

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***GRYLLOTALPA GRYLLOTALPA*'DAN ENTOMOPATOJENİK FUNGUSLARIN
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emine SÖNMEZ

HAZİRAN 2012
TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***GRYLLOTALPA GRYLLOTALPA*'DAN ENTOMOPATOJENİK FUNGUSLARIN
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

Emine SÖNMEZ

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 25.05.2012
Tezin Savunma Tarihi : 13.06.2012**

Tez Danışmanı : Doç. Dr. İsmail DEMİR

Trabzon 2012

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalında
Emine SÖNMEZ tarafından hazırlanan

***GRYLLOTALPA GRYLLOTALPA*'DAN ENTOMOPATOJENİK FUNGUSLARIN**
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 29/05/2012 gün ve 1458 sayılı kararıyla
oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Juri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Üye : Doç. Dr. İsmail DEMİR

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ali SEVİM

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

"Böcek orjinli entomopatojenik fungusların izolasyonu, karakterizasyonu ve virulanslarının belirlenmesi" isimli bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda 'Yüksek Lisans Tezi' olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmalarım sırasında karşılaştığım güçlüklerin aşılmasında beni yönlendiren, her türlü desteği ve imkanı sağlayarak değerli bilgilerinden yararlandırım hocam sayın Doç. Dr. İsmail DEMİR'e, laboratuvarında maddi manevi imkanlarını esirgemeyen hocam sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ'a, laboratuvar çalışmalarım sırasında göstermiş oldukları ilgiden dolayı Doç. Dr. Kazım SEZEN, Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU, çalışmalarım ile yakından ilgilenen ve yardımlarda bulunan Yrd. Doç. Dr. Ali SEVİM'e, Yrd. Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU, Mehtap DANIŞMAZOĞLU, Filiz ÖZKAN ÇAKICI, İslam YILDIZ, Seda KOCAÇEVİK, Zeynep ERBAŞ ve beni yalnız bırakmayan, her zaman yanımda olduklarını hissettiğim diğer laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Aynı zamanda tez çalışmam süresince laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Asım KADIOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca örneklerimin morfolojik tanımlanmasında yardımcı olan Cornell Üniversitesi'nden (Amerika Birleşik Devletleri) Dr. Richard HUMBER'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında 8625 kodlu proje aracılığı ile maddi destek sağlayan KTU BAP Birimine teşekkür ederim.

Son olarak, maddi ve manevi desteklerini daima üzerimde hissettiğim, beni yetiştiren ve bugün olduğum yeri borçlu olduğum annem, babam ve kardeşlerime teşekkürlerimi sunuyorum.

Emine SÖNMEZ
Trabzon 2012

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Gryllotalpa gryllotalpa*’dan Entomopatojenik Fungusların İzolasyonu ve Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. İsmail DEMİR’in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 25/05/2012

Emine SÖNMEZ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER DİZİNİ	XIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Organik Tarım ve Biyolojik Mücadele	4
1.3. Türkiye’de Üretilen Çeşitli Tarım Ürünleri ve Bunların Ekonomideki Yeri.....	5
1.4. <i>Gryllotalpa gryllotalpa</i> (Danaburnu)’nın Biyolojisi ve Zarar Şekli	7
1.4.1 Zararlılarla Genel Mücadele Yöntemleri	8
1.4.2. Kimyasal Mücadele.....	9
1.4.2.1. Kimyasalların Çevreye Olan Etkileri	9
1.4.2.2. İnekstisitlerin İnsanlar Üzerine Olan Etkileri	12
1.4.3. Biyolojik Mücadele	14
1.4.3.1. Biyolojik Mücadelede Kullanılan Etkin Gruplar	16
1.4.3.1.1. Predatörler	16
1.4.3.1.2. Parazitler	16
1.4.3.1.3. Mikroorganizmalar.....	17
1.4.3.1.4. Entomopatojenik Funguslar (EPF).....	19
1.4.3.1.4.1. Entomopatojenik Fungusların Sınıflandırılması	20
1.4.3.1.4.1.1. Entomopatojenik Fungusların Sınıflandırılmasında Kullanılan Özellikler.....	23
1.4.3.1.4.2. Entomopatojenik Fungusların Genel Biyolojileri	23

1.4.3.1.4.3.	Fungal Enfeksiyon	26
1.4.3.1.4.4.	Entomopatojenik Fungusların Etki Şekilleri	27
1.4.3.1.4.5.	Entomopatojenik Fungusların Özgüllüğü ve Konak Seçiciliği.....	29
1.4.3.1.4.6.	Entomopatojenik Fungusların Dağılımı ve Yayılımı	30
1.4.3.1.4.7.	Entomopatojenik Fungusların Avantaj ve Dezavantajları	31
1.4.3.1.4.8.	Fungusların Mikrobiyal Mücadele Etmeni Olarak Kullanımı	32
1.5.	Çalışmanın Amacı	34
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	35
2.1.	Böcek Örneklerinin Toplanması ve Laboratuvara Getirilmesi	35
2.2.	Fungus İzolasyonu	35
2.3.	Saf Kültürlerin Hazırlanması ve Stoklanması.....	36
2.4.	Fungusların Tür Tayinleri	37
2.4.1.	Morfolojik Tür Tayini	37
2.4.1.1.	Agar Blok Kültürü.....	37
2.4.2.	Fungal İzolatların Moleküler Karakterizasyonu	38
2.4.2.1.	DNA İzolasyonu.....	38
2.4.2.2.	rRNA ITS1-5.8S-ITS2 Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması ve Veri Analizleri.....	39
2.4.2.3.	Uzama Faktörü-1-alfa (<i>EF1-α</i>), <i>RPB1</i> , <i>β-Tubulin</i> , , <i>RPB2a</i> , <i>RPB2b</i> ve <i>Bloc</i> Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması.....	40
2.5.	Fungal İzolatların Patojenite Testleri	42
2.5.1.	Spor Süspansiyonlarının Hazırlanması	42
2.5.2.	İzolatların <i>Galleria mellonella</i> Üzerindeki Entomopatojenite Testleri .	42
2.5.3.	İzolatların <i>Gryllotalpa gryllotalpa</i> Üzerindeki Entomopatojenite Testleri.....	43
2.6.	Veri Analizi	43
3.	BULGULAR	45
3.1.	<i>Gryllotalpa gryllotalpa</i> ‘dan Fungus İzolasyonu	45
3.2.	İzolatların Morfolojik Tür Tayinleri	45
3.3.	İzolatların Moleküler Karakterizasyonları	49
3.4.	Patojenite Testleri.....	66
3.4.1.	İzolatların <i>Galleria mellonella</i> Üzerindeki Entomopatojenite Testleri	66
3.4.2.	<i>Gryllotalpa gryllotalpa</i> (Danaburnu)’ya Karşı İnsektisidal Aktivite	

	Testleri.....	68
4.	TARTIŞMA	70
5.	SONUÇLAR	79
6.	ÖNERİLER	80
7.	KAYNAKLAR	82
8.	EKLER.....	94
ÖZGEÇMİŞ		

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

GRYLLOTALPA GRYLLOTALPA'DAN ENTOMOPATOJENİK FUNGUSLARIN
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Emine SÖNMEZ

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. İsmail DEMİR
2012, 93 Sayfa, 16 Sayfa Ek

Bu çalışmada tarım alanlarında önemli ekonomik kayıplara neden olan zararlılara karşı etkili bir fungal etmen tespit etmek amacıyla *Gryllotalpa gryllotalpa*'dan 15 adet fungus izole edildi. Morfolojik (enfeksiyon şekli, koloni morfolojisi, spor şekli) ve moleküler (ITS1-5.8S ITS2 gen bölgesi, *EF1-α*, *RPB1*, *RPB2a*, *RPB2b*, *Bloc* ve *B-Tubulin* sekansları) karakterizasyonlar sonucunda izolatların *Beauveria bassiana* (ARSEF 11688), *Clonostachys* sp. (ARSEF 11689, ARSEF 11690, ARSEF 11691, ARSEF 11693, ARSEF 11695, ARSEF 11700, ARSEF 11701, ARSEF 11702), *Metarhizium anisopliae* (ARSEF 11694) ve *Myriodontium keratinophilum* (ARSEF 11697, ARSEF 11698) olduğu belirlendi. Bu izolatların tümü *G. gryllotalpa*'dan ilk kez izole edildi. Spor süspansiyonları 1×10^7 spor/ml yoğunluğundaki spor süspansiyonlarının model organizma *Galleria mellonella* üzerinde yapılan insektisidal aktivite testleri sonucunda 15 gün içinde en yüksek ölüm oranı %100 ölüm oranı ile *B. bassiana* (Gg-1), *Clonostachys* sp. (Gg-3), *M. keratinophilum* (Gg-11) ve *M. anisopliae* (Gg-12)'den sağlandı. *G. gryllotalpa* üzerinde 20 günlük deney periyodunda en yüksek ölüm oranı da %86.7 olarak *M. anisopliae* Gg-12'den elde edildi. Bu sonuçlar, virulansı yüksek olan izolatların önemli tarım ve orman zararlılarına karşı mikrobiyal ve entegre mücadele uygulamalarında umut verici olduklarını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Gryllotalpa gryllotalpa*, mikrobiyal mücadele, entomopatojenik funguslar

