküle edilmesi gerektiğini belirtmektedir.

15 Her bir BV, tek bir nükleokapsidi içerdiği ve her bir nükleokapsid, tek bir genom kopyasını içerdiği için, farklı bakulovirüs türlerinden BV'lerin formunda olan farklı bakulovirüs türlerinin nükleokapsidlerini inoküle ederek mevcut buluşun yönteminin uygulanması belirli bir virüs türünde genomun bireysel kopyalarını içeren nükleokapsidlerin, ODV'leri oluşturmak üzere sarımsı olduğu ve bir böcek konağı (bir böcek larvası veya bir böcek hücre kültürüne inoküle etmek üzere kullanıldığı bir diğer olası yapılandırma)ya benzerdir. Mevcut buluşun yönteminin bu yapılandırmasında, belirli bir virüs türüne ait olan bakulovirüs genomuna sahip ODV'ler, böcek larvaları veya böcek hücre kültürlerini eş zamanlı olarak inoküle edecek şekilde veya 20 belirli bir süre aralığından sonra, birincisinden farklı olan bir diğer virüs türüne ait genomu içeren nükleokapsidleri içeren ODV'lerle veya BV'lerle kullanılmaktadır. Bu tarz bir yapılandırma, özellikle buluşun yöntemi ilk defa uygulandığında tercih edilecektir.

25 Fakat sonraki durum, Örnek 3'te görülebildiği üzere, mevcut buluşun yönteminin adımlarını uygulanması ile elde edilen OB'lerde tıkanan ODV'lerin, yeni ODV'leri ve OB'leri elde etmek üzere sağlıklı larvaları inoküle edecek şekilde kullanıldığı ve Örnekte ve ilgili Şekillerde görülebildiği üzere, ek inokülasyon ve OB üretimi turları için kullanılan bazı ODV'lerin, birden fazla genom türünü içerdiği, bir başka ifadeyle birinci turda inoküle edilen iki veya ikiden fazla farklı bakulovirüs türüne ait genomları, enfeksiyonun bir birinci turundan elde edilen bazı 30 ODV'lerde birlikte sarımsı olduğu ve larvaları inoküle edecek ve mevcut buluşun yöntemini tekrardan uygulayacak şekilde kullanılabildiği mevcut buluşun yönteminin uygulanması gerekli değildir.

Öncesinde açıklandığı üzere, ODV'ler (ve bu şekilde, ODV'ler içerisinde sarımsı olan 35 nükleokapsidler), oklüzyon korları (OB'ler) tıkalı olan veya oklüzyon korlarında tıkalı

olmayan (sonraki durumda, ODV'ler burada serbest ODV'ler olarak ifade edilmektedir) böcek larvalarına inoküle edecek şekilde kullanılabilir. Böcek hücre kültürlerinin durumunda, ODV'ler, OB'lerden salındıktan sonra inokülasyon için kullanılabilir. OB'lerden salınan ODV'ler, buradan sonra serbest ODV'ler olarak ifade edilmektedir.

5

OB'ler, inokülasyon için kullanıldığında, bir aynı oklüzyon korunda tutulan tüm ODV'ler, tek bir türe ait olabilmektedir, bir başka ifadeyle tüm ODV'ler, tek bir virüs türünün genomuna sahip nükleokapsidleri içermektedir ve tüm ODV'ler, aynı türün genomuna sahip nükleokapsidleri içermektedir. Fakat, aynı oklüzyon korunda dahil edilen ODV'lerin, nükleokapsidleri içerisindeki genomlarla ilgili farklı bileşimlere sahip olmasında mümkündür, bunlardan bazıları tek bir türün genomları içermektedir, diğerleri, aynı türe ait olan, fakat birincisinden farklı olan genomları içermektedir ve farklı nükleokapsidlerin ODV'leri oluşturmak üzere birlikte sarıldığı diğerlerini içermektedir, en az bir veya bir kaç ODV, aynı ODV'nin diğer nükleokapsidlerinin türlerinin genomundan farklı bir türe ait olan bir genomu içermektedir. Her iki türde OB, mevcut buluşun yöntemini uygulayacak şekilde inoküle edilebilmektedir. Bu şekilde, mevcut buluşun olası bir yapılması, inoküle nükleokapsidlerin, oklüzyon korlarında dahil olan ODV'leri oluşturacak şekilde sarılmalı ve en az bir inoküle oklüzyon korunun, birden fazla bakulovirüs türüne ait genomu içeren nükleokapsidlerin birlikte sarıldığı en az bir ODV'yi içerdığı bir yapılmalıdır.

20

Bir diğer olası yapılma, aynı oklüzyon korunda tutulan tüm ODV'lerin, aynı türün genomuna sahip olan nükleokapsidleri içerdığı bir yapılmalıdır. Sonraki durumda, OB'lerin çeşitli kümeleri, böcek larvalarına inoküle edecek şekilde kullanılmalıdır. Her bir küme, belirli bir virüs tipinin veya türlerinin genomları içeren nükleokapsidlerini içermektedir.

25

Yukarıda açıklandığı üzere, BV'ler veya serbest ODV'ler, mevcut buluşun amaçlarına yönelik böcek hücrelerinin inoküle edilmesi için kullanılabilir. Bu, inoküle genomları çoğaltması ve yeni virüs partiküllerinin üretimi için kullanılan sisteme bağlıdır. Yetiştirilmiş böcek hücrelerinin farklı bakulovirüs türlerinin genomları ile in vitro inokülasyonu için, BV'ler veya serbest ODV'ler, hücreleri enfekte etmek üzere kullanılabilir.

30

Farklı bakulovirüs genomlarıyla birlikte enfekte edilecek olan böcek hücreleri, bir böcek konağına (bir böcek larvası dokularına bir bölümü olduğunda, BV'ler veya serbest ODV'ler veya farklı bakulovirüs türlerinin OB'leri veya farklı bakulovirüs türlerinin genomları karşımları içeren OB'ler, inokülasyon için kullanılabilir, fakat inokülasyon yolu,

35

kullanım için partikül türünün seçimi akılda tutulmalıdır

- Bakulovirüs genomları içeren virüs partikülleri enjekte edildiğinde, BV'ler veya serbest ODV'ler kullanılabilir. Hemokoelik enjeksiyon tercih edilmektedir.
- 5 - Nükleokapsidler, böcek larvalara oral olarak inoküle edildiğinde, BV'ler, serbest ODV'ler veya OB'ler kullanılabilir. BV'ler, bu yol ile enfeksiyon için en az etkili partiküllerdir. Serbest ODV'ler kullanılabilir, fakat bunların, oklüzyon korları doğada böcek larfaları tarafından sindirilen virüs partikülleri olduğu ve doğal bulaş partiküller olduğu için, oklüzyon korlarında tanımlar tercih edilmektedir. Oral inokülasyon kullanıldığında, 10 oklüzyon korları böceklerle sağlanan bir sulu süspansiyonda uygulanmaktadır veya katı veya yarıkatı formda uygulanabilmekte, diyet veya böcek larvası tarafından sindirilen diğer maddeler ile karıştırılabilir.

Bir larva veya böcek kültür hücrelerinin böcek hücreleri enfekte olduğunda, daha sonrasında 15 ODV'lere ve OB'lere dahil edilen diğer nükleokapsidlere neden olmaktadır. Mevcut buluşa göre, böcekler veya böcek hücreleri, farklı bakulovirüs türlerinin genomları ile birlikte enfekte edildiğinde, üretilen ODV'lerin bir fraksiyonu, karışık virüs ODV'leridir, burada en az bir nükleokapsid, aynı ODV'de birlikte sarı olan diğer genom kopyalarından (diğer nükleokapsidlerden) farklı olan bir genom kopyasını içermektedir, bir başka ifadeyle farklı 20 bakulovirüs türlerinin genomları aynı ODV'de birlikte sarılmaktadır

Yukarıda açıklandığı üzere, tanımlar karışık virüs ODV'ler veya OB'ler, zararlı böceklerle mücadele etmek üzere bir biyolojik kontrol maddesi olarak kullanılabilen büyük miktarlarda karışık genom OB'lerini üretmek üzere duyarlı böcekleri enfekte edecek şekilde 25 kullanılabilir. Bu, bakulovirüsleri içeren bir insektisidi kullanarak yönetilebilen böcek türü sayısında bir artışa olanak sağlamaktadır böylelikle iki farklı insektisidin uygulanması gerekli olmamaktadır iki veya ikiden fazla zararlı böcek türü, bir aynı bitkide, mahsulde veya yetiştiricilikte mevcut olduğunda (veya kontrol edilmesi gerektiğinde) farklı bir bakulovirüs türünü içermektedir. Önemli ölçüde, bu tarz karışık virüs OB'leri, bir aynı böcek kolonisinden 30 elde edilebilmektedir, bu da her birisinin maliyetli olduğu farklı böcek kolonilerinde bakulovirüslerin çok sayıda türünün üretimi ile ilişkili maliyetlerin katlanması önlemektedir. Bu, mevcut buluşta açıklanan insektisit türünün üretim maliyetlerini azaltmaktadır

Mevcut başvurunun Örnek 3'ünde gösterildiği üzere, iki farklı bakulovirüs ile eş zamanlı 35 enfeksiyonunki gibi bazı durumlarda, enfekte larvalarda elde edilen mortalite, tek başına

belirli bir bakulovirüs türü ile elde edilenden (örn. SfMNPV'nin SfNIC-B genotipine sahip karışıklarda AcC6 ile eş zamanlı olarak birlikte enfeksiyon ile elde edilen mortaliteye sahip AcMNPV'nin genotipi AcC6 ile elde edilen mortaliteye kıyasla) daha yüksek çıkmıştır. Bu sebepten ötürü, mevcut buluşun yöntemi ve söz konusu yöntem ile elde edilen buluşun karışık virüsü OB'lere sahip bileşimler, sadece bir zararlı böcek türünün, bir bitkiyi veya mahsulü sindirdiği belirli durumlarda faydalı olabilmektedir ve iki virüs türünün, zararlı böceğin öldürülmesi olasılığını arttıracak olmasından dolayı ve ayrıca, zararlı böceğin mortalitesinin prevalansını ve bu şekilde kontrol önleminin etkililiğinin arttırılmasına yardım etmek için belirli bir bakulovirüs türüne böcek duyarlılığı hakkındaki şüpheler mevcuttur.

10

Dahası konak böceğin birlikte enfeksiyonu eş zamanlı olarak veya birinci inokülasyon ve ikinci bakulovirüs türleri ve/veya sonraki inokülasyonlar arasındaki belirli bir süre aralığından sonra uygulanabilmektedir. Bu prosedür, birlikte enfekte böcekte üretilen ODV'lerde ve OB'lerde her bir türün genomunun farklı oranları nedeniyle olmaktadır. Ek olarak, mevcut başvurunun örnekleri ayrıca her bir bakulovirüs türünün inokülasyon sırası, nihai OB bileşiminde her bir türün genom oranı etkileyebildiğini göstermektedir. Bu sebepten ötürü, mevcut buluşun yönteminin uygulandığı (inokülasyonlar arasındaki süre ve farklı bakulovirüslerin inokülasyon sırası) koşulları basit bir şekilde çeşitlendirerek, her bir bakulovirüsün farklı oranlarıya OB bileşimlerinin elde edilmesi mümkündür.

20

Mevcut buluşun yönteminde değiştirilebilen bir diğer değişken, böcekleri inoküle etmek için kullanılan her bir bakulovirüs oranıdır. Her bir bakulovirüsün inoküle genomları sayısını oran 1:1 veya elde edilecek olan karışık ODV'lerde veya karışık OB'lerde mevcut bir genom kopyasına sahip olması gereken tüm bakulovirüslerin inoküle edilmesi koşuluyla farklı bir oranda olabilmektedir.

25

Bu şekilde, mevcut buluşun yöntemi ayrıca arzu edildiği gibi, birinci bakulovirüsün inokülasyonu ve ikinci (veya sonraki bir) bakulovirüsün inokülasyonu arasındaki süre aralığı ve/veya (virüsler zamanla ayrı bir şekilde inoküle edildiğinde) farklı bakulovirüsün inokülasyon sırası ve/veya bir böceği inoküle edecek şekilde kullanılan her bir bakulovirüsün genom kopyaları oranı değiştirilerek her bir bakulovirüs genotipinin farklı oranlarıya OB bileşimlerinin üretimine olanak sağlamaktadır. Bu sebepten ötürü, bir bakulovirüsün inokülasyonu ve ikinci (veya sonraki) bakulovirüsünün inokülasyonu arasındaki süre aralığına eş zamanlı inokülasyon ve ayrı inokülasyon, mevcut buluşun yönteminin yapıldıkları ayrı ayrı her bir bakulovirüsün aynı miktarda (1:1 oranı) genom kopyalarını inokülasyonu veya

30

35

1:1'den farklı bir oranda inokülasyon, mevcut buluşun yapıldığı malar

Belirli bir türe ait olan bakulovirüs genomunu içeren nükleokapsidler, böcek larvalar veya kültür hücrelerini, diğer bakulovirüs genomu (veya ikiden fazla tür inoküle edildiğinde ve üretilen karışık ODV'lerde genomların en az bir kopyasına sahip olması beklendiğinde, diğer bakulovirüs genomları dahil olmak üzere nükleokapsidlere göre zamanlı ayrı bir şekilde inoküle edecek şekilde kullanılabilir. Mevcut buluşun yönteminin bu yapıldığına, böcek larvalar veya kültür hücreleri, inoküle türlerinkinden farklı olan belirli bir türe ait olan bakulovirüs genomuna sahip nükleokapsidler içeren BV'lerle veya ODV'lerle inoküle edildiğinde mümkündür. Böcekler, her bir belirli türe ait nükleokapsidlerin sıralı inokülasyonu ile iki veya ikiden fazla bakulovirüs türü ile birlikte enfekte edildiğinde, birinci ve sonuncu inokülasyon arasındaki sürenin gecikmesi, birinci enfeksiyonun belirtilerinin ortaya çıkması için gerekli süreden daha düşük olmalıdır. Ölümden önceki olağan enfeksiyon belirtileri, uyuşukluk, histe azalma oranları renginde değişimler ve bazı virüslerde konak bitkilerin apik bölümlerine deplasman içermektedir, bu tarz belirtilerin mevcudiyeti, belirgin hastalığın bir göstergesi olarak düşünülebilir.

Bu sebepten ötürü ve Örnek 3'te gösterilen deneylerin sonuçlarına göre, zamanla farklı bakulovirüsler ayrı şekilde inoküle edildiğinde, ikinci (veya nihai) inokülasyon yer aldığı anda, farklı bir bakulovirüs türünün genomuyla nükleokapsidlerin inokülasyonuna göre 48 saatin aşağısına inmesi ve daha çok tercih edilecek şekilde birinci bakulovirüsün inokülasyonundan sonra 24 saatten daha fazla olmaması hatta daha çok tercih edilecek şekilde 16 saatten daha fazla olmaması tercih edilmektedir. Bu, birinci inokülasyondan (enfeksiyon) sonraki süre arttıkça, hücrelerin, ikinci bir bakulovirüse algısal olmayı kesmesinden kaynaklanmaktadır. Bu şekilde, viryonlar ve/veya oklüzyon korları, birden fazla bakulovirüs türünün nükleokapsidlerini içerecek şekilde elde edileceği zaman, özellikle birinci bakulovirüsün enfeksiyondan sonra 16 ila 24 saatten daha fazla olan ikinci bakulovirüs inokülasyonu gecilmesi tercih edilmemektedir.

Ayrıca, mevcut buluşun yöntemine ait olan, belirli bir türe ait bakulovirüs genomuna sahip nükleokapsidlerin, en az bir oklüzyon viryonunda birinci olanla tıkanacak olan diğer bakulovirüs genomlarına sahip nükleokapsitlerle eş zamanlı olarak, kültürlenmiş böcek hücrelerini veya böcek larvalar inoküle edecek şekilde kullanıldığı bir yapıldığına, Bu yapıldığına, BV'lerin, ODV'lerin veya OB'lerin formunda olan nükleokapsidlerle uyumludur ve bu durumda, ODV'ler (OB'lerde serbest veya tıkanmış) sadece aynı türün genotiplerini ve

karşıklı ODV'leri içermektedir (ODV'ler, farklı bakulovirüs türlerinin genomlarını içermektedir, burada en az bir genom, diğerlerinden farklıdır). Karşıklı OB'ler, ayrıca tüm tanımlanmış ODV'lerin, tüm birlikte tanımlanmış ODV'lerin aynı türleri olan tek bir türe ait olan genomları içerdiği OB'ler de kullanılabilmektedir.

5

Mevcut buluşun yöntemi, böcek hücre kültürleriyle uygulandığında, herhangi bir böcek hücre dizisi, genomları, üretilecek olan ODV'lerde veya OB'lerde mevcut olması gereken bakulovirüslerin her iki (veya daha fazla) türü ile enfeksiyona duyarlı olduğu zaman kullanılabilmektedir. Böcek hücre kültürlerinin ve duyarlı oldukları virüslerin bir listesi, Lynn (2007) referansından temin edilebilmektedir. *S. frugiperda*'dan hücre dizileri (Sf9 ve Sf21) ve *Trichoplusia*/den High5 en yaygın olarak kullanılan olmasına rağmen, herhangi bir diğer böcek hücre dizisi de karşıklı ODV'leri ve karşıklı OB'leri elde edecek şekilde kullanılabilmektedir. Bakulovirüsün belirli bir türüne ait ODV'lerle veya BV'lerle ve bakulovirüsün farklı bir türüne ait ODV'lerle veya BV'lerle enfekte edilmesi, bu hücre dizisine bulaştırılan her ikisi, karşıklı ODV'lerin ve karşıklı OB'lerin üretimine iletecektir. En enfekte hücrelerin (kullanılan hücre dizisine ve virüslere bağlı olarak enfeksiyondan 5 ila 7 gün sonra) içerisindeki polihedrayı görmek mümkün olduğunda, her iki hücre ve ortamı çıkarılması gerekecektir. Karşıklı OB'ler, düşük hızda santrifüjleme ile toplanacaktır (King ve diğ., 1992).

20

Bir böcek konak, OB'leri üretecek şekilde kullanıldığında, mevcut buluşun yönteminde kullanılan böcek türleri, genomları, üretilecek olan OB'lerde mevcut olması gerektiği bakulovirüslerin iki (veya daha fazla) türüne duyarlı herhangi bir böcek olabilmektedir. Böcek, böceklerin genel olarak bakulovirüs enfeksiyonuna duyarlı olduğu aşama olan larva aşamasında olmalıdır. Böcekler genel olarak, pupal aşamasına ulaşmadan önce birkaç defa deri değiştirmektedir; iki ardışık deri değiştirme durumu arasındaki her bir aşama (veya alt aşama) genel olarak demoninasyonun, spesifik bir dönemde bireysel larvalara uygulanan dönem olarak bilinmektedir. Bir böceğin dönem sayıları, türlere ve çevresel koşullara bağlıdır. Son olası dönemlerde (mümkün, en az dördüncü dönem) larvalar genel olarak büyük boyutları büyük miktarlarda OB'lerin üretimine olanak sağladığı için OB'leri üretmesi tercih edilmektedir.

30

Mevcut başvuruda kullanıldığı üzere, "inokülasyon" terimi, virüslerin (mevcut buluşun yönteminin "patojenleri") böceklerle uygulanması ifade etmektedir. Bu tarz uygulama, doğrudan enjeksiyonla (virüsler, oklüzyon korlarında tanımlanmayan serbest viryonları formunda olduğunda tercih edilmektedir) olabilmektedir veya doğada meydana geldiği gibi

35

sindirim ile oluşabilmektedir, burada larvalar, yapraklarda mevcut olan ve kontamine yaprak dokusu ile sindirilen bakulovirüs OB'leri sindirmektedir: bu, "oral inokülasyon" veya "ağızdan inokülasyon" durumudur. Bu ikinci inokülasyon türü için, OB'leri içeren bir süspansiyon (tercihen sulu) larvalara oral olarak, örneğin mevcut başvurunun Örnek 2 ve 3'ünde olduğu Hughes ve Wood'un, 1986, damlatarak besleme yöntemiyle uygulanmaktadır veya OB'ler, böcek larvası ile tüketilen bir sübstratı kontamine edecek şekilde kullanılmaktadır, bu şekilde örneğin larvalara sağlanan diyetle karıştırılan katı veya yarı katı formda uygulanmaktadır.

Daha sonrasında, mevcut buluşun yöntemi, olası bir yapılandırılarda, aşağıdaki adımları içeren karışık OB'lerin üretimine yönelik bir yöntem olarak belirlenebilmektedir:

- a) eş zamanlı inokülasyon vasıtasıyla veya birinci enfeksiyonun belirtilerinin ortaya çıkması için gerekli süreden daha düşük bir süre gecikmesiyle sıralı inokülasyon vasıtasıyla iki farklı bakulovirüs türü ile böcek larvalarının birlikte enfekte edilmesi, ve
- b) polihedrozdan dolayı belirgin bir şekilde hastalıklı veya ölüm durumu gelişene kadar inoküle larvaların gerekli koşullarda yetiştirilmesi.

Ölü larvalarla üretilen OB'ler, örneğin suda bulunan ölü larvaların öğütülmesi, elde edilen süspansiyonun filtrelenmesi, OB'lerin, süspansiyondan ayrılması ve sedimentasyon, santrifüjleme veya ilişkili bir teknik (tercihen, OB'lerin ayrılması hızlandırılması ve santrifüjleme ile sızdırılabilirliğiyle çökmesine (çökertme) olanak sağlanması veya neden olunması ve OB toparak süpernatanttan ayrılması dahil olduğu teknikte bilinen herhangi bir teknik ile ölü larvalardan saflaştırılarak izole edilebilmektedir. İzole OB'ler, bir sulu çözeltide yeniden süspanse edilebilmektedir, bu da oda sıcaklığında veya soğutma (0° ila 6° C) altında veya formülasyondan önce dondurma koşulları (-80°C ila 0°) altında depolanabilen OB'lerin bir sulu süspansiyonuna neden olmaktadır. Dondurma koşulları OB'lerin, uzun bir dönem için depolanması amaçlandığında tercih edilmektedir. Alternatif olarak, OB'lerin sulu süspansiyonu liyofilize edilebilmekte ve oda sıcaklığında veya soğutma altında depolanabilmektedir.