Master Thesis

SUMMARY

Isolation and Characterization of Entomopathogenic Fungi from *Gryllotalpa gryllotalpa*

Emine SÖNMEZ

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Assoc. Prof. İsmail DEMİR
2012, 93 Pages, 16 Pages Appendix

In this study, to determine a effective fungal agent against agricultural pests that cause great economical damage to farming fields; were isolated 15 fungal strains from *Gryllotalpa gryllotalpa*. After morphologic (infection contour, colony morphology, spore contour) and molecular (ITS1-5.8S ITS2 gene area, EF1- α , Bloc, RPB1, RPB2a, RPB2b, B-Tubulin sequences) characterizations studies, those strains were identified as *Beauveria bassiana* (ARSEF 11688), *Clonostachys* sp. (ARSEF 11689, ARSEF 11690, ARSEF 11691, ARSEF 11693, ARSEF 11695, ARSEF 11700, ARSEF 11701, ARSEF 11702), *Metarhizium anisopliae* (ARSEF 11694) and *Myriodontium keratinophilum* (ARSEF 11697, ARSEF 11698). All isolates were isolated from *G. gryllotalpa* for the first time. Spore suspensions were prepared as 1×10^7 spore/ml density. Insecticidal activity experiments done on model organism *Galleria mellonella* resulted in a 15 days experiment period that, isolates *B. bassiana* (Gg-1), *Clonostachys* sp. (Gg-3), *M. keratinophilum* (Gg-11) and *M. anisopliae* (Gg-12) provide 100% death over *Galleria mellonella*. The highest death rate of 86,7%, obtained from *M. anisopliae* (Gg-12) on the 20-day experimental period against *G. gryllotalpa*. These results are indeed promising, considering isolates with high virulence can be used for microbial and entegrated management over the agricultural and forest pests.

Key Words: *Gryllotalpa gryllotalpa*, microbial management, entomopathogenic fungi

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>Grylotalpa grylotalpa</i> (Danaburnu).....	7
Şekil 2. <i>Entomophthora muscae</i> 'nin <i>Delia radicum</i> konağındaki yaşam döngüsü.....	25
Şekil 3. Böcek kütikulasındaki fungal enfeksiyon basamaklarının gösterimi	27
Şekil 4. Doğal fungal enfeksiyondan ölmüş Danaburnu erginleri	36
Şekil 5. Fungal örneklerin 'Scotch tape' tekniğiyle mikroskopik incelenmesi.....	38
Şekil 6. ITS1-5.8S-ITS2 bölgesini çoğaltmak için kullanılan primerlerin pozisyonları..	40
Şekil 7. <i>Grylotalpa grylotalpa</i> 'dan izole edilen fungus cinslerine ait koloni morfolojileri.	46
Şekil 8. Çeşitli entomopatojenik fungusların mikroskopik yapıları.....	48
Şekil 9. Entomopatojenik fungus izolatlarının rRNA ITS1-5.8S-ITS2 bölgesinin PCR ile çoğaltılması.	50
Şekil 10. <i>Clonostachys</i> sp. izolatlarının ITS dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı.....	52
Şekil 11. İzolatlarının ITS dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı....	52
Şekil 12. Bazı <i>Metarhizium</i> ve <i>Beauveria</i> izolatlarının <i>EF1-α</i> bölgesinin PCR ile çoğaltılması	53
Şekil 13. Bazı <i>Metarhizium</i> ve <i>Beauveria</i> izolatlarının <i>RPB1</i> bölgesinin PCR ile çoğaltılması.	54
Şekil 14. Bazı <i>Metarhizium</i> izolatlarının β - <i>Tubulin</i> bölgesinin PCR ile çoğaltılması...	54
Şekil 15. Bazı <i>Metarhizium</i> ve <i>Beauveria</i> izolatlarının <i>RPB2a</i> bölgesinin PCR ile çoğaltılması	55
Şekil 16. Bazı <i>Metarhizium</i> ve <i>Beauveria</i> izolatlarının <i>RPB2b</i> bölgesinin PCR ile çoğaltılması	55
Şekil 17. <i>Beauveria</i> izolatının Bloc bölgesinin PCR ile çoğaltılması.....	56
Şekil 18. <i>Beauveria</i> izolatları ile Rehner vd. (2011)'lerinin çalışmasında kullanılan <i>Beauveria</i> türlerinin ITS dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı	57

Şekil 19. <i>Beauveria</i> izolatları ile Rehner vd. (2011)'lerinin çalışmasında kullanılan <i>Beauveria</i> türlerinin RPB1 dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı	58
Şekil 20. <i>Beauveria</i> izolatları ile Rehner vd. (2011)'lerinin çalışmasında kullanılan <i>Beauveria</i> türlerinin RPB2 dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı	59
Şekil 21. <i>Metarhizium</i> izolatları ile Bischoff vd. (2009)'lerinin çalışmasında kullanılan <i>Metarhizium</i> türlerinin EF1- α dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı.	62
Şekil 22. <i>Metarhizium</i> izolatları ile Bischoff vd. (2009)'lerinin çalışmasında kullanılan <i>Metarhizium</i> türlerinin RPB1 dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı	63
Şekil 23. <i>Metarhizium</i> izolatları ile Bischoff vd. (2009)'lerinin çalışmasında kullanılan <i>Metarhizium</i> türlerinin RPB2a dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı	64
Şekil 24. <i>Metarhizium</i> izolatları ile Bischoff vd. (2009)'lerinin çalışmasında kullanılan <i>Metarhizium</i> türlerinin RPB2b dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı 1	65
Şekil 25. <i>B. bassiana</i> , <i>M. anisopliae</i> , <i>M. keratinophilum</i> ve <i>Clonostachys</i> sp izolatlarının <i>G. mellonella</i> larvalarına karşı patojeniteleri ve kadavralar üzerindeki sporlaşma oranları	66
Şekil 26. <i>Meterhezium anisopliae</i> ile enfekte olmuş <i>Galleria mellonella</i> larvası	67
Şekil 27. <i>Beauveria bassiana</i> ile enfekte olmuş <i>Galleria mellonella</i> larvası	67
Şekil 28. İzolatların <i>G. mellonella</i> larvalarına karşı patojeniteleri ve kadavralar üzerindeki sporlaşma oranları.	68

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Fungusların sınıflandırılması ve bazı önemli entomopatojenik fungusların fungi alemi içerisindeki taksonomik pozisyonları.....	21
Tablo 2. Entomopatojenik funguslar tarafından üretilen bazı metabolitler.....	28
Tablo 3. Ticari olarak geliştirilmiş, geliştirilmeye devam edilen ve potansiyel olarak dikkate alınan entomopatojenik funguslar	33
Tablo 4. <i>Beauveria</i> ve <i>Metarhizium</i> türlerinin moleküler karakterizasyonunda kullanılan gen bölgeleri ve primer sıraları.	41
Tablo 5. Fungus izolatlarının morfolojik tür tayinleri.....	49
Tablo 6. Fungus izolatlarının rRNA ITS1-5.8S-ITS2 dizisine göre tür tayinleri.....	51
Tablo 7. Gg-1 izolatının <i>EF1-α</i> , <i>RPB1</i> , <i>RPB2a</i> , <i>RPB2b</i> ve <i>Bloc</i> gen bölgelerine göre tür tayinleri	56
Tablo 8. Gg-7 izolatının <i>EF1-α</i> , <i>RPB1</i> , <i>RPB2a</i> , <i>RPB2b</i> ve <i>β-Tubulin</i> gen bölgelerine göre tür tayini	60
Tablo 9. Gg-12 izolatının <i>EF1-α</i> , <i>RPB1</i> , <i>RPB2a</i> , <i>RPB2b</i> ve <i>β-Tubulin</i> gen bölgelerine göre tür tayini	60
Tablo 10. Gg-14 izolatının <i>EF1-α</i> , <i>RPB1</i> , <i>RPB2a</i> , <i>RPB2b</i> ve <i>β-Tubulin</i> gen bölgelerine tür tayini	61

SEMBOLLER DİZİNİ

ARSEF	: USDA-ARS entomopatojenik fungus koleksiyonu
bp	: Baz çifti
C	: Derece
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EPF	: Entomopatojenik fungus
ha	: Hektar
I:K	: Işık: karanlık
ITS	: Ara transkript bölgesi
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NCBI	: Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Enformasyon Merkezi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDA	: Patates dekstroz agar
PDAY	: Patates dekstroz agar + maya ekstraktı
PDB	: Patates dekstroz sıvı
pol	: Polimeraz
SPSS	: Sosyal Bilimlerde İstatistik Paketi
USA	: Amerika Birleşik Devletleri
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
VIB	: Flandra Biyoteknoloji Estitüsü
μ	: Mikro
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Dünyada ve Türkiye'de hızlı nüfus artışına paralel olarak, tarımsal üretimin ve gıda arzının aynı oranda ve sürekli olarak arttırılması imkanları kısıtlıdır. Bununla birlikte ortaya çıkan açlık sorunu, küresel bir felaket halini almaktadır. Bu felakete engel olmak için tarımda birim alandan elde edilebilecek verimi artırmak için yeni tarım tekniklerinin geliştirilmesi ve uygulanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yönde yapılan en önemli girişim yüksek verimli çeşitlerle monokültür üretim ve üretimde su başta olmak üzere girdi kullanımının yoğunlaşması sorunlarını beraberinde getirmiştir.