Serbest (tutulmamış) ODV'lerin elde edilmesi halinde, örneğin Örnek 2'de olduğu gibi bir alkalın çözeltisi kullanılarak bunların alkalın lizisine tabi tutulması vasıtasıyla üretilen OB'lerden salılabilmektedirler.

Öncesinde bahsi geçtiği üzere, mevcut buluş, ilk defa, farklı bakulovirüs türlerinin genomlarını

içeren viryonları taşıyan bakulovirüs oklüzyon korları (OB) bir üretim yöntemini sağlamaktadır. Bu tarz OB'ler, zararlı böceklerin biyolojik kontrolü için, biyolojik insektisidler olarak mevcut biçimde ticarileştirilen sadece bir virüs türünün genomları içeren OB'lere kıyasla alternatif bir çözüm olarak kullanılabilmektedir. Bu şekilde, en azından bazı ODV'lerin, farklı bakulovirüs türlerinin genomları içerdikleri, genomları, çoklu nükleopolihedrovirüslerin genomları olduğu bu tarz OB'ler, mevcut buluşun bir yönüdür. Ayrıca OB'leri içeren bileşimler, mevcut buluşun bir diğer yönüdür. Zararlı böceklerin biyolojik kontrolü için bu tarz OB'lerin ve ayrıca bunları içeren bileşimlerin kullanımı, mevcut buluşa ait, özellikle mevcut buluşun OB'lerinin, zararlı böceklerle mücadele etmesi amaçlanan formülasyonun aktif içeriği olduğu bir diğer yöndür.

Mevcut buluşun yönteminin uygulanmasından sonra, Örnek 2'de görülebildiği üzere, karışık bir OB'de taşıyan tüm ODV'lerin bir genotip karışımına sahip olmasında gerek yoktur; bazıları sadece bir türün genomuna sahip olan nükleokapsidleri içerecektir, diğer ODV'ler, tüm genomları, bakulovirüsün bir ikinci türüne ait olduğu nükleokapsidleri içerecektir ve bir üçüncü tür, karışık virüs ODV'leri olacaktır, burada en az iki farklı türün genomları aynı viryonda mevcut olacaktır. Bu tarz bir ODV karışımına sahip bir OB, mevcut buluşun bir OB'sinin bir örneği olarak Şekil 7'de temsil edilmiştir. İki veya ikiden fazla farklı türün genomunun taşıdığı en az bir ODV'yi içeren tüm OB'lerin, mevcut buluşun kapsamıyla kapsandığını belirtmek gerekmektedir, fakat bir aynı OB içerisinde mevcut tüm ODV'lerin, mevcut buluşun bir OB'si olacak olan OB'nin farklı genomları içermesi gerekli değildir. Ayrıca her bir tanımlı ODV'nin sadece tek bir türün genomları içerdikleri, fakat en az iki farklı türün genomları içeren ODV'lerinin birlikte taşıdığı OB'ler, mevcut buluşun OB'lerdir.

Benzer bir şekilde, mevcut buluşun bileşimleri, birlikte sarımlanan iki veya ikiden fazla farklı çok sayıda nükleopolihedrovirüs türünün genomları içeren en az bir ODV'nin taşıdığı en az bir OB'i içerenlerdir ve tek bir türün genomlarına sahip nükleokapsidleri içeren ODV'lerin taşıdığı, fakat her bir ODV'nin farklı bir türe ait olduğu en az bir OB'yi içeren bileşimlerdir. Tüm OB'lerin, mevcut buluşun kapsamıyla kapsanacak olan bileşimin farklı türlerinin birlikte tanımlı bakulovirüslerine sahip olması gereklidir. Aslında, Örnekler 2 ve 3'te görülebildiği üzere, mevcut buluşun yönteminin uygulanması, bunları en az bir fraksiyonunun, virüs türlerinin tek bir tipini içerebildiği yavru OB'lere neden olmaktadır, bir başka ifadeyle bazı OB'ler, inoküle edilmiş sadece bir bakulovirüs türünün genomları içermektedir ve bazı OB'ler, her bir ODV'nin, sadece bir genotipin genomları içerdikleri ODV'leri içerebilmektedir, fakat bir aynı OB'de dahil olan farklı ODV'lerin genotipleri farklılabilmektedir. Ek olarak,

mevcut buluşun karşılaştırdığı ODV'leri içeren bileşimler ayrı ayrı mevcut buluşun bileşimleridir ve mevcut buluşun kapsamı içerisinde kapsamaktadır.

5 Mevcut buluşun yöntemi ile elde edilen oklüzyon korları, bakteriyovirüslerin OB'lerinin karakteristiği olan özelliklere sahip olduğu için, mevcut başvurunun örneklerinde kullanılan filtrasyon tekniği ve farklı santrifüjleme gibi teknikte bilinen herhangi bir teknik ile üretilebildikleri enfekte larvalardan ekstrakte edilebilmekte ve/veya saflaştırılabilmektedirler. Bunlar, arzu edildiği gibi, zararlı böceklerin istilalarıyla mücadele etmek üzere kullanılmak için uygun olan farklı bileşimlere neden olan katı veya sıvı formülasyonlar olarak (örneğin, bir 10 sulu, toz veya granüler formülasyon olarak) formüle edilebilmektedir.

Mevcut buluşun bileşimleri, tek başına bileşen virüslerinden birisine kıyasla tek bir OB inokülüm türünü kullanarak enfekte edebildikleri ve öldürebildikleri böcek türü sayısını özelliğine sahiptir. Buna, tek başına virüs türlerinin bileşenlerinininkinden farklı olan bir konak 15 aralığına sahip olan farklı virüs türlerinin karşımlarını içeren ODV'ler ve OB'ler kullanılarak ulaşılmaktadır. Bu sebepten ötürü, mevcut buluşun OB'leri ve/veya mevcut buluşun bileşimleri, zararlı böceklerle mücadele edecek şekilde kullanılabilmektedir. Özellikle, karşılaştırdığı virüs OB'lerinin veya karşılaştırdığı virüs ODV'lerinin tek bir uygulaması kullanılarak iki veya ikiden fazla zararlı böcek türüyle mücadele edecek şekilde kullanılabilmektedir. Zararlı böcek 20 istilalarından korumayı veya bu istilaların kontrolünü gerektiren substrat, bir bitki, bir mahsul, bir yetiştirme alanı veya bir depolanmış ürün veya benzeri veya bir zararlı böceğin bir gıda kaynağı olan bir diğer substrat olabilmektedir. Genel olarak, OB'lerin veya mevcut buluşun ve/veya mevcut buluşun bir bileşiminin, bir zararlı böcekle mücadele edecek şekilde kullanılması halinde, insektisit formülasyonunun aktif içeriği (veya aktif içeriklerinden birisi) 25 olacaktır.

Örneğin, OB bileşimleri, sulu süspansiyonlar formunda olduğunda, bitkilere püskürtülebilmektedirler. Biyolojik insektisidler olarak kullanılacak olan OB bileşimleri de havayla püskürtme, toprakla püskürtme, toz uygulaması, sulama suyunda uygulama gibi 30 diğer yöntemler vasıtasıyla, sis, buğu vasıtasıyla veya virüs ile öldürülen böceklerin veya bunların parçalarının inokülasyonu vasıtasıyla uygulanabilmektedir.

Mevcut buluşun OB bileşimlerinde, tarımsal olarak uygun ekşiyanlar ve/veya adjuvanlar gibi diğer bileşikler mevcut olabilmektedir, özellikle arzu edilen uygulama yöntemine göre uygun 35 formda uygulanacak olan bileşim preparasyonuna olanak sağlamasından dolayı adjuvanlar

olarak görülebilen bileşikler mevcut olabilmektedir. Ayrıca bileşim, örneğin bir suni gübreyi veya bir diğer pestisidi veya OB'lerin buluşu ile oluşturulabilen bir bileşiği içerebilmektedir.

5 Yukarıda açıklandığı üzere, serbest ODV'ler, oral olarak inoküle edildiklerinde bir enfeksiyona mahal verebilmektedir. Bu şekilde, mevcut buluşun karşıt virüs ODV'lerini içeren bileşimler de biyolojik insektisidler, ayrıca karşıt virüs OB'lerini ve karşıt virüs ODV'leri içeren bileşimler olarak kullanılabilir. Zararlı böceklerle mücadele etmek üzere mevcut buluşun OB bileşimlerinin kullanımı hakkında verilen kapsamlar da mevcut buluşa ait, örneğin karşıt virüs ODV'lerini içeren bileşimler ve karşıt virüs OB'lerini ve serbest karşıt virüs ODV'lerini içeren bileşimleri: uygulama yöntemlerine, zararlı böcek istilalarından korunmaya veya bunlarla mücadele etmeye yönelik substratlar, aynı bileşimde mevcut olabilen diğer bileşikler için uygulanabilmektedir.

15 Mevcut başvurunun Örneklerinde görülebildiği üzere, farklı türde genomları içeren viryonlar, mevcut buluşun OB'lerini üretmek üzere böceklerle (tercihen enjeksiyon vasıtasıyla) aşılacak şekilde kullanılabilir. Bunlar, birlikte enfeksiyon deneyleri için kullanılabilir veya arzu edilen uygulama koşullarına ve her bir bakulovirüs uygulama sırası veya OB'lerin elde edilen bileşiminde her bir bakulovirüsün arzu edilen oranı ile karşıt OB'leri elde edecek şekilde uygulanan iki bakulovirüslerin uygulaması arasındaki gecikmeye bağlı olarak bir karşıt OB bileşimini elde etmek üzere her bir virüs türünün oranını karar verecek şekilde faydalı bilgiyi sağlayabilen deneylerin sonucu olabilmektedirler. Bu sebepten ötürü, iki veya ikiden fazla çoklu nükleopolihedrovirüs türünün genomları içeren oklüzyon viryonlarında (ODV'ler) mevcut buluşun bir yönüdür.

25

Buluş, aşağıdaki örneklerle ve şekillerle daha kapsamlı bir şekilde açıklanacaktır.

ÖRNEKLER

30 - PCR

PCR deneyleri, aşağıda Tablo 1'de gösterilen primerler kullanılarak uygulanmıştır.

35

Tablo 1

Primerler	Sekanslar	(Genomdaki nükleotidleri) güçlendirmeye yönelik fragman lokalizasyonu	Amplifikasyonun amacı
Seie0.1 (İleri)	5'-CTATAGCTCGACGCTCGGTG- 3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1)	SeUS2-A'nın ie0 geni (nt 131937-131959)	SeUS2-A DNA'nın kantifikasyonu
Seie0.2 (Geri)	5'-ATCGTCTTCGATACCGCGAG-3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2)	SeUS2-A'nın ie0 geni (nt 132447-132428)	SeUS2-A DNA'nın kantifikasyonu
Sfie0.1 (İleri)	5'-ATGAGTATTAATCATGATTC-3 ' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 3)	SfNIC-B'nin ie0 geni (nt 130128-130147)	SfNIC-C'nin DNA'nın kantifikasyonu
Sfie0.2 (Geri)	5'-TCTTGCAAATGTTACACTG-3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4)	SfNIC-B'nin ie0 geni (nt 129612-129631)	SfNIC-C'nin DNA'nın kantifikasyonu
qSe5.F (İleri)	5'-AGCAGCGAGCCAATGCAGTA-3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5)	SeUS5-A'nın sf5 geni (nt 6274-6293)	SeUS2-A DNA'sının kantifikasyonu (qPCR)
qSe 5.R (Geri)	5'- CTTCTTGCAACCGCTCGTTC-3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 6)	SeUS2-A'nın se5 geni (nt 6354-6373)	SeUS2-A DNA'sının kantifikasyonu (qPCR)
qSfCath.2F (İleri)	5'-ACGCCGCGTTTAGTAACAGC-3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7)	SfNIC-C'nin silinmiş bölgesinin yakını	SfNIC-C'nin DNA'sının kantifikasyonu (qPCR)
qSfCsf36.2R (Geri)	5'-TAAACTATTCTTGCAATC-3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8)	(nt 18717-18736) SfNIC-C'nin silinmiş bölgesinin yakını	SfNIC-C'nin DNA'sının kantifikasyonu (qPCR)
Ac.1 (İleri)	5'-GATTTGTTGGCCGAATAACG-3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 9)	(nt 35150-35169) AcC6'nin özgün geni ac97 (nt 84850-84869)	AcC6 DNA'sının kantifikasyonu (qPCR).
Ac.2 (Geri)	5'-TGACTCTTTCACCCATTGCAG- 3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10)	AcC6'nin özgün geni ac97 (nt 84958-84938)	AcC6 DNA'sının kantifikasyonu (qPCR).
Sf.1 (İleri)	5'-ACGCCGTTCAAAGACACGAG-3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 11)	SfNIC-B'nin özgün geni sf43 (nt 42832-42851)	SfNIC-B'nin DNA'sının kantifikasyonu (qPCR).

Sf.2 (Geri)	5'-CCGCTTTGCCTTCGACATAG-3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 12)	SfNIC-B'nin özgün geni sf43 (nt 42976-42957)	SfNIC-B'nin DNA'sının (qPCR) kantifikasyonu
AcDNApol.1 (İleri)	5'-CAAATGTAGAATCTGTGTCG-3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13)	AcC6'nın DNA polimeraz geni (nt 53264-53283)	Hücre kültürü plaklarında AcC6 DNA'sının tespiti.
AcDNApol.2 (Geri)	5'-CAGCCATCACAAACACGCGC-3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14)	AcC6'nın DNA polimeraz geni (nt 53968-53949)	Hücre kültürü plaklarında AcC6 DNA'sının tespiti.
SfDNApol.3 (İleri)	5'-CAACGACATCAATAGAGTGC-3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 15)	SfNIC-B'nin DNA polimeraz geni (nt 88358-88377)	Hücre kültürü plaklarında SfNIC-B DNA'sının tespiti.
SfDNApol.4 (Geri)	5'-AAATATTGCTAAGCACATCG-3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 16)	SfNIC-B'nin DNA polimeraz geni (nt 89322-89303)	Hücre kültürü plaklarında SfNIC-B DNA'sının tespiti.

- DNA ekstraksiyonu, sindirimi ve analizi

Viryonlar, 500 µl nihai bir hacimde 100µl 0.5 M Na₂CO₃, 50 µl %10 (ağırlık/hacim cinsinden) sodyum dodesil sülfata sahip 10⁹ OBs/ml içeren 100 µl OB süspansiyonu karıştırılarak ve 60°C'de 10 dakikalığına inkübe edilerek OB'lerden salınmıştır. Çözülmemiş OB'ler ve diğer çöküntü, düşük hızda santrifüjleme (3,800 x g, 5 dakika) ile çıkarılmıştır. Viryonlar içeren süpernatant, 50°C'de 1 saatliğine 25 µl proteinaz (K) (20 mg/ml) ile işlenmiştir. Viral DNA, doymuş fenol ile iki defa ve kloroform ile bir defa ekstrakte edilmiştir ve alkol çöküntüsü ile sulu fazdan izole edilmiştir. Topak, 60°C'de 10 dakikalığına 50 ila 100 µl 0.1x TE tamponunda (Tris-EDTA, pH 8) süspanse edilmiştir. DNA konsantrasyonu, 260 nm'de optik soğurum okunarak öngörülmüştür.

Endonükleaz kısıtlama analizi için, 2 µg viral DNA, 10 U enzimi *Pst*I (Takara) ile karıştırılmış ve 37°C'de 12 saatliğine inkübe edilmiştir. Reaksiyonlar, 4 µl yükleme tamponu eklentisi (%0.25 ağırlık/hacim cinsinden bromofenol mavisi, %40 ağırlık/hacim cinsinden sakaroz) ile durdurulmuştur. Elektroforez, 10 ila 24 saatliğine 20 V'de TAE tamponunda (0.04 M Trisasetat, 0.001 M EDTA, pH 8.0) yatay %1 agaroz jeller kullanılarak uygulanmıştır. DNA fragmanları etidyum bromür ile boyanmıştır ve bir UV transillüminatöründe görselleştirilmiştir (Chemi-Doc, BioRad, California, ABD).

- Örnek 1: *S. exigua* MNPV (SeMNPV) ve *S. frugiperda* MNPV'nin (SfMNPV) *pif* genleri arasındaki uyumluluk

Bu örnekte, iki bakulovirüs türünün, aynı hücrede kopyalanabildiğine ve ODV'de konumlandıkları ve bakulovirüslerin peroral iletimi için temel olan iki proteini (PIF1 ve PIF2) paylaşabildiklerine dair kanıtlanmaktadır

A) Mevcut örneğin deneylerinde kullanılan iki virüs, aşağıdaki gibidir:

- ***Spodoptera exigua* MNPV (SeMNPV), SeUS2-A varyantı** SeMNPV'nin SeUS2-A varyantı nükleopolihedrovirüs SeMNPV'nin en az dört genotipik varyantı en az dört genotipik varyantları (Muñoz ve diğ., 1999) bir heterojen karışımı içeren, pancar kurdunun (*Spodoptera exigua*) larvalarını enfekte eden ve öldüren insektisid Spod-X® (Certis ABD, LLC) biyoinsektisidin temeli olan Florida'dan SeUS-2-A izolatından kaynaklanmaktadır. SeUS2-A, işlenmiş larvaları yaklaşık olarak %10'unu öldürmüş olan OB'lerin bir düşük dozunu (LD₁₀) sindiren *S. exigua*'nın larvalarını *in vivo* klonlama ile elde edilmiştir. SeUS2-A, SeUS2 izolatında mevcut daha bol varyantı ve sadece *S. exigua* larvaları için etkilisidir. Bu varyant ayrı Se301 hücre dizisinde *in vitro* çoğalabilmektedir.
- ***Spodoptera frugiperda* MNPV (SfMNPV), SfNIC-C varyantı** SfNIC-C varyantı en az dokuz genotipik varyantları bir heterojen karışımı içeren (Simón ve diğ., 2004b), genetik olarak ve fenotipik olarak karakterize edilen SfMNPV'nin bir Nikaragua izolatından kaynaklanmaktadır (Simón ve diğ., 2005a,b; 2011; 2012). SfNIC-C, Sf9 hücrelerinde *in vitro* klonlama ile izole edilmiştir (Simón ve diğ., 2004b). Bu varyant, *pif1* ve *pif2* genlerini elimine eden bir ~16 kb genomik delesyona sahiptir, bu da bu varyantı, sindirim ile etkisiz olduğu anlamına gelmektedir, fakat duyarlı konak böceklerine inokülüm enjeksiyonundan sonra bir üretken enfeksiyonunu üretebilmektedir. Bu varyantı hücre dizilerinde (Sf21 ve Sf9) çoğalabilmektedir.

SeMNPV ve SfMNPV, alfabakulovirüslerin filogenetik olarak ilişkili bir grubuna aittir (Grup II; Herniou ve diğ., 2004), enfekte edebildikleri konak türlerde farklılıklar gösterebilmektedirler. SeMNPV, *S. exigua* larvalarına özgü olurken, SfMNPV, *S. frugiperda* larvalarını normal bir şekilde enfekte etmektedir, fakat *S. exigua* larvalarını enfekte edebilmektedirler. SfMNPV ile *S. exigua*'nın ölümcül enfeksiyonu, bir kaç

OB'lerin üretimine neden olmaktadır ve böcek derisi, ölümden sonra parçalanmamaktadır (Simón ve diğ., 2004a).

B) Genomik DNA'nın endonükleaz kısıtlama analizi ile SeUS2-A ve SfNIC-C'nin farklılaşması

SeUS2-A ve SfNIC-C, elektroforez *Pst*I (Takara) kısıtlamasıyla genomik DNA işlemi, bundan sonra bir agaroz jelinde elektroforez ile farklılaşabilmektedir. Her bir genomik DNA'dan elde edilen kısıtlama profilleri net bir şekilde ayrılmış ve bir numunede söz konusu genomlardan birisinin (veya her ikisinin) mevcudiyetinin tanımlanması olarak sağlamaktadır (bkz. Şekil 2).

C) SeUS2-A kullanılarak *pif1/pif2* tamamlama deneyleri ve delesyon genotipi SfNIC-C.

S. exigua dördüncü dönem larvaları SeUS2-A ve SfNIC-C ODV'lerin bir karışımını (her bir virüsün OB'lerinin eşit sayılarla karıştırılarak elde edilmektedir) intrahemokoelek enjeksiyon ile inoküle edilmiştir. Enjekte larvalar, ölüm ve elde edilen OB'ler, öncesinde açıklanan yöntem ile toplanana (Caballero ve diğ., 1992) kadar Greene ve diğ. (1976)

tarafından açıklandığı üzere buğday tohumu, maya ve soya fasulyesine bağlı olarak sentetik diyetle bireysel olarak yetiştirilmiştir. Kısıtlama için steril suda kadavraların homojeneizasyonundan ve filtrasyon ve diferansiyel santrifüjleme ile elde edilen süspansiyondan saflaştırılmadan sonra ölü larvalardan ekstrakte edilmişlerdir.