Bu girdilerin en temel olanları arasında organik tarım, su, ilaç ve suni gübre sayılabilir. Organik tarım çevrenin ve doğal tarım kaynaklarının korunmasını, bozulan ekolojik dengenin yeniden tesisini, biyolojik çeşitliliğin devamını, kimyasal kirliliğin önüne geçilmesini, olumsuz çevre koşullarının iyileştirilmesini ve dünya nüfusunun sosyal-ekonomik refahını geliştirecek sistem ve uygulamaları içermektedir. Her geçen gün hızla tükenen doğal kaynakların dengeli kullanımını ve doğal dengenin korunmasını hedefleyen bu sistemde, özellikle çevre kirliliğinin büyük boyutlara ulaştığı ve çevre bilincinin ön plana çıktığı günümüzde organik tarım ve biyolojik mücadele daha büyük önem kazanmıştır (Lampkin, 1994).

Tarımda meydana gelen bu çözüm önerilerine rağmen, günümüzde açlık sorunu halen devam etmektedir. Bu sorun, Dünya'da üretim miktarındaki azlıktan ziyade gıda dağılımındaki dengesizlikten kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla, tarımda üretim sistemlerinde yeni arayışlar ve sağlıklı gıda elde edilmesi giderek önemi artan bir konu haline gelmiştir. Gıda güvenilirliğini tehlikeye iten en önemli faktörlerden birisi de üretim sırasında verimi ve kaliteyi azaltan bitki hastalık ve zararlılarına karşı kullanılan kimyasallardır. Uzun süreden beri uygulanmakta olan kimyasal mücadele sonucu ortaya çıkan ciddi sorunlardan dolayı, alternatif yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Yoğun kimyasal kullanımı sonucunda, doğal denge tahrip olmuş, çevre ve insan sağlığı her geçen gün biraz daha tehdit altına girmiştir. Tüm bu sorunlar karşısında çevre ile dost, uzun süre etkili bir

mücadele yöntemi olarak biyolojik mücadele ön plana çıkmıştır. Sürdürülebilir üretim açısından biyolojik mücadele kaçınılmaz hale gelmiştir (Şeniz ve ark., 2005).

Tarım zararlılarıyla kimyasal mücadelede yoğun ve gereksiz ilaç kullanımının en önemli sorunlarından biri de zararlıların kısa sürede kullanılan kimyasallara karşı direnç oluşturmalarıdır (Stumpf ve Nauen 2001). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) direnci, normal bir popülasyondaki bireylerin çoğunu öldürdüğü tespit edilen zehirli bir maddenin belirli bir dozuna karşı, aynı türün diğer popülasyonundaki bireylerin tolerans kazanma yeteneğinin gelişmesi şeklinde belirtmektedir (Brown, 1958). Bir zararlı böceğe karşı bir insektisit veya insektisit grubunun uzun süre devamlı olarak kullanılması halinde seleksiyon veya mutasyon yoluyla o böcekte ilaca karşı direnç gelişebilmektedir (Giray,1977). Tüm bu sonuçlar doğrultusunda diğer mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi çabaları hız kazanmıştır. Alternatif yöntem arayışı içinde ise biyolojik mücadele ön plana çıkan yöntemler arasındadır.

Biyolojik mücadele, zararlı, hastalık ve yabancı otların diğer canlıların yardımıyla ekonomik zarar eşiğinin altında tutulmasıdır. Bir başka deyişle doğada zararlı olan canlıları tamamen yok etmeden doğal dengeyi koruyucu, onarıcı ve destekleyici önlemlerin uygulanmasıdır. Biyolojik mücadelede etkili olan doğal düşmanlar predatörler, parazitoidler ve patojenler olarak üç ana grupta toplanmıştır. Predatörler zararlı üzerinde doğrudan beslenerek etkili olan faydalı böceklerdir. Parazitoidler, yumurtalarını diğer bir böceğin ergin ya da ergin öncesi dönemleri dediğimiz yumurta, larva ve pupa gibi gelişme dönemleri içerisine bırakarak etkili olan genellikle arı grubundan faydalıdırlar. Patojenler ise diğer canlılarda olduğu gibi zararlılarda da hastalık yapan etmenlerdir. Hastalık oluşturan patojenler fungus, bakteri, virüs ve nematod gibi canlılardır (Weeden et al., 2007). Biyolojik mücadelede üç temel yaklaşım vardır. Bunlar: (i) mevcut doğal düşmanların korunması ve etkilerinin artırılması, (ii) doğal düşman popülasyonunun çoğaltılması ve desteklenmesi ve (iii) doğal düşmanların ithal edilmesidir. Bu üç yöntem birbirinden bağımsız olarak düşünülmemelidir. Çünkü, bu yöntemler birbirinin tamamlayıcısı durumundadır. Bunlar, aynı zamanda bir zararlıya karşı uygulanacak biyolojik mücadelenin aşamalarını teşkil eder.

Zararlı böcekler, başta orman arazileri olmak üzere, tarla ve bahçe bitkilerinde, seralarda, süs bitkilerinde, koruma altına alınmış bölgelerde yetişen bitki türleri üzerinde, depolanmış ürünlerde büyük zararlara yol açmaktadır (Lacey vd., 2001). Özellikle tarım

ürünlerinde, üretimin ve verimin düşmesindeki en önemli etken zararlı böceklerdir. Mısır, tütün, ayçiçeği, soya fasulyesi, pamuk gibi Türkiye ekonomisinde önemli yeri olan ürünler üzerinde pek çok tarımsal zararlı yaşamaktadır. Bunlar, ürünler üzerinde çeşitli derecelerde zararlar meydana getirerek büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Danaburnu (*Gryllotalpa gryllotalpa*) tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli tarım zararlılarından biridir. Bitki köklerine oldukça fazla zarar verdiği için mücadelesinde periyodik olarak ilaçlama yapılır. Zararlının mücadelesinde kimyasal insektisit kullanımı oldukça yaygındır. Ancak günümüzde zararlı ile mücadelede alternatif yöntemler araştırılmaktadır.

Türkiye’de kimyasal insektisit tüketimi 1979-2002 yılları arasında % 45,29’luk bir artış göstermiştir (Delen ve ark., 2005). Pestisitlerin dezavantajları ve yan etkileri artık herkes tarafından bilinmektedir. Her şeyden önce, pestisit uygulamaları üretim maliyetini artırmaktadır. Kimyasal mücadele çerçevesinde kullanılan birçok kimyasalın agroekosistemde bulunan ve hedef olmayan diğer canlılar üzerinde de etkili olduğu saptanmıştır. Bunlar özellikle zararlı türleri baskı altında tutan doğal düşmanlar üzerinde yan etkilere sahiptir. Dünyada da pestisitlerin yararlı fauna üzerindeki olumsuz etkilerini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Zchenxian, 1988; Smilanick, 1996; Wiles, 1994; Inglesfield, 1989; Hernandez vd., 1993; Choi vd., 2001; Martinez ve Barcelo, 2001). Bunun sonucu olarak zararlılar kontrolsüz olarak çoğalmakta ve bu da ekstra mücadele çabalarına ve maliyet artışına neden olmaktadır. Yine yoğun kullanılan ilaçlar, ortamda bulunan diğer türleri de öldürdüğü için doğada denge bozulmaktadır. Ayrıca, yoğun ilaç kullanımı sonucu bitkilerde zarar yapan bazı böcek ve benzeri canlılar ile hastalık etmeni bazı funguslarda da ilaçlara karşı direnç geliştirmekte ve ilaçların etkinliği azalmaktadır. Bu da daha yoğun ilaç kullanımını beraberinde getirmekte ve böylece bir kısır döngü oluşmaktadır.

Pestisitler, uygulandıklarında doğrudan veya dolaylı olarak bitkiden, toprağa ulaşmakta ve oradan yağmur suları ile yıkanarak yeraltı sularına, akarsulara, göl ve deniz sularına taşınmakta, buralardan da besin zinciri yoluyla insana ulaşmaktadır. Ekosistemde ürün kaybına neden olan zararlı, hastalık ve yabancı otlara karşı yapılan ilaçlamalarda atılan ilacın % 0.015-% 6.0’sı hedef alınan canlı üzerine ulaşmakta ve yeterli etki alınmakta, geri kalan kısmı ise hedef olmayan organizmalara ve toprağa ya da doğal ekosisteme sürüklenmektedir (Yıldız ve ark., 2005). Bir kısmı da uygulama sonrasında

buharlaşarak doğrudan atmosfere karışmakta ve tekrar yağmur suları ile toprağa düşmektedir. Pestisitler bu dolaşım sırasında bu yaşam alanlarında yaşayan canlılar üzerinde ve insanlar üzerinde toksik etki göstermektedir.