Bu OB'lerden ekstrakte edilen DNA analizi, SeUS2-A varyantının mevcudiyeti ile tutarlı olmuştur, fakat kısıtlama profilinde herhangi bir SfNIC-C kanı gözlemlenmemiştir (Şekil 3, aynı deneyin birinci ve ikinci tekrarı tekabül eden Şeritler 3 ve 5). Varyanta özgü primerler (Tablo 1: Sfie0.1 ve Sfie0.2, bir başka ifadeyle SEKANS KİMLİK NUMARASI:3 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:4) kullanarak PCR amplifikasyonu, küçük miktarda SfNIC-C genomik DNA'nın, enjekte *S. exigua* larvalarında (Şekil 4, şeritler 3 ve 5) üretilen OB'lerden ekstrakte edilen DNA mevcut olduğunu ortaya çıkarmıştır

Bu OB'ler, 10^7 ve 10^9 OBs/mL konsantrasyonlarında *S. frugiperda* ikinci larvalara beslenmiştir. İnoküle larvalar, diyetle bireysel olarak yetiştirildiğinde, sırasıyla %30 ve %50 polihedroz hastalığından kaynaklanan mortaliteler gözlemlenmiştir. Virüs tarafından öldürülmüş *S. frugiperda* larvalarından toplanan OB'lerden DNA'nın PCR'si ve

*Pst*I analizleri, tek başına SfNIC-C genotip mevcudiyeti ile tutarlı olmuştur; SeUS2-A DNA mevcudiyetini gösterecek herhangi bir kanı gözlemlenmemiştir. Bu sonuç, genotipe özgü primerlerle (sırasıyla Seie0.1 ve Seie0.2, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2) yüksek derecede duyarlı kantitatif (gerçek zamanlı) PCR tekniği (qPCR) kullanılarak onaylanmıştır. SeUS2-A'nın genom fragmanlarının herhangi bir amplifikasyonu tespit edilmemiştir (bkz. Şekil 4, şeritler 10 ve 12).

Bu sonuçlar, SeUS2-A'nın *S. frugiperda* larvalarında çoğalamadığını göstermektedir, bu da deneysel karışık virüs popülasyonundan SeUS2-A varyantının eliminasyonuna neden olmuştur. Bu sonuçlar ayrıca SfNIC-C genotipinin, bu proteinlerin yoksunluğunda olmasından dolayı perol olarak inoküle *S. frugiperda* larvalarında orta bağırsak hücrelerinde primer enfeksiyonunu başlatmak üzere SeUS2-A ile üretilen PIF1 ve PIF2 proteinlerinden avantaj sağlayabildiğini göstermektedir. Bu şekilde, SfNIC-C'yi içeren ODV'lerin, PIF1 ve PIF2'yi edinebildiği tek yol, SfNIC-C ve SeUS2-A olması halinde, aynı *S. exigua* hücrelerinde eş zamanlı olarak çoğaltılacaktır. Her bir virüsün genomları arasındaki pif-1/pif-2 bölgesinin rekombinasyonunu içeren alternatif bir hipotez, *S. frugiperda* larvalarında (tek başına SfNIC-C genotipini içeren) üretilen OB'lerin ikinci jenerasyonunun, *S. frugiperda* larvalarında ağzından etkisizdir, bu da PIF1 ve PIF2 proteinlerinin, birlikte enfekte *S. exigua* larvalarında üretilen OB'lerin inokülasyonundan sonra SfNIC-C genotipi ile üretildiğini göstermektedir.

Bu sebepten ötürü, bu yöntemle, mucitler, bakulovirüslerin iki yakından ilişkili türü ile *S. exigua* hücrelerinin birlikte enfeksiyonunu göstermiştir: SeMNPV ve SfMNPV.

Bu sonuçlardan, aşağıdakilerin sonucuna varılabilmektedir:

- (a) Bir *S. exigua* hücresi, iki virüs türü ile eş zamanlı olarak enfekte edilebilmektedir, her ikisi de çoğalabilmektedir.
- (b) PIF1 ve PIF2 proteinleri, *S. frugiperda* larvalarında SfNIC-C (*pif* genlerinden mahrumdurlar) ağzından bulaşıcı olarak kurtarabilmektedir.

Ç) *Spodoptera exigua* larvalarında ardışık geçişlerden sonra karışık virüs OB'lerinde tanımlanması SeUS2-A ve SfNIC-C için

SeUS2-A ve SfNIC-C'nin ODV'lerinin karışımları ile enjekte edilmiş olan larvalarda üretilen karışık virüs OB'leri (bkz. Bölüm C), ağzından *S. exigua* larvalarında alt ardışık geçişi (P₁ ila P₆) içeren bir deneyde inokülüm olarak kullanılmıştır (Geçiş 0, P₀: SeUS2-A OBs ve SfNIC-C OB'lerin 1:1 oranında karışımlarından salınan ODV'ler kullanılarak *S. exigua* larvalarında birlikte enfeksiyonu ile elde edilmektedir).

Her bir geçişte (P₀ ila P₆) toplanan OB'lerde nispeten bol olan bu virüslerdeki değişimleri belirlemek için, DNA, OB numunelerinden ekstrakte edilmiştir ve bir ABI PRISM 7900HT ile döngüleyicide SYBR Green (Takara) ile qPCR'ye tabi tutulmuştur. DNA, her bir geçişte numune alınan OB'lerden ekstrakte edilmiştir ve qPCR kantifikasyonuna tabi tutulmuştur; sonuçlar, 100 nanogram SeUS2-A genomik DNA başına SfNIC-C genomik DNA nanogramları

olarak gösterilmektedir.

SeUS2-A DNA'nın amplifikasyonu için, spesifik primerler kullanılmıştır (qSe5.F ve qSe5.R, sırasıyla SEKANS KİMLİK NUMARASI:5 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:6), SeMNPV'ye özgün *se5* geninde hedeflenmiştir. SfNIC-C DNA'nın amplifikasyonuna, bu virüste 16 kb delesyonun yukarıda yönde ve aşağı yönde 50 nükleodini (nt) güçlendirmiş olan spesifik primerler (qSfCcath.2F ve qSfCsf36.2R, sırasıyla SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:8) kullanılarak ulaşılmıştır. Kalibrasyon eğrileri, öncesinde bahsi geçen primer çifti kullanılarak SeUS2-A veya SfNIC-C DNA'nın klonlanmış fragmanları içeren plazmid DNA amplifikasyonu ile üretilmiştir. Plazmid DNA, spektrofotometri ile ölçülmüş ve 10^{-1} ng a 10^{-9} ng DNA bölgesinde bir kalibrasyon eğrisini üretmek üzere on kat seri seyreltiye tabi tutulmuştur. Primer hibridizasyon sıcaklığı 60°C olmuştur ve uzatma süresi 30 saniye olmuştur.

Tek virüs OB'lerinden ekstrakte DNA sadece, ilgili virüsü hedef alan primerleri içeren qPCR reaksiyonlarında pozitif amplifikasyon üretmiştir. P_0 'ın OB'lerinden ekstrakte edilmiş DNA numunelerinin, SeUS2-A DNA'nın 95.13 ± 1.25 'ini (ortalama $\pm$ standart hata [SE]) ve SfNIC-C DNA'nın 4.87 ± 1.25 'ini içerdiği öngörülmüştür. P_1 , P_2 , P_3 , P_4 , P_5 ve P_6 'da numunesi alınan OB'lerden ekstrakte edilmiş SfNIC-C DNA yüzdesi, sırasıyla 1.17 ± 0.45 , 0.23 ± 0.04 , 0.10 ± 0.06 , 0.09 ± 0.04 , 0.03 ± 0.01 ve 0.01 ± 0.004 değerleriyle ilerleyen bir şekilde düşmüştür.

- Örnek 2: İki bakulovirüs türünün genomlarının birlikte tanımlanması ve birlikte sarılması

Bu deneylerde kullanılan iki virüsleri aşağıdaki gibi olmuştur:

- **Autographa californica çoklu nükleopolihedrovirüs (AcMNPV).** AcMNPV, *Alphabaculovirus* geninin türüdür. Grup I NPV'lere ait olan, BV membranında bir glikoprotein (GP64) mevcudiyeti ile karakterize edilen bir çoklu kapsid virüsüdür. Mevcut çalışmada, tamamen sıralanmış birinci bakulovirüs genomu olan klonlanmış genotip AcC6 kullanılmıştır (GenBank erişim numarası U22858; Ayres ve diğ., 1994). Bu virüs, Sf21 ve Sf9 hücre dizilerinde iyi çoğalmaktadır ve *S. frugiperda* larvalarında bir üretken ölümcül enfeksiyonu üretebilmektedir.

- **Spodoptera frugiperda çoklu nükleopolihedrovirüs (SfMNPV).** Bu, BV'de F

proteininin mevcudiyeti ile karakterize edilen bir Grup II NPV'dir (Herniou ve diğ., 2004) ve bu şekilde, AcMNPV'den filogenetik olarak mesafelidir. Mevcut çalışmada, SfNIC-B isimli, Nikaragua'dan sokak türü izolatta (SfNIC) mevcut en bol genotip olan *in vitro* klon kullanılmıştır (Simón ve diğ., 2004b). SfNIC-B, bir tam genomdur (GenBank erişim numarası HM595733.1, Simón ve diğ., 2012) ve *S. frugiperda* larvalarına ağızdan bulaştırılmıştır.

A) SfNIC-B ve AcMNPV genomları taşıyan karışık virüs ODV'lerin ve OB'lerin üretimi

10 Karışık virüs ODV'leri ve OB'leri üretmek için, *S. frugiperda* dördüncü dönem larvaları damlatılarak besleme yöntemi kullanılarak her bir virüsün 5×10^7 OB/ml bir konsantrasyonunda bir 1:1 oranında SfNIC-B OB'lerin ve AcMNPV OB'lerin karışımları ile inoküle edilmiştir (Hughes & Wood, 1986). *S. frugiperda* larvaları her iki virüse duyarlıdır. 24 larvalı gruplar inoküle edilmiştir ve deney, üç defa uygulanmıştır. İnoküle larvalar, ölüme 15 kadar karanlıkta kontrol edilen sıcaklıkta (25 °C) Örnek 1'de kullanılan yarı-sentetik laboratuvar diyetinde bireysel olarak yetiştirilmiştir. OB'ler, enfekte kadavralardan toplanmıştır ve öncesinde açıldığında üzerine filtrasyon ve santrifüjleme ile saflaştırılmıştır (Muñoz ve diğ., 1998).

20 Bu OB'lerde her iki virüsün mevcudiyetini onaylamak için, genomik DNA ekstrakte edilmiştir ve SfNIC-B DNA'yı güçlendirmek üzere SfDNApol.3 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:15) ve SfDNApol.4 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:16) primerleri veya AcMNPV DNA'yı güçlendirmek üzere AcDNApol.1 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:13) ve AcDNApol.2 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:14) primerlerini kullanarak PCR amplifikasyonuna tabi tutulmuştur.

25 AcMNPV DNA amplifikasyonu, 704 bp bir ürüne neden olurken, SfNIC-B DNA'nın amplifikasyonu, 964 bp bir ürüne neden olmuştur (Şekil 6). OB'lerden ekstrakte edilmiş DNA numunelerinde her iki virüsün genomik DNA mevcudiyetinin tespiti, her iki virüsün, inoküle böceklerde çoğaldığını göstermektedir.