Dünyada, danaburnu (*Grylotalpa grylotalpa*) ile kimyasallar, çeşitli parazitler, predatörler ve mikroorganizmalar kullanılarak mücadele edilmeye çalışılmaktadır. Ancak yapılan tüm çalışmalar böcek popülasyonunun zarar seviyesinin altında tutmak için yeterli olmamış ve zararlıyla mücadele halen etkin bir sorun olmaya devam etmektedir.

Zararlılara karşı uygulanacak bir biyolojik mücadele etmeninin hangi dönem ve koşullarda, nasıl uygulanacağını belirlemek için öncelikle zararlıyı çok iyi tanımak ve biyolojisini bilmek gerekmektedir. Diğer bir önemli husus ise bu zararlıya karşı hangi biyolojik mücadele etmeninin kullanılacağıdır. Böyle bir etmenin tespit edilebilmesi için ilk olarak mevcut biyolojik etmenlerin zararlı üzerinde test edilmesi ve zararlı böcekte muhtemel hastalık oluşturabilen yeni bir patojenin araştırılması gerekmektedir.

Tüm bu bilgiler doğrultusunda, ülkemiz ekonomisinde önemli bir paya sahip olan tarım ürünlerinde zarar oluşturan danaburnu, tel kurdu ve patates böceğinin uygulanmakta olan mücadele yöntemleriyle uyumlu hatta onlara alternatif oluşturabilecek bir fungal mücadele etmeninin tespiti büyük önem taşımaktadır. Bu süreçte, çalışmada zararlılara karşı mikrobiyal mücadelede kullanılabilmesi amacıyla öncelikle zararlıdan fungus izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen fungusların morfolojik ve moleküler karakterizasyonları yapıldı ve zararlı üzerindeki öldürücü etkileri test edildi.

1.2. Organik Tarım ve Biyolojik Mücadele

Organik tarım, ekolojik sistemde hatalı uygulamalar sonucu kaybolan doğal dengeyi yeniden kurmaya yönelik, insana ve çevreye dost üretim sistemlerini içermekte olup, esas itibariyle toprağın sürdürülebilir bir verimliliğe sahip olmasını sağlama, bitkinin direncini artırma, bitki korumada biyolojik yöntemleri de tavsiye eden, üretimde miktar artışını değil, ürünün kalitesinin yükselmesini amaçlayan bir üretim sistemi olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca, hayvansal ve bitkisel üretimi bir bütün olarak tasarlayan, öncelikle işletme içinden sağlanan girdileri kullanmayı hedefleyen en son bilgi ve teknolojiden yararlanan bir üretim tekniğidir. Tohumdan toprağa, girdiden işletmeye kadar belirli kuralları olan ve kontrol edilip sertifikalandırılan bir üretim biçimidir.

Öncelikle, tarımsal üretimde, üretim ile ilişkili tüm faktörler ve olaylar bir bütün olarak değerlendirilmeli ve organik üretim yapan tarım işletmesinin kendi kendine yeterliliği sağlanmalıdır. Bunun için toprak, bitki, hayvan ve insan arasındaki ekolojik dengenin doğal kökenli ham maddeler kullanılarak mümkün olduğunca işletmenin kendi içinden veya yakın çevresinden sağlanmasına gayret edilmelidir.

Organik tarımın hedefleri, toprağın biyolojik ve mineralojik yapısının korunması ve içindeki biyolojik yaşamın dengesinin yeniden tesisi, eksilen organik maddelerin yeniden kazandırılması, çölleşme ve bataklıklaşmanın önlenmesi yoluyla toprak verimliliğini uzun dönemde korumak ve devam ettirmek, doğal flora ve faunanın korunmasını sağlayarak genetik çeşitliliği devam ettirmek, tarımsal faaliyetten kaynaklanabilecek her türlü kirliliği önleyerek, iklim değişikliğinin önlenmesi ve sera etkisinin azaltılmasına katkıda bulunmak, sentetik tarımsal girdilerin, toprak üstünde yaşayan canlıların (bitki, hayvan, insan) sağlığı üzerinde oluşturduğu tehditleri ortadan kaldırmak, tarımsal üretimin sosyal, ekonomik ve ekolojik boyutunu birlikte düşünmek şeklinde genişletilebilir. Organik tarımda biyolojik mücadele çevre dostu bir uygulama olup, diğer tarım sistemlerine göre daha kalıcıdır.

1.3. Türkiye’de Üretilen Çeşitli Tarım Ürünleri ve Bunların Ekonomideki Yeri

Tarım, insanların temel gereksinimi olan beslenme ihtiyacını karşılayan, sanayiye hammadde kaynağı oluşturan, nüfusun önemli bir bölümüne istihdam yaratan ve ülke ekonomisine ciddi katkılar sağlayan, stratejik öneme sahip bir sektördür. Ülkemiz, iklimi, ürün çeşitliliği, ekolojik yapısı, büyük tarım havzaları bulunması ve coğrafi konumu nedeniyle bu sektörde avantajlı durumdadır. Tarımsal üretimde, yirmiden fazla üründe dünyada ilk on ülke arasında yerini alırken bazı ürünlerde de dünya üretiminde ilk sıralarda bulunmaktadır.

Bağ ve meyve bitkileri, sebze ve yem bitkileri, endüstri ve süs bitkileri ve hububat olmak üzere Türkiye’de çeşitli tarımsal üretimler yapılmaktadır. Üretim alanları ise bölgeden bölgeye ve üründen ürüne değişmektedir.

Dünya ekonomisinde ortaya çıkan gelişmeler, ulusların eğitim bilgi ve teknoloji düzeylerinin yükselmesi özellikle gelir düzeyi yüksek ülkelerde pamuklu ürünlerin tüketiminin artmasına, dolayısı ile dünya genelinde pamuk talebinin artmasına neden

olmaktadır. Pamuk bitkisi, yaygın ve zorunlu kullanım alanıyla insanlık açısından, yarattığı katma değer ve istihdam olanaklarıyla da üretici ülkeler açısından büyük ekonomik öneme sahiptir. Tüm bu gelişmelere bağlı olarak pamuk dış ticareti de giderek önem kazanmaktadır. Sahip olduğu tarımsal potansiyel göz önüne alındığında, ülkemizin pamuk üretimi artırmalı ve verimi düşüren etmenlere karşı önlemler alınmalıdır. Bu önlemlerin başında pamuk zararlıları gelmektedir. Gerek ürün gerekse yapraklar üzerinde yaşayan pek çok zararlı türü bulunmaktadır. Bu zararlılar pamuk bitkisi üzerinde çeşitli ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Ülkemizde insanların temel gıda maddesi ekmektir ve ekmek yapımında en çok tahıllar kullanılır. Tahıllar içinde ilk sırayı buğday almakla birlikte, özellikle bazı bölgelerimizde (Karadeniz Bölgesi) mısır ekmeği de yaygın olarak tüketilmektedir. Mısır bitkisinden iki şekilde yararlanılır. Bunlar tanesi ve otsu gövdesidir. Mısırın taneleri insan beslenmesinde doğrudan kullanıldığı gibi (ekmek yapımı ve çerezlik olarak), yemeklik sıvı yağ, nişasta, glikoz ve yem sanayinde de değerlendirilir. Otsu gövdesi ise hayvan yemi olarak kullanılır. Karadeniz Bölgesi'nde ve ülkemizde önemli yeri olan mısır bitkisinin üretim miktarındaki düşüşün sebeplerinden biri de zararlı böceklerdir. Üretimde verimin bu zararlı böcekler tarafından azaltılması, Türkiye ekonomisinde büyük kayıplara neden olmaktadır.

Ayçiçeği, günümüzün en önemli yağ bitkilerinden biridir. Ayçiçeği yağı yemeklik kalitesi yönünden tercih edilen bitkisel yağlar arasında ilk sırayı almaktadır. Dolayısıyla Dünya'da birçok ülkede ekonomik düzeyde tarımı yapılmaktadır. Ülkemiz de yıllara göre değişmekle beraber yaklaşık 550–600.000 hektar arasında ayçiçeği ekilmektedir. Dolayısıyla ülkemiz ayçiçeği üretiminde de başta gelmektedir.

Kendine özgü tat ve aromalarıyla zevkle tüketilen ve güzel görünüşleriyle sofralarımızı süsleyen sebzeler, beslenmemizde önemli bir yere sahiptir. Özellikle içerdikleri vitaminler ve mineral maddeler ile lif bakımından zengin olan sebzelerin bazılarının protein içerikleri de göz ardı edilemeyecek kadar fazladır. İyi bir beslenme programı ile yeteri kadar sebze tüketildiğinde, günlük vitamin ve mineral madde ihtiyacının tamamının veya tamamına yakın bir bölümünün karşılandığı bilinmektedir.

Sebze tarımı birim alanda yarattığı yüksek verim ve sağladığı net gelir nedeniyle, her geçen gün daha fazla dikkat çekmektedir. Türkiye'de sebze üretimi, 1960'tan 2000'e kadar oldukça düzenli ve hızlı bir artış eğilimi izlemiş, üretim her 10 yıllık dilimde yaklaşık %50

oranında artmıştır. Türkiye, sebze dış ticaret dengesi bakımından net olarak ihracatçı konumundadır ve ihracat miktarları da giderek yükselme eğilimindedir. Türkiye'nin sebze ihtiyacını karşılamak ve ihracat miktarını artırmak için tarımda sebze zararlıları ile kimyasal mücadele yönteminden vazgeçilerek, derhal biyolojik mücadele yöntemine eğilim gösterilmelidir.