30 ODV'lerde her iki virüsün birlikte sarılması ve OB'lerde birlikte tıkanmayla göstermek için, ODV'ler, 28 °C'de 30 dakika esnasında 0.1 M sodyum karbonat çözeltisinin bir eşit hacmi kullanılarak alkalini ile OB süspansiyonunun (10^8 OB/ml) işlenmesi vasıtasıyla salınmaktadır. ODV'ler, öncesinde açıldığında üzerine (King ve diğ., 1992) Sf9 hücreleri (Invitrogen, Kat no. 35 B825-01) kullanılarak plak deneyine tabi tutulmuştur. Bundan dolayı seri seyreltiler (10^{-1} -

10⁻⁶) uygulanmış ve her bir süspansiyonun 200 µl hacimleri, bir hücre kültürü çanağında haznelerinde 10⁶ Sf9 hücrelere yerleştirilmiştir. İnoküle hücreler, 1 saatliğine bir orbital çalkayıcıda inkübe edilmiştir. Daha sonrasında ortam çıkarılmış ve %10 fetal buzağı serumu ile TC100'de 2 ml %1 agaroz, her bir hazneye yerleştirilmiştir. Daha sonrasında, hücre kültürü plakları 5 ila 6 günlüğüne 28 °C'de inkübe edilmiştir. Net olarak izole edilmiş plaklar toplanmış, proteinaz (K) ile işlenmiş ve SfNIC-B'ye özgü primerler (SfDNApol.3 ve SfDNApol.4) veya AcMNPV'ye özgü primerler (AcDNApol.1 ve AcDNApol.2) kullanılarak PCR ile analiz edilmiştir.

Genel olarak, üç tekrardan sonra, klonların %3.82±2.73'ü (ortalama ± standart sapma) tek başına AcMNPV'yi içerirken, plakların yaklaşık olarak %48.1±8.9'u, tek başına SfNIC-B'yi içermiş ve plakların kalan yaklaşık %48.1±6.5'i, her iki virüsün bir karışımını içermiştir. Deneyin her bir tekrarda ve ortalama olarak (± standart sapma) elde edilen sonuçlar, aşağıdaki Tablo 2'de gösterilmektedir.

Tablo 2

Virüs	Tekrar %1 (n)	Tekrar %2 (n)	Tekrar %3 (n)	Ortalama ± S.S.
AcMNPV	8.06 (5)	0.98 (1)	4.08 (4)	3.8 ± 2.7
SfMNPV	32.2 (20)	53.9 (55)	52.0 (51)	48.1 ± 8.9
Birlikte tıkanmış	59.6 (37)	45.1 (46)	43.9 (43)	48.1 ± 6.5

n, uygulanan her bir tekrarda AcMNPV, SfMNPV veya her iki virüsün mevcudiyeti ile analiz edilmiş hücre kültürü plaklarının sayısını S.S., standart sapmayı göstermektedir.

Elde edilen karışık virüs ODV'leri taşıyan bir karışık virüs OB'nin bir şematik örneği, Şekil 7'de görülebilmektedir. Bu, sadece her iki virüsün, aynı ODV'de mevcut olması halinde mümkün olacaktır, bu da aynı hücrede çoğalan her iki virüsün, aynı ODV'de birlikte sarıldığını ve aynı OB'de birlikte tıkanıldığını göstermektedir.

Bu sonuçlar, Sf9 hücrelerinde uç nokta seyrelti deneyi ile istatistiksel olarak onaylanmıştır (King ve diğ., 1992). Tek bir ODV ile enfeksiyona, düşük ODV konsantrasyonlarına sahip Sf9 hücrelerinin enfeksiyonundan sonra ulaşılmıştır. Dolayısıyla, haznelerin, ODV'nin etkisiz bir dozu ile inoküle edilmemesi olasılıkları Poisson dağılımına göre hesaplanabilmektedir. Bundan dolayı ODV'ler, her iki virüsle inokülasyondan sonra ölen *S. frugiperda* larvalarından elde edilen bir 10⁹ OB/ml süspansiyonundan salınmıştır. Bu ODV'lerin uç nokta seyrelti deneylerinin sonuçları Tablo 3'te sunulmaktadır.

Tablo 3. Uç nokta seyrelti deneyinin

	Tekrar 1	Tekrar 2	Tekrar 3
Pozitif/Toplam	12/80	11/90	4/86
P(0)	%85	%88	%95
P(1)	%14	%11	%5
P(2)	%1	%1	%1
P(3)	%0	%0	%0

Pozitif hazneler, bakteriyel enfeksiyonunun (OB'ler) patolojik belirtilerine sahip en az bir hücreyi içerenlerdir. P(0) her bir tekrarda, enfeksiyon belirtileri olmadan bir hazneye sahip olunması da hesaplanmıştır. P(1), P(2) ve P(3), Poisson dağılımı ile öngörülmüştür ve özel bir haznede hücrelerin, sırasıyla bir, iki veya üç ODV ile enfekte edilmesi olasılığını ifade etmektedir.

Enfekte olmayan haznelerin yaklaşık olarak %90'ı ile sonuçlandırılmış bir seyrelti seçilmiştir, bu da tek bir ODV'nin, enfekte haznelerin yaklaşık olarak %10'unda bir enfeksiyonun başlatılmasından sorumlu olacağı ve iki veya ikiden fazla ODV'nin, haznelerin %1'nden daha azında enfeksiyondan sorumlu olacağı bir durumu yansıtmaktadır.

Seçilmiş seyreltide (enfekte olmayan haznelerin %90'ı enfekte olmuş olan tüm hazneler, yukarıda açıklandığı gibi PCR ile analiz edilmiştir. Tüm durumlarda, her iki virüsün mevcudiyeti onaylanmıştır (Şekil 8), olasılıklar teorisinin, her iki virüsün, bu enfeksiyonları başlatan tek ODV'lerinde mevcut olduğunu gerektirdiği bir durumdur.

- Örnek 3: Birinci ve ikinci virüsün inokülasyon arasındaki aralık, enfekte böceklerdeki farklı virüs türlerinin birlikte sarılması ve birlikte tükünmesi prevalansını etkilemektedir

A) Bu deneylerde kullanılan iki virüsler, aşağıdaki gibi olmuştur:

- **Autographa californica çoklu nükleopolihedrovirüs (AcMNPV):** klonlanmış genotip AcC6
- **Spodoptera frugiperda çoklu nükleopolihedrovirüs (SfMNPV):** klonlanmış genotip SfNIC-B

B) Çift olarak enfekte edilmiş *S. frugiperda* larvalarında geçici duyarlılık penceresi: larva mortalitesine dair etkiler

Böcek mortalitesinde iki farklı virüs türü ile enfeksiyon arasındaki aralık etkisini belirlemek için, güncel olarak derisi değişen *S. frugiperda* dördüncü dönem larvaları damlatılarak besleme yöntemi (Hughes & Wood, 1986) kullanılarak bir 5×10^7 OB/ml

birinci virüsün bir süspansiyonu ile oral olarak inoküle edilmiştir. İnoküle edilmiş böcekler, 25 °C'de yarı-sentetik laboratuvar diyetinde bireysel olarak yetiştirilmiştir. İnokülasyondan 12, 24, 48 veya 72 saat sonra, bu larvaların, ikinci virüsün OB'lerinin aynı konsantrasyonunda beslenmesine izin verilmiştir. Tüm durumlarda, 24 larva grubu, her bir işlemde kullanılmıştır ve deney, birinci inokülüm olarak AcC6 OB'ler ve ikinci inokülüm olarak SfNIC-B OB'ler ve tam tersi kullanılarak üç defa uygulanmıştır. Bir defa veya iki defa inoküle edilmiş larvalar, pupasyona veya ölüme kadar yarı-sentetik laboratuvar diyetinde bireysel olarak yetiştirilmiştir.

Polihedroz hastalığından dolayı mortalite prevalansı deneysel işlemler (Varyans Analizi: $F_{10,672}=230$; $p<0.001$) arasında önemli derecede farklılık göstermiştir ve işlemlerin, mortalite yüzdesine önemli derecede farklılık gösteren üç gruptan birisine sınıflandırılmıştır (Tukey dürüstçe anlamlı fark testi, $P\leq 0.05$) (Şekil 9):

- (i) tek başına AcC6 OB'ler ile işlenmiş Larvalar: bu işlem, virüs mortalitesinin en düşük prevalansına neden olmuştur.
- (ii) tek başına SfNIC-B OB'ler ile, karışıklarda her iki virüsün OB'lerinin eş zamanlı uygulaması ile veya SfNIC-B OB'ler ile, bundan sonra AcMNPV OB'ler vasıtasıyla işlenmiş larvalar: tüm bu işlemler, benzer bir şekilde yüksek mortalite prevalansına neden olmuştur.
- (iii) ilk olarak AcC6 OB'ler ve daha sonrasında SfMNPV OB'ler ile işlenmiş larvalar: mortalite prevalansı tek başına AcC6 OB'ler ile işlenmiş larvalarda gözlemlenenden hafifçe, fakat önemli ölçüde daha yüksek olmuştur.

Bu sonuçlar, aynı momentte her iki virüsün eş zamanlı enfeksiyonuna kıyasla, 12 ila 72 saatlik gecikmelerin, öncesinde AcC6 OB'ler ile işlenmiş olan böceklerde SfNIC-B OB'lerin ölümcül etkisinde önemli bir azalmaya neden olduğunu göstermektedir. Enfeksiyonlar arasındaki süre gecikmesi, karışık OB'lerin üretiminde elde edilen mortaliteyi optimize etmek üzere önemli bir faktördür.

C) Farklı aralıklarda farklı virüs türleri ile inoküle edilmiş larvalarda üretilen OB'lerin bileşimi.

Birinci ve ikinci inokülasyon işlemleri arasındaki geçici aralık, DNA ekstraksiyonu, bundan sonra öncesinde açıklandığı gibi virüse özgü primerler kullanılarak (bkz. Tablo 1) her bir virüs DNA'sının qPCR kantifikasyonu ile belirlendiği üzere yavru OB'lerde her bir virüsün oranlarını etkilemektedir. Bu sonuçların istatistiksel analizi, beş ayrı grubunun mevcudiyetini tanımlamıştır (Varyans analizi: $F_{10,75} = 187.57$; $p<0.001$):

- (i) Tek başına AcC6
- (ii) Tek başına SfNIC-B
- (iii) eş zamanlı olarak her iki virüsle ve SfNIC-B OB'leri ile ilk işlemleri içeren tüm işlemlerle işlenmiş larvalar
- (iv) ilk olarak AcC6 OB'leri ile ve 12 veya 24 sonra SfNIC-B OB'leri ile işlenmiş larvalar
- (v) ilk olarak AcC6 OB'leri ile ve 48 veya 72 sonra SfNIC-B OB'leri ile işlenmiş larvalar

İlk olarak AcC6 OB'leri ile ve 24 veya 48 saat sonra SfNIC-B OB'leri ile enfekte edilmiş larvalar, her bir virüsün yaklaşık olarak bir 1:1 oranında içeren yavru OB'leri üretmiştir. Larvalar, iki farklı virüs türü ile inoküle edildiğinde, her iki virüs, virüs tarafından öldürülmüş böceklerden toplanan yavru OB'lerde değişmez bir şekilde mevcut olmuştur.

D) ODV'lerde farklı virüsün birlikte sarılması ve OB'lerde birlikte tıkanma etkileri ODV'lerin virüs bileşimi, Örnek 2'de açıklandığı gibi plak deneyi ile analiz edilmiştir. Birinci ve ikinci inokülasyon arasındaki süre, tek bir türün veya her iki türün genomları (viryonları) oranı arttıkça, inokülasyonlar arasındaki süreye ve birinci veya ikinci virüsün benzerliğine göre birlikte değişkenlik göstermiştir (Şekil 11). Örneğin, AcC6 OB'leri ile bir inokülasyondan 24 saat sonra, SfNIC-B ile inokülasyon, karışık virüs viryonları içerisinde her iki virüsü içeren ODV'lerin yaklaşık olarak %50'si ile yaklaşık olarak %50 AcC6 genomları ve %50 SfNIC-B genomları içeren yavru OB'lere neden olmuştur.

Referanslar

Ahn, M., Song, M., Oh, E., Jamal, A., Kim, H., Ko, K., Choo, Y., Kim, B. & Ko, K. (2008) Production of therapeutic proteins with baculovirus expression system in insect cell. Entomological Research 38: S71-S78.

Arella, M., Devauchelle, G. & Belloncik, S. (1983) Dual infection of a lepidopteran cell line with the cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV) and the Chilo iridescent virus (CIV). Annales de l'Institut Pasteur / Virologie 134: 455-463.

Argaud, O., Croizier, L., López-Ferber, M. & Croizier, G. (1998) Two key mutations in

the host-range specificity domain of the p143 gene of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus are required to kill *Bombyx mori* larvae. *Journal of General Virology* 79: 931-935.

5 Ayres, M.D., Howard, S.C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M. & Possee, R.D. (1994) The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 202: 586-605.

10 Burges, H.D., Croizier, G. & Huber, J. (1980) A review of safety tests on baculoviruses. *Entomophaga* 25: 329-339.

Caballero, P., Zuidema, D., Santiago-Álvarez, C., Vlak, J.M., 1992. Biochemical and biological characterization of four isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Biocontrol Science and Technology*, 2: 145-157.

15 Clavijo, G., Williams, T., Simón, O., Muñoz, D., Cerutti, M., Lopez-Ferber, M. & Caballero, P. (2009) Mixtures of complete and pif1- and pif2-deficient genotypes are required for increased potency of an insect nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology* 83: 5127-5136.

20 Croizier, G., Croizier, L., Argaud, O. & Poudevigne, D. (1994) Extension of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis-virus host range by interspecific replacement of a short DNA-sequence in the P143 helicase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91: 48-52.

25 Garzon, S. & Kurstak, E. (1972). Infection double inhabituelle de cellules d'un arthropode par le virus de la polyédrie nucléaire (VPN) et le virus irisant de *Tipula* (TIV). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. D 275, 507-509.

30 Gröner, A. 1986. Specificity and safety of baculoviruses. In *The Biology of Baculoviruses*. Vol. I. Granados, R.R. and Federici, B.A. (eds). Boca Raton, FL.: CRC Press, s. 177-202.

35 Hamblin, M., Vanbeek, N.A.M., Hughes, P.R. & Wood, H.A. (1990) Coocclusion and persistence of a baculovirus mutant lacking the polyhedrin gene. *Applied and*

Environmental Microbiology 56: 3057-3062.

Harper, D.M. 2009. Currently approved prophylactic HPV vaccines. Expert Review of Vaccines 8: 1663-1679.

5

Herniou, E.A., Olszewski, J.A., O'Reilly, D.R. & Cory, J.S. (2004) Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. Journal of Virology 78: 3244-3251.

10

Hitchman, R.B., Locanto, E., Possee, R.D. & King, L.A. (2011) Optimizing the baculovirus expression vector system. Methods 55: 52-57.

15

Hughes, P.R. & Wood, H.A. (1986) In vivo and in vitro bioassay methods for baculoviruses. In The Biology of Baculoviruses. Vol. II. Granados, R.R. and Federici, B.A. (eds). Boca Raton, FL.: CRC Press, s. 1-30.

20

Inceoglu, A.B., Kamita, S.G., & Hammock, B.D. (2006) Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook. Advances in Virus Research. 68: 323-360.

Jarvis, D.L. Baculovirus-insect cell expression systems (2009). Methods Enzymol. 463:191-222.

25

Jiang, H., Han, Y., Hu, L., Zhang, J. & Hu, Y. (2008) Advances in application of recombinant insect viruses as biopesticides. Acta Entomologica Sinica 51: 322-327.

30

Kaikkonen, M.U., Yla-Herttuala, S. & Airene, K.J. (2011) How to avoid complement attack in baculovirus-mediated gene delivery. Journal of Invertebrate Pathology 107: S71-S79.

Kamita, S.G. & Maeda, S. (1996) Abortive infection of the baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis virus in Sf-9 cells after mutation of the putative DNA helicase gene. Journal of Virology 70: 6244-6250.

35

Kanthong, N., Khemnu, N., Pattanakitsakul, S.-N., Malasit, P. & Flegel, T. (2010) Persistent, triple-virus co-infections in mosquito cells. BMC Microbiology 10: 14.

Kantoff, P.W., Higano, C.S., Shore, N.D. Berger, E.R. Small, E.J. Penson, D.F., Redfern, C.H., Ferrari, A.C., Dreicer, R. Sims, R.B. ve diğ. 2010. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *New England Journal of Medicine* 363: 411-422.

5

King, L.A. & Possee, R. (1992) *The baculovirus expression system. A laboratory guide.* London, United Kingdom: Chapman & Hall.

10

Kondo, A. & Maeda, S. (1991) Host range expansion by recombination of the baculoviruses *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis-virus and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis-virus. *Journal of Virology* 65: 3625-3632.

15

Leuschner, R.G.K., Robinson, T.P., Hugas, M., Cocconcelli, P.S., Richard-Forget, F., Klein, G., Licht, T.R., Nguyen-The, C., Querol, A., Richardson, M., Suarez, J.E., Thrane, U., Vlcek, J.M. & von Wright, A. (2010) Qualified presumption of safety (QPS): a generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). *Trends in Food Science & Technology* 21: 425-435.

20

Lynn D.E. (2007) Available lepidopteran insect cell lines. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 388: 117-138.

25

Lopez-Ferber, M., Simón, O., Williams, T., Caballero, P. (2003). Defective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes. *Proceedings of the Royal Society B* 270: 2249-2255.

30

Madhan, S., Prabakaran, M. & Kwang, J. (2010) Baculovirus as vaccine vectors. *Current Gene Therapy* 10: 201-213.

McClintock, J.T. & Dougherty, E.M. (1987) Superinfection of baculovirus-infected gypsy-moth cells with the nuclear polyhedrosis viruses of *Autographa californica* and *Limantria dispar*. *Virus Research* 7: 351-364.

35

Miller, D.W. (1991) Mixed baculovirus compositions and uses thereof. US Patent 5071748. 10 Aralık 1991 tarihinde verilmiştir.

Moscardi, F. (1999) Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* 44: 257-289.

Muñoz, D., Castillejo, J.I. & Caballero, P. (1998) Naturally occurring deletion mutants are parasitic genotypes in a wild-type nucleopolyhedrovirus population of *Spodoptera exigua*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4372-4377.

Parks, W.P., Casazza, A.M., Alcott, J. & Melnick, J.L. (1968) Adeno-associated satellite virus interference with replication of its helper. *Journal of Experimental Medicine* 127: 91-108.

Rohrmann, G.F. (2008) *Baculovirus Molecular Biology*. Bethesda, MD: National Library of Medicine, ABD.

Salem, T., Cheng, X.H. & Cheng X.W. (2012) AcMNPV enhances infection by ThorNPV in Sf21 cells and SeMNPV in Hi5 cells. *Archives of Virology* 157: 1875-1885.

Simón, O., Williams, T., Lopez-Ferber, M. & Caballero, P. (2004a) Virus entry or the primary infection cycle are not the principal determinants of host specificity of *Spodoptera* spp. nucleopolyhedroviruses. *Journal of General Virology* 85: 2845-2855.

Simón, O., Williams, T., López-Ferber, M. & Caballero, P. (2004b) Genetic structure of a *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus population: High prevalence of deletion genotypes. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 5579-5588.

Simón, O., Williams, T., Lopez-Ferber, M. & Caballero, P. (2005a) Functional importance of deletion mutant genotypes in an insect nucleopolyhedrovirus population. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4254-4262.

Simón, O., Chevenet, F., Williams, T., Caballero, P. & Lopez-Ferber, M. (2005b) Physical and partial genetic map of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) genome. *Virus Genes* 30: 403-417.

Simón, O., Palma, L., Beperet, I., Muñoz, D., Lopez-Ferber, M., Caballero, P. & Williams, T. (2011) Sequence comparison between three geographically distinct

Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus isolates: Detecting positively selected genes. Journal of Invertebrate Pathology 107: 33-42

Simón, O., Palma, L., Williams, T., Lopez-Ferber, M. & Caballero, P. (2012) Analysis of a naturally-occurring deletion mutant of Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus reveals sf58 as a new per os infectivity factor of lepidopteran-infecting baculoviruses. Journal of Invertebrate Pathology 109: 117-126.

Summers, M.D. & Smith, G.E. (1987) A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell-culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin: 1-56.

Sun, X.L. & Peng, H.Y. (2007) Recent advances in biological control of pest insects by using viruses in China. Virologica Sinica 22: 158-162.

Van Oers, M. 2011. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. Journal of Invertebrate Pathology 107: S3-S15.

Watanabe, S., Ohta, M., Kokuho, T., Mori, H. & Inumaru, S. (2010) Rapid and accurate method for isolation of recombinant baculovirus with an expanded host range. Journal of Bioscience and Bioengineering 110: 66-68.

Yanase, T., Yasunaga, C., Hara, T. & Kawarabata, T. (1998) Coinfection of Spodoptera exigua and Spodoptera frugiperda cell lines with the nuclear polyhedrosis viruses of Autographa californica and Spodoptera exigua. Inter-virology 41: 244-252.