1.4. *Gryllotalpa gryllotalpa* (Danaburnu)'nın Biyolojisi ve Zarar Şekli

Danaburnu erginleri açık veya koyu kahverengi ve oldukça iri vücutlu böceklerdir. Baş ileri doğru uzamış, antenler kısa ve kuvvetlidir. Ağız parçaları çiğneyici tipte olup, gözleri yanlarda ve iyi gelişmiştir. Pronotumu büyük ve geniş olup kazdığı toprağa şekil verip sağlamlaştırmaya yarar. Kazıcı tipteki ön bacakları oldukça yassılaştırmış ve kenarları kuvvetli dikenlerle donanmıştır. Üst kanatları kısa olmakla beraber, alt kanatları iyi gelişmiş ve uçuş görevi üstlenmiştir (Şekil 1 A).

Yumurtaları ilk bırakıldıklarında beyazımsı sarı renkte olup, sonraları rengi gittikçe koyulaşır ve elips şeklindedir (Şekil 1 B). Nimfler erginlere benzer ancak daha küçük ve beyaza yakın açık renklidir. Kanatları da erginler kadar gelişmemiştir.

Danaburnu yaşamının çoğunu toprak altında geçirir. Genellikle yaşama yeri olarak, galeri açmaya uygun olan kültüre alınmış, nemli, bol humuslu, killi-kumlu toprakları seçerler.



Şekil 1. *Gryllotalpa gryllotalpa* (Danaburnu) A: Ergin, B: Yumurta (URL 1)

Geceleri ve çok bulutlu günlerde faaliyet gösterirken, gündüzleri genel olarak toprak içinde açtıkları galerilerde istirahat halinde bulunurlar. Mayıs ayında çiftleşen dişiler yumurtalarını toprağın 10–20 cm derinliğinde hazırladıkları odacıklar içine grup halinde bırakırlar. Bir grupta 200–300 yumurta bulunur. Bir dişi yaşamı boyunca 500-600 yumurta bırakabilmektedir. Doğal ortamda mayıs ayında bırakılan yumurtalar sıcaklık ve nem şartlarına göre değişmek üzere 10–20 günde açılır. Haziran ayı içinde yumurtadan çıkan nimfler birkaç hafta gruplar halinde bu yuvalar içinde kaldıktan sonra dağılırlar. Nimfler sonbahara kadar 2 gömlek değiştirir ve 3. dönem nimf halinde toprağın derinliğine kadar inerek kışlar. İlkbaharda havaların ısınmasıyla tekrar aktif hale geçerek 5 gömlek değiştirdikten sonra ekim ayında ergin olur. Kışı geçiren erginler ilkbaharda çiftleşip yumurta bırakıp, böylece gelişmesini 1,5-2 yılda tamamlamış olurlar.

Danaburnu polifag bir zararlı olup en çok sebzeler, çeltik, buğday, mısır, ayçiçeği, tütün, pamuk, süs bitkileri, meyve ve orman fidanlarında hasara neden olur. Ergin ve nimfleri toprak içinde galeri açarak ilerlerken rastladıkları tohum, kök ve yumru gibi her tür bitkisel materyale kesmek veya kemirmek suretiyle zarar verir. Özellikle yeni dikilmiş veya yeni çimlenmiş sebze fidelerinin köklerini keserek kurumalarına neden olur ve yumrulu sebzelerin de yumrularını kemirerek ürün veriminin düşük olmasına yol açarlar.

1.4.1. Zararlılarla Genel Mücadele Yöntemleri

Bazı böcek türleri bitkiler üzerinde ciddi zararlara neden olmaktadır. Özellikle tarım ve orman ürünleri üzerinde bu böcek türlerinin her yıl tekrarlayan zararları milyarlarca lirayı bulan ürün kayıplarına ve iş gücünün boşa gitmesine yol açmaktadır. Bu zararlıların, bitkilerde yaptıkları çeşitli zarar düzeylerine, gerek doğal kuvvetler (doğal mücadele) gerekse insan yardımıyla (uygulamalı mücadele) önlenmesine veya hiç olmazsa azaltılmasına yönelik yöntem ve harcanan çabalara zararlılarla mücadele denir. Bu mücadele yöntemlerini kültürel mücadele, doğal mücadele, yasal mücadele, mekanik mücadele, fiziksel mücadele, kimyasal mücadele gibi çeşitli gruplara ayırmak mümkündür.

1.4.2. Kimyasal Mücadele

Çeşitli kimyasalların toz veya sulu halde kullanılması suretiyle yapılan mücadeledir. Ülkemizde çok yaygın bir şekilde kullanılmasına rağmen, gelişmiş ülkeler bu yöntemi terk etmektedir.

Önceleri zararlılarla mücadelede kimyasalların kullanılması tek çare olarak belirlenmiştir (Anonim, 2008). Kimyasal insektisitlerin büyük çoğunluğu böceklerin merkezi sinir sistemine etki ederek onları öldürür. Ölümün asıl nedeni sinir sisteminin özel duyarlılığıdır. Birinci hedefleri çoğunlukla başka yerler olan pestisitler bile en son etkilerini sinir sistemine yaparlar. Kimyasal insektisitlerin uygulama sonrası zararlıların ölümüyle sonuçlanmasına rağmen, potansiyel olumsuz etkilerinden dolayı zararlıların mücadelesinde kullanılabilirler diğer yöntemlerin araştırılması yararlı olacaktır.

1.4.2.1. Kimyasalların Çevreye Olan Etkileri

Kimyasal mücadele, 1940'lı yıllarda sentetik pestisitlerin keşfedilmesi, bunların kısa sürede etki göstermesi ve uygulamalarının kolay olması nedeniyle özellikle 20. yüzyılın ikinci yarısından sonra zararlıları baskı altına almada en yoğun kullanılan yöntem haline gelmiştir. Ancak, kısa sürede etki gösteren, uygulaması kolay olan bu tür kimyasallara, zararlılar ve hastalıklarla mücadelede tek kurtarıcı olarak bakılmış ve uzun süreli olumsuz etkileri 1950'li yıllara kadar fark edilmemiştir. Kimyasalların uzun vadede çevreye yaptıkları geriye dönüşümsüz olumsuz etkileri ilk olarak 1962 yılında Rachel Carson tarafından "Sessiz ilkbahar" (Silent Spring) adlı kitapta anlatılmıştır.

Zararlı böceklerle mücadelede 1800'lü yılların ortalarına kadar, zararlıların toplanması veya yıkanması şeklinde mücadele ediliyordu. Bu tarihten sonra önce kükürt ve arsenik, daha sonraları ise kurşun asetat, kryolite ve borik asit gibi çok az kimyasal madde böceklerle karşı kullanıldı. Dikloro-difenil-trikloroetan (DDT)'nin keşfinden önceki 1940'ların başına kadar zararlılar tarafından üründe meydana gelen kaybın dünya ortalaması %7 iken, 1980'lerin sonuna doğru bu kayıp %13'e yükselmiştir. Bu ürün kaybındaki iki katlık artış, ilaç devriminden sonra başlamış ve aynı dönem içinde ilaç kullanımında ise 12 katlık bir artış meydana gelmiştir. Ürün kayıplarındaki bu artış,

ilaçlara dayanıklılığın artması, potansiyel zararlıların ekonomik zararlı durumuna geçmesi ve doğal düşmanların öldürülmesinden kaynaklanmıştır. Bunlara insan ve hayvan sağlığının tehdit edilmesi, gıda maddelerindeki ilaç kalıntıları, çevre kirlenmesi ve yüksek ilaç fiyatları da eklenince, kimyasal mücadeleye alternatif çevre dostu ve daha ucuz mücadele yöntemlerine geçilmesi zorunlu hale gelmiştir.

Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre insektisitlere dayanıklılık, “normal bir popülasyondaki bireylerin çoğunu öldürdüğü tespit edilen zehirli bir maddenin bir dozuna karşı, aynı türün diğer bir popülasyonundaki bireylerin tolerans kazanma yeteneğinin gelişmesi” olarak tarif edilmektedir. Başka bir tanıma göre ise dayanıklılık, “ bir arthropod türünün bir ırkının, aynı türün duyarlı popülasyonunda saptanmış olan LD₁₀₀ değerinin iki katı olan ilaç dozundan etkilenmemesi” olarak açıklanmaktadır.

Insektisitlere dayanıklılığın artması, doz artırımına gidilmesine ve uygulamalar arasındaki sürelerin kısalmasına neden olmuştur. Sonunda daha etkili ve zehirli insektisitlere ihtiyaç duyulmuştur. Bunun maddi bedeli de ölçülemeyecek kadar yüksektir. Örneğin, Nikaragua’da pamuk tarımı 1950’li yıllarda başarı kazanmış ve 1965 yılında üst noktaya ulaşmıştır. Ancak, bu başarıda takip eden 5 yılda yanlış insektisit kullanımı sonucu %16’ya yakın azalma olmuştur. Hızla gelişen mukavemet sonucunda *Heliothis zea* ve *Spodoptera sunia* popülasyonunda patlama gerçekleşmiş ve mücadele imkansız hale gelmiştir. Ayrıca, sekonder zararlı konumdaki birçok tür önemli zarar durumuna geçmiştir. Sonuç olarak, uygulama dozu 2 katına çıkarılmış, bazen bir uygulama sırasında 5 farklı insektisit birden kullanıldığı olmuştur. Bu da üretim maliyetlerini çok arttırmıştır. Benzer durum, Meksika’daki pamuk tarlalarında gerçekleşmiştir. Yüksek dozlarda ve daha zehirli insektisit kullanımı sonucu insan zehirlenmelerinde büyük artış olmuş ve pamuk tarlalarından sürüklenen ilaçların komşu turuncu bahçelerindeki zararlıların biyolojik mücadelesine ters etkisi sonucu, turuncu bahçelere daha yoğun pestisit uygulanması yapılmıştır. Sonuç olarak, çok fazla uygulamanın getirdiği maliyet ve ürün kaybı sonucu 1970’lerde pamuk üretimi bitme noktasına gelmiştir.

Insektisitlerin etki tarzı bakımından zararlı ve faydalı böcekler arasında bir farklılık yoktur. Fakat etkileri bakımından farklılık vardır. Faydalı böcekler olarak kabul edilen predatör ve parazitler insektisitlerden daha fazla etkilenmektedir. Ne yazık ki parazit ve predatörlerdeki dayanıklılığın oluşumu, zararlı böceklerdeki kadar çabuk olmamaktadır.

Bunun sonucu olarak, zararlı popülasyonları üzerinde dengeleyici olan predatörler ve parazitler ortadan kalkmakta ve zararlılar daha çabuk yayılmaktadır (Ecevit, 1988).

İnsektisitlerin kullanıldığı alanlarda doğal olarak yaşayan polinatör canlılarda yok olduğu için bu alanlardaki zirai ürünlerde tozlaşma oranı azalmaktadır (Ecevit, 1988). Bitkilerde tozlaşmada önemli rol oynayan bal arıları ve yaban arıları insektisitlerden etkilenen önemli bir canlı grubunu oluşturmaktadır. Örneğin, A.B.D'nin Kaliforniya eyaletinde yoğun insektisit kullanımı sonucunda mevcut arı popülasyonları azalmış ve bunun etkisi olarak tarımsal ürünlerde yeterli tozlaşma olmamıştır. Bu durumdan kaynaklanan tarımsal ürünlerdeki kayıp yaklaşık 80 milyon doları bulmuştur. Yeterli tozlaşmayı sağlamak için bölgeye getirilen arı kolonilerine yıllık ödenen miktar ise yaklaşık 55 milyon dolara ulaşmıştır. Benzer durumlar Isparta'nın Kovada Vadisi'ndeki meyve bahçelerinde ve 1988 yılında Trakya'da yürütülen süne mücadelesi sırasında da tespit edilmiştir (Ünal, 1998).

Kimyasal insektisitler yalnızca böcek türlerine değil, doğada bulunan bitki örtüsüne de zarar vermektedir. Kimyasal insektisitlerin doğada toprak ve bitkilerde birikmelerinden dolayı yok olmaları çok uzun sürmektedir. Oluşan bu birikim topraktaki normal mikrobiyal popülasyonu bozarak toprak veriminin düşmesine neden olduğu gibi bitkiler aracılığıyla besin zincirine dahil olarak besin zincirinin en üst seviyesindeki canlılara kadar ulaşmaktadır. Belli bir alana uygulansalar dahi kolayca yok olmadıklarından, rüzgar ve yağmur gibi doğal olaylarla çok daha geniş alanlara yayılabilmeleri insektisitlerin zararını daha da artırmaktadır (Ünal, 1998).

Herhangi bir yolla sulara erişen kimyasal maddeler balıklar tarafından alınır. Balıkların büyüme, üreme, kaçma ve saklanma gibi bazı yetenekleri, insektisitlerin bünyelerinde birikimlerine göre azalır veya tamamen yok olur. Rakipler karşısında daha kolay avlanmaları sonucu bazı türlerin bütünüyle ortadan kalkması söz konusu olabilir (Ünal, 1998). Ekonomik öneme sahip balık türlerinde biriken insektisitler beslenme yoluyla insanlara geçer. İnsektisitlerin balıkları öldürme etkilerinden başka sulardaki oksijen miktarını da düşürerek, su canlılarının yaşamını tehdit etmektedir.

İnsektisit uygulaması yapılan bölgelerde gezinen kuşlar kimyasal maddelerden büyük zarar görür. Zarar, kimyasal maddelerle doğrudan temas şeklinde veya artığı bulunan bitkisel veya hayvansal zehrin yenmesi şeklinde olabilir. Toprakla beslenen kuşlar, ilaçla bulaşık toprak kurtlarını, yumuşakçaları ve diğer böcekleri yemek suretiyle

insektisit kalıntılarını bünyelerine alır. Tarla kuşu, ardıç, karga ve ağaçkakan bu kuşlara örnek verilebilir (Ünal, 1998).

İnsektisitler kullanıldıkları alanlardaki bitkilerin çimlenmesi, vejetasyonu ve üremesi üzerine de olumsuz etkiler yapmaktadır. Bazen bitkilerin belirli doku kısımlarında, özellikle yaprak ve sürgünlerinde yanma denilen bir takım lekeler ile renk değişimlerinin meydana gelmesine sebep oluşturmaktadır. Hatta bazen tüm bitkinin öldüğü görülür (Ecevit, 1988). Bitkilere bulaşan insektisitler, bitki üzerinde bıraktıkları kalıntılarla, besinin tat ve kokusunu bozabildiği gibi beslenme yoluyla insan vücuduna alınarak toksik etkilere de yol açmaktadır.

1.4.2.2. İnsektisitlerin İnsanlar Üzerine Olan Etkileri

İnsektisitler, uygulandıklarında doğrudan veya dolaylı olarak bitkiye, toprağa ulaşmakta ve oradan yağmur suları ile yıkanarak yeraltı sularına, akarsulara, göl ve deniz sularına taşınmakta, buralardan da besin zinciri yoluyla insana ulaşmaktadır. Pestisitlerin insanlar üzerindeki toksik etkisi akut ve kronik olmak üzere iki şekilde ortaya çıkmaktadır. Akut toksisite, tek pestisit dozunun bir defada alınması sonucu aniden ortaya çıkan zehirliliktir. Daha çok ilaçlama yapan kişilerde ya da kazayla pestisitlerin içilmesi sonucu görülmektedir. Kronik toksisite ise uzun bir süre içinde düşük dozların sürekli olarak alınması sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu daha çok tarım ürünlerindeki ilaç kalıntıları yoluyla olmaktadır.

Bursa'da 1963 yılında, parathionla ilaçlanmış şeftali yiyen 32 kişiden 7'sinin aynı gün ölmesi akut toksisiteye örnek verilebilir. İnsektisitlerin üretim ve kullanımları sırasında meydana gelen iş kazaları, bu ilaçların insan sağlığına karşı olumsuz etkilerini çok çabuk bir şekilde göstermesine sebep olmaktadır. Örneğin, Hindistan'ın Bhopal kentinde 1984 yılında, ABD'ye ait Union Carbide Şirketi'nin bir fabrikasından çevreye yayılan yaklaşık 45 ton metil izosiyonat gazı, civardaki 2500 kişiyi uykularında öldürmüş ve fabrika çevresindeki çok geniş bir alanı yaşanmaz hale getirmiştir. Aradan 4 yıl geçtikten sonra dahi, fabrika çevresindeki köylülerden her yıl ortalama 500 kişinin ölmesi, tehlikenin boyutlarını göstermesi açısından oldukça önemlidir (Ünal, 1998).

Kronik toksisite ise bir kimyasalın akut toksisiteye neden olmayacak kadar düşük dozlarda uzun süre alınması halinde sıcakkanlıklarda meydana getirdiği fizyolojik

düzensizlik olarak tanımlanır (Ünal, 1998). İnsektisitlerle bulaşık veya bekleme süresi bitmeden insektisit kalıntısı içeren bitkisel besinlerin yenmesiyle de kronik toksisite meydana gelebilmektedir. Örneğin, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde heksaklorobenzenli (HCB) insektisitle ilaçlanmış tohumluk buğdayı yiyen 3000 kişide Porfiriya (Karayara) hastalığının görülmesi ve %11 oranında ölüm meydana gelmesi, dünya çapında ilgi uyandıran bir zehirlenme olayıdır (Ünal, 1998). Ayrıca, düşük dozlarda alınan bu insektisitlerin insan vücudunda birikimi sonucu, gelecek kuşaklarda neler meydana getireceğini de şimdiden tahmin etmek oldukça zordur. İnsektisitlerin sinir sistemi üzerindeki enzimlere etkili oluşu, önemlerini bir kat daha arttırmaktadır. Bugün özellikle fazla miktarlarda kullanılan klorlandırılmış hidrokarbonların insan ve hayvanların beyin, karaciğer, böbrek ve yağ dokularında toplanarak toksik etkide bulunduğu bilinmektedir (Ecevit, 1988).