SEKANS LİSTESİ

<110> UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA Consejo Superior De Investigaciones Científicas Instituto de Ecología, A.C. ASSOCIATION POUR LA RECHERCHE ET LE DEVELOPPEMENT DES METHOD ES ET PROC-ESSUS INDUSTRIELS (ARMINES)

<120> ZARARLI BÖCEKLERLE MÜCADELE ETMEK ÜZERE KULLANILABİLEN FARKLI BAKULOVİRÜS TÜRLERİNİN GENOMLARINI İÇEREN VİRYONLARI TIKAYAN VİRÜS OKLÜZYON KORLARININ ÜRETİMİ

<130> PCT-724

<160> 16

5 <170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

10 <213> Yapay Sekans

<220>

<221> kaynak

<222> 1..20

15 <223> /mol_tipi="DNA" /not="İleri primer Seie0.1, SeUS2-A'nın DNA'nın miktar ölçümü için"
/not="SeUS2-A'nın ie0 genine dayalı (nt 131937-131959)" /organizma="Yapay Sekans"

<400> 1

ctatagctcg acgctcggtg 20

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Yapay Sekans

25

<220>

<221> kaynak

<222> 1..20

<223> /mol_tipi="DNA" /not="Geri primer Seie0.2, SeUS2-A'nın DNA'nın miktar ölçümü için"
30 /not="SeUS2-A'nın ie0 genine dayalı (nt 132447-132428)" /organizma="Yapay Sekans"

<400> 2

atcgtcttcg ataccgcgag 20

35 <210> 3

<211> 20
<212> DNA
<213> Yapay Sekans

5 <220>
<221> kaynak
<222> 1..20
<223> /mol_tipi="DNA" /not="İleri primer Sfie0.1, SfNIC-C'nin DNA'nın miktar ölçümü için"
/not="SfNIC-B'nin ie0 genine dayalı(nt 130128-130147)" /organizma="Yapay Sekans"

10
<400> 3
atgagtatta atcatgattc 20

<210> 4
15 <211> 20
<212> DNA
<213> Yapay Sekans

<220>
20 <221> kaynak
<222> 1..20
<223> /mol_tipi="DNA" /not="Geri primer Sfie0.2, SfNIC-C'nin DNA'nın miktar ölçümü için"
/not="SfNIC-B'nin ie0 genine dayalı(nt 129612-129631)" /organizma="Yapay Sekans"

25 <400> 4
tcttgcaaa tgttactg 20

<210> 5
<211> 20
30 <212> DNA
<213> Yapay Sekans

<220>
<221> kaynak
35 <222> 1..20

<223> /mol_tipi="DNA" /not="İleri primer qSe5.F, SeUS2-A'nin DNA'nın miktar ölçümü için (qPCR)" /not="SeUS2-A'nın sf5 genine dayalı (nt 6274-6293)" /organizma="Yapay Sekans"

<400> 5

5 agcagcgagc caatgcagta 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

10 <213> Yapay Sekans

<220>

<221> kaynak

<222> 1..20

15 <223> /mol_tipi="DNA" /not="Geri primer qSe5.F, SeUS2-A'nin DNA'nın miktar ölçümü için (qPCR)" /not="SeUS2-A'nın se5 genine dayalı (nt 6354-6373)" /organizma="Yapay Sekans"

<400> 6

cttcttgcaa ccgctcggtc 20

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Yapay Sekans

25

<220>

<221> kaynak

<222> 1..20

30 <223> /mol_tipi="DNA" /not="İleri primer qSfCcath.2F, SfNI C-C'nin DNA miktar ölçümü için (qPCR)" /not="SfNIC-C'nin silinen alanın yakınına dayalı (n t 18717-18736)" /organizma="Yapay Sekans"

<400> 7

acgccgcgtt tagtaacagc 20

35

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Yapay Sekans

5

<220>
<221>
kaynak
<222> 1..20

10 <223> /mol_tipi="DNA" /not="Geri primer qSfCsf36.2R, SfNIC -C'nin DNA miktar ölçümü için (qPCR)"/not="SfNIC-C'nin silinen alanın yakınına dayalı (n t 35150-35169)" /organizma="Yapay Sekans"

<400> 8

15 taaaactatt tcttgcaatc 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA

20 <213> Yapay Sekans

<220>
<221> kaynak
<222> 1..20

25 <223> /mol_tipi="DNA" /not="İleri primer Ac.1, AcC6'nin DNA miktar ölçümü için (qPCR) " /not="AcC6'nin özgün gen ac97'ye dayalı (nt 84850-84869)" /organizma="Yapay Sekans"

<400> 9

gatttggttg ccgaataacg 20

30

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Yapay Sekans

35

<220>
 <221> kaynak
 <222> 1..21
 <223> /mol_tipi="DNA" /not="Geri primer Ac.2, AcC6'nın DNA miktar ölçümü için (qPCR) "
 5 /not="AcC6'nın özgün gen ac97'ye dayalı (nt 84958-84938)" /organizma="Yapay Sekans"

<400> 10
 tgactctttc acccattgca g 21

10 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Yapay Sekans

15 <220>
 <221> kaynak
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipi="DNA" /not="İleri primer Sf.1, SfNIC-B'nin DNA miktar ölçümü için (qPCR)
 " /not="SfNIC-B'nin özgün gen sf43'e dayalı (nt 42832-42851)" /organizma="Yapay Sekans"

20 <400> 11
 acgccgttca aagacacgag 20

25 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Yapay Sekans

30 <220>
 <221> kaynak
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipi="DNA" /not="Geri primer Sf.2, SfNIC-B'nin DNA miktar ölçümü için (qPCR)
 " /not="SfNIC-B'nin özgün gen sf43'e dayalı (nt 42976-42957)" /organizma="Yapay Sekans"

35 <400> 12

ccgctttgcc ttgacatag 20

<210> 13

<211> 20

5 <212> DNA

<213> Yapay Sekans

<220>

<221> kaynak

10 <222> 1..20

<223> /mol_tipi="DNA" /not="AcC6 geni DNA polimeraza dayalı(nt 53264-53283)"
/not="İleri primer AcDNApol.1, cel 1 kültür plaklarında AcC6 DNA algılanması için "
/organizma="Yapay Sekans"

15 <400> 13

caaatgtaga atctgtgtcg 20

<210> 14

<211> 20

20 <212> DNA

<213> Yapay Sekans

<220>

<221> kaynak

25 <222> 1..20

<223> /mol_tipi="DNA" /not=" AcC6 geni DNA polimeraza dayalı(nt 53968-53949)"
/not="Geri primer AcDNApol.2, cel 1 kültür plaklarında AcC6 DNA algılanması için"
/organizma="Yapay Sekans"

30 <400> 14

cagccatcac aaacacgcgc 20

<210> 15

<211> 20

35 <212> DNA

<213> Yapay Sekans

<220>

<221> kaynak

5 <222> 1..20

<223> /mol_tipi="DNA" /not="SfNIC-B geni DNA polimeraza dayalı(nt 88358-88377)"
/not="İleri primer SfDNApol.3, hücre kültür plaklarında SfNIC-B DNA algılanması için"
/organizma="Yapay Sekans"

10 <400> 15

caacgacatc aatagagtgc 20

<210> 16

<211> 20

15 <212> DNA

<213> Yapay Sekans

<220>

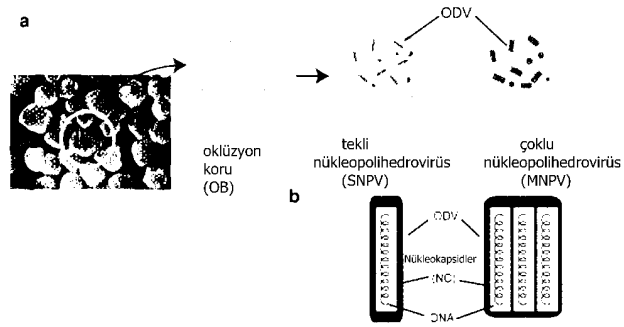
<221> kaynak

20 <222> 1..20

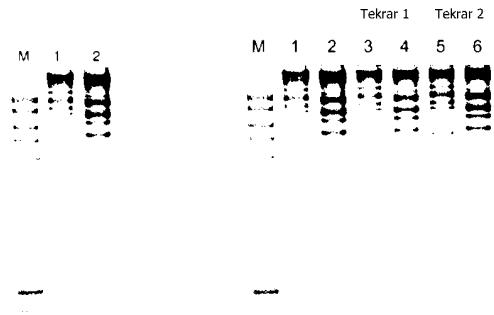
<223> /mol_tipi="DNA" /not="SfNIC-B geni DNA polimeraza dayalı(nt 89322-89303)"
/not="Geri primer SfDNApol.4, hücre kültür plaklarında SfNIC-B DNA algılanması için"
/organizma="Yapay Sekans"

25 <400> 16

aaatattgct aagcacatcg 20

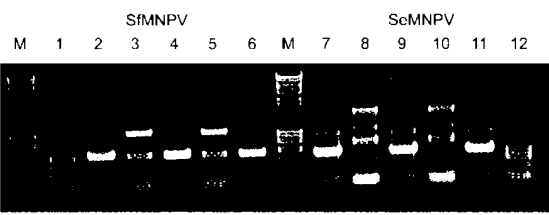


ŞEKİL 1

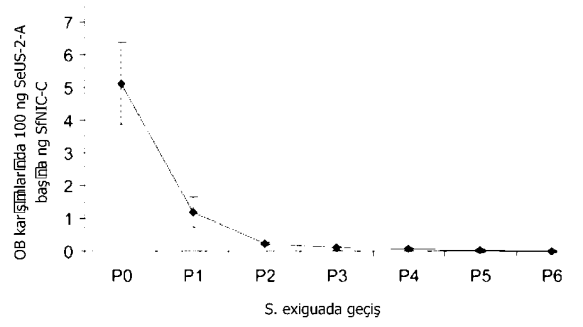


ŞEKİL 2

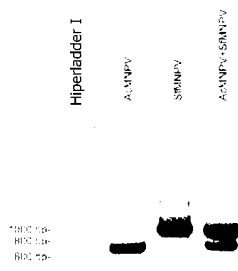
ŞEKİL 3



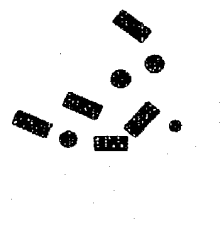
ŞEKİL 4



ŞEKİL 5



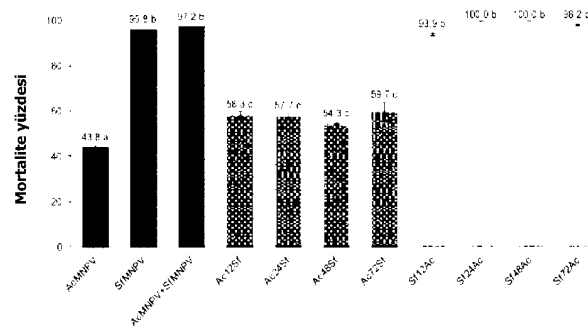
ŞEKİL 6



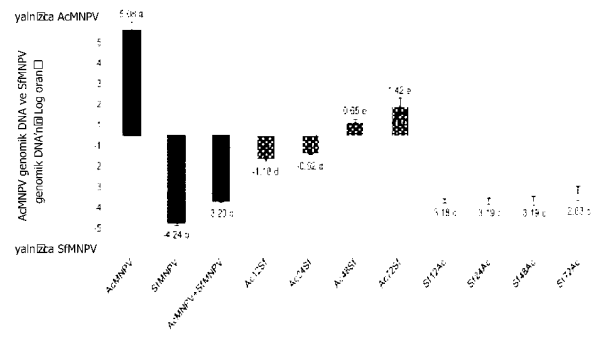
ŞEKİL 7



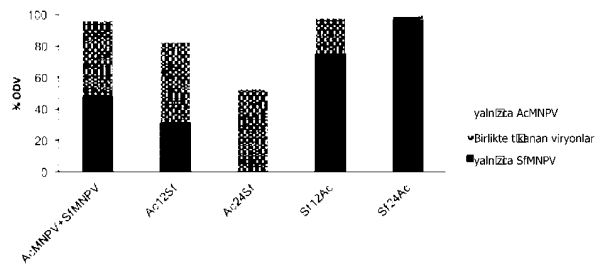
ŞEKİL 8



ŞEKİL 9



ŞEKİL 10



ŞEKİL 11