Dünya Sağlık Örgütü'nün 1985 yılı raporlarına göre, her yıl 1.000.000 kişi pestisitlerden zehirlenmekte ve bunların yaklaşık 20.000'i ölümlerle neticelenmektedir. Dünya pestisit tüketiminin 1/3'ü az gelişmiş ülkelerde gerçekleşmesine rağmen, dünya pestisit ölümlerinin %75'i bu ülkelerde meydana gelmektedir (Ünal, 1998).

Tarımda zararlı böceklerin mücadelesinde, uygulamanın kolay olması ve kısa sürede etki göstermesi nedeniyle diğer mücadele yöntemlerine göre daha çok kimyasal mücadele tercih edilmektedir. Ancak, zararlılara karşı pestisitlerin bilinçsiz kullanımı sonucunda doğal dengenin bozulması, çevre kirliliği, yararlı böceklerin olumsuz etkilenmesi ve zararlıların bunlara direnç kazanması gibi birçok problem ortaya çıkmaktadır. Buna ilaveten, pestisitlere çoklu ve çapraz direnç kazanmış zararlılarda aynı veya farklı gruptan ilaçlar da etki göstermemekte ve böceklerle mücadele daha da zorlaşmaktadır. Zararlı böceklerle mücadelede kullanılan insektisitlerin anlatılan yan etkilerinden dolayı, kimyasal mücadelenin günümüzde mümkün olduğunca kısıtlanması ve bunun yerini çevresel açıdan daha güvenli olan biyolojik mücadelenin alması gerektiği düşünülmektedir.

Son 25 yılı aşkın bir süredir, zararlı böceklerle mücadelede yukarıda bahsedilen zararlı etkileri nedeniyle kimyasal insektisit kullanmanın yerine alternatif veya destek yöntemleri araştırmaya başlanmış (Bernard ve Jack, 2003) ve böylece biyolojik mücadele çağı başlamıştır.

1.4.3. Biyolojik Mücadele

Bilim adamlarınca biyolojik mücadelenin tanımı uzun yıllardan beri tartışılmaktadır. Biyolojik mücadele terimi ilk kez 1919 yılında Harry Smith tarafından kullanılmış ve basitçe “zararlı popülasyonlarını doğal düşmanları vasıtasıyla baskı altına alma veya düzenleme” şeklinde ifade edilmiştir. Yazar burada doğal düşman olarak sadece parazitoit, predatör ve patojenleri kastetmiştir. Van den Bosch vd., (1982), biyolojik mücadele teriminin hem “uygulamalı biyolojik mücadele” yani “insanlar tarafından doğal düşmanların zararlılara karşı kullanılması” ve hem de “doğal biyolojik mücadele” yani “insanın müdahalesi olmadan doğada kendiliğinden oluşagelen baskıyı” ifade etmek üzere kullanıldığını belirtmektedir. DeBach (1974) biyolojik mücadeleyi doğal mücadelenin bir parçası olarak kabul etmekte ve ekolojik anlamda “parazitoit, predatör ve patojenlerle, herhangi bir zararlının popülasyon yoğunluğunu, bu etmenlerin olmadığı zamanki yoğunluğundan daha düşük düzeyde tutulmasını sağlayan düzenlemeler” olarak tarif etmektedir. DeBach (1974) doğal mücadeleyi ise “doğada canlı popülasyonlarının belirli bir zaman periyodunda iniş ve çıkışlarının bir veya daha çok doğal faktörler kombinasyonu tarafından düzenlenmesi” şeklinde tarif etmekte ve bu faktörleri biyotik ve abiyotik olarak iki gruba ayırmaktadır. Bu faktörler; doğal düşmanlar, besin, tür içi rekabet, türler arası rekabet, iklim ve diğer fiziksel faktörler, yer ve yaşam alanı istekleridir.

Günümüzde ise biyolojik mücadele, "zararlı böceklerin yapmış olduğu zararı en aza indirmek için bu böceklerin doğal düşmanlarını kullanma" olarak tanımlanabilir. Doğal düşman terimi, predatör ve parazitlerle birlikte hastalık oluşturan mikroorganizmaları kapsamaktadır (Peter, 1984). Ancak, böceklerde hastalık oluşturan mikroorganizmaların kullanımı, genellikle mikrobiyal mücadele olarak adlandırılır.

Biyolojik mücadele, kimyasal mücadelenin tüm olumsuz yönlerini ortadan kaldırması bakımından son yıllarda tercih edilmesi gereken bir mücadele yöntemi haline almıştır.

Biyolojik mücadelenin bir alt kolu olan mikrobiyal mücadele, zararlı böceklerle mücadelede patojen mikroorganizmaların kullanılmasını kapsar. Entomopatojen olarak adlandırılan bu mikrobiyal mücadele etmenleri (bakteriler, virüsler, funguslar, nematodlar, protozoonlar) zararlı böceklerde hastalık oluşturarak böcek popülasyonlarının dengede tutulmasını ve zararlarının en aza indirilmesini sağlamaktadır. Bu entomopatojenlerin

büyük bir çoğunluğu konağa özel olduğu için yalnızca mücadele yapılmak istenilen organizma üzerinde etkili olur. Bu özelliğiyle, faydalı ve predatör böcekler, hayvanlar ve insanlar gibi hedef dışı organizmalar üzerinde herhangi bir risk oluşturmaz. Tamamen doğal olmaları sebebiyle bu etmenler ekosistemde herhangi bir kirliliğe yol açmaz. Bu özellikleri, gelecekte kimyasal insektisitlerin yerini bu biyolojik etmenlerin alacağını göstermektedir.

Biyolojik mücadele, diğer mücadele yöntemlerine göre doğal dengenin kurulmasına yardımcı olması, uzun vadede kalıcı sonuçlar vermesi ve nihai hedefe ulaştırabilmesi bakımından en çok tercih edilmesi gereken mücadele yöntemidir (Oğurlu, 2000).

Biyolojik mücadeleyi asıl önemli kılan, ekosistemi bozmaması ve zararlı türler üzerinde kalıcı ve dinamik bir etki meydana getirmesidir. Bu iki özellik diğer mücadele yöntemlerinde bulunmaz. Biyolojik mücadele diğer mücadele yöntemlerine göre, yan etkilerinin olmayışı, başlangıçta masraflı olsa da ilerleyen yıllarda ilk kuruluş harcamalarını tolere ederek en az masrafla en iyi sonucun alınabilmesine imkan vermesi, etkisini uzun süre devam ettirebilmesi, zararlılarda dayanıklılığa ve bağışıklığa yol açmaması ve zararlıyı direkt olarak öldürmekten başka, üreme gücünü azaltma ve gelişiminde dengesizlikler yaratma gibi dolaylı faydalar sağlaması bakımından birçok avantajlara sahiptir. Buna karşın esaslı bilgi gerektirmesi, başlangıçta risk taşınması ve neticenin geç alınması gibi tolere edilebilecek dezavantajları bulunmaktadır.

Biyolojik mücadelenin ilk uygulama dönemleri çok eski tarihlere dayanmaktadır. Asya'da avcı karıncalardan bu hususta yararlandığı ve bu karıncaların M.S. 900-1200 yılları arasında narenciye zararlılarına karşı kullanıldığı bilinmektedir. Bin ikiyüzlü yıllarda Yemen'de palmiye ağaçlarındaki zararlılara karşı karıncaların kullanıldığı ve Arabistan'da her yıl dağlardan getirilen avcı karınca kolonilerinin, hurma ağaçlarında zarar yapan bir diğer karınca türüne karşı kullanıldığı kayıtlıdır (Oğurlu, 2000).

İngiltere'de (1770)'li yıllarda tarım arazileri ve seralardaki çeşitli bitkiler üzerinde zarar yapan afitlerle mücadelede gelin böceklerinden faydalanılmıştır. Fransa'da kavak ağaçlarında zarar yapan *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae) tırtıllarıyla mücadelede (1840 yılında) koşucu böceklerden faydalanıldığı bilinmektedir. Bir kurbağa türü olan *Bufo marinus* (L.) (Anura: Bufonidae) (1844 yılında) zararlı böceklerle karşı kullanılmak üzere Jamaika'dan Barbados'a nakledilmiştir. *Poecilia reticulata* (Lepistes,

Guppy), lepistes balıkları sivrisineklerle mücadelede bataklık bölgelerde halen kullanılmaktadır.

Biyolojik mücadelede elde edilen bu başarılar, uygulayıcıları cesaretlendirmiş ve günümüze kadar büyük bir gelişme göstererek ilerletilmiştir. Son yıllarda çalışmalar ağırlıklı olarak böceklerde hastalık oluşturan entomopatojenlerin izolasyonu, karakterizasyonu ve biyolojik mücadele de kullanımına yönelmiştir.

1.4.3.1. Biyolojik Mücadelede Kullanılan Etkin Gruplar

Biyolojik mücadelede etkili bir şekilde kullanılan organizmaları predatörler, parazitler ve mikroorganizmalar olarak 3 ana grup altında toplamak mümkündür. Zararlı böceklerin doğal düşmanları olan bu canlılar, zararlılarla mücadelede büyük potansiyele sahiptir.

1.4.3.1.1. Predatörler

Böcek predatörleri, besin kaynağı olarak böcekleri yakalayan ve yiyen hayvanlardır. Bu predatörleri balıklar, amphibiler, sürüngenler, kuşlar, böceklerle beslenen çeşitli omurgasız hayvan grupları ve karnivor böcekler oluşturur. Ormanlarda zarar yapan böcekler düşünüldüğünde bu gruplardan kuşlar ve karnivor böceklerin biyolojik mücadelede kullanılma potansiyeli olduğu söylenebilir. Kuşlar için mutlak yararlı veya mutlak zararlı denilememekle birlikte, kuşları orman için genelde faydalı hayvanlar olarak saymak mümkündür. Zira zararlı böceklerin erginlerini, pupalarını, larvalarını ve yumurtalarını yiyen birçok kuş türü, bu yönleriyle doğal dengenin sağlanmasında önemli rol oynamaktadır (Oğurlu, 2000).

1.4.3.1.2. Parazitler

Böcek parazitleri, hayatını tek bir konukçu ferdi üzerinde tamamlayan ve konukçusunu zayıflatan, gerileten, gelişmesine mani olan veya öldüren organizmalara denir. Konukçu ise paraziti taşıyan canlıya verilen isimdir. Buna göre parazitin ya belirli

bir süre ya da tüm hayat döngüsü boyunca, kendisinden daha gelişmiş başka bir canlının üzerinde veya içinde yaşaması gerekir. Bu süre zarfında parazit, konukçunun vücut ısısından, besininden ve hatta hormonlarından faydalanarak konukçu organizmanın zararına gelişmekte ve çoğalmaktadır. Böcek parazitleri kendi gelişimleri tamamlandığında her zaman böceği öldürürler.

Böcek parazitizmi oldukça sık rastlanılan bir durumdur ve birçok böcek kendisiyle bağlantılı bir veya çoğunlukla birkaç parazit türe sahiptir. Bütün parazit böcekler bağlandıkları konağın hayat döngüsü içindeki belli bir safhaya özelleşmiş durumdadır. Bu yüzden bazıları pupa ve yumurta safhası ile sınırlanmışken, bazıları da larval parazitlerdir.

1.4.3.1.3. Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalardan üretilen insektisitler, hedef böcek türü için oldukça spesifik olmaları, ayrıştırılabilir olmaları ve zararlı böceklerde bu insektisitlere karşı direnç gelişiminin yavaş olması bakımından oldukça avantajlıdır. Fakat düşük etkili olmaları ve yüksek üretim maliyetleri açısından bakıldığında farklı uygulamalar için kullanımları kısıtlanmaktadır. Ancak, rekombinant DNA teknolojisi, bunun gibi birçok negatif özelliğin üstesinden gelebilmek için çeşitli imkanlar sağlar. Özellikle *Bacillus thuringiensis*'lerin insektisidal aktiviteleri ve böcek bacülovirüsleri, etkili, güvenli ve spesifik olarak geliştirilmiş biyolojik mücadelede araçlarıdır.

Doğada böceklerin hastalanmasına neden olan ve sonra onları öldüren orjini bakteri, virüs, nematod, protozoa ve fungus olan birçok mikroorganizma mevcuttur (Demirbağ, 2008; Demir, 2004). Bu mikroorganizmalar entomopatojen olarak adlandırılır. Doğada bulunan entomopatojenler böcek popülasyonlarının dengelenmesinde büyük öneme sahiptir. Birçok entomopatojen mikroorganizma, tarla ve bahçe bitkilerinde, seralarda, süs bitkilerinde, koruma altına alınmış alanlarda yetişen bitki türleri üzerinde, orman arazilerinde, depolanmış ürünlerde, veterinerlik ve tıbbi alanlarda zararlara yol açan vektör ve zararlı böceklerin biyolojik mücadelesinde kullanılır (Burges, 1981; Tanada ve Kaya, 1993; Lacey ve Kaya, 2000; Lacey vd., 2001).

Entomopatojenlerin yakın gelecekte, mikrobiyal mücadele etmeni olarak, sadece fiyat ve etkinlik bakımından değerlendirildiğinde bile kimyasal pestisitlere göre daha kullanışlı hale geleceği düşünülmektedir. Buna ek olarak, bu entomopatojenlerin

mikrobiyal mücadele etmeni olarak kullanımı, ekosistemdeki biyolojik çeşitliliğin sürdürülmesi, zararlı türlerin doğal düşmanlarının korunması, besinler üzerinde kalıntı bırakmaması, hedeflenmemiş diğer organizmalar ve insanlar açısından güvenli olması gibi birçok avantajlara sahiptir (Lacey vd., 2001).

Mikroorganizmaların zararlı böceklerle mücadele amacıyla kullanılması oldukça eski tarihlere dayanır. İlk çalışmalar 1726 yılında Fransa’da Noctuidae larvalarından *Cordyceps* cinsi fungusların izole edilmesiyle başlamıştır (Oğurlu, 2000). 1879 yılında Rusya’da yeşil buğday böceği, *Anisoplia austriaca* Herbst. (Coleoptera: Scarabaeidae)’ya karşı *Metarhizium anisopliae* (Metch.) fungusunun denemeleri yapılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Steinhaus, 1949).

Ancak, bu tarihten sonra 20. yüzyılın başlarına kadar mikroorganizmaların zararlı böceklerle mücadelede kullanılması üzerine çok az çalışma yapılmıştır. Bu konudaki çalışmalar 1920 yılından itibaren artmaya başlamış, 1950’den sonra da yoğunlaşmıştır (Oğurlu, 2000).

Zararlı böceklerin diğer doğal düşmanları gibi, entomopatojenler de tek bir tür veya gruba spesifiktir ve bazıları zararlı böceklerin uzun zaman periyotları boyunca mücadelesini sağlayabilir (Lacey vd., 2001). Entomopatojenlerin zararlı böceklere karşı kullanım stratejileri temelde diğer biyolojik etmenlerinin kullanımlarıyla aynıdır (Hamm, 1984; Harger, 1987). *In vitro* koşullarda üretilip uygulanabildiği gibi, uygun koşullarda saklanıp doğal ortamda tekrar aktif hale geçebilirler.

Çok sayıda virüs, bakteri, nematod ve fungus türü ve suşları mikrobiyal mücadelede yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Entomopatojenik funguslar, değişik habitatlarda yaşayan birçok böcek türünü enfekte edebildikleri için farklı çevresel faktörlere uyum sağlamışlardır. Bu nedenle entomopatojenik fungusların biyolojileri büyük çeşitlilik göstermektedir. Bazı gruplar zorunlu hücre içi parazitken, bazıları ortamda canlı konağın olmadığı durumlarda saprofit olarak hayatta kalabilen fırsatçı patojenlerdir (Hajek, 1997).

Entomophthorales grubuna dahil olan entomopatojenik funguslar, zaman zaman oluşturdukları epidemilerle zararlı böcek popülasyonlarının başarılı bir şekilde kontrolünü sağlamaktadır. Fakat bu fungusların primer konidlerinin kısa ömürlü olması, *in vitro* koşullarda üretimlerini zorlaştırır. Bu neden, fungusların zararlı böceklerle mücadelede kullanılmaları ve bunlardan olumlu sonuçlar elde edilmesi oldukça güçtür (Lacey vd., 2001). Deuteromycota’nın Hyphomycetes sınıfına ait türler, basit hayat döngüleri ve eşeyli

üremeden yoksun olmaları sayesinde geniş bir konak spektrumuna sahiptir. Homoptera, Thysanoptera, Isoptera, Orthoptera ve Coleoptera başta olmak üzere, diğer birçok böcek ordolarına ait türleri enfekte edebilirler (McCoy vd., 1988; Ferron vd., 1991; Fargues ve Maniania, 1992; Khan vd., 1993; Zimmermann, 1993; Devi, 1994; Miller ve Prior, 1994; Feng vd., 1994; Goettel vd., 1995, 2000; Lacey vd., 1996; Miller, 1997). Ayrıca, bu gruba dahil fungusların in vitro üretimlerinin ucuz olması ve uzun süre saklanabilirlikleri biyolojik mücadelede kullanılma potansiyellerini arttırmaktadır (Lacey vd., 2001).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, entomopatojenik fungusların insektisidal aktivitelerinin artırılması için diğer biyolojik mücadele etmenleri ve çevresel uygulamalarla kombine edilerek kullanılması gerektiği gösterilmiştir. Örneğin, zararlı ergin böceklerin yakalanması için hazırlanan feromon tuzaklarında fungal patojenlerle harmanlanmış yarı kimyasalların kullanılması, tuzağa gelen ergin böceklerin fungal sporlarla kontaminasyonunu sağlayabileceği gibi bu sporların larvaların yaşadığı habitatlara kendiliğinden yayılmasına da imkan sağlar (Klein ve Lacey, 1999; Vega vd., 1995; Furlong vd., 1995; Vega vd., 2000). Ayrıca, son yıllarda genetik mühendisliği uygulamalarıyla entomopatojenik fungusların virulanslarının artırılması üzerine birçok çalışma yapılmıştır (Ferron vd., 1991; Charnley vd., 1997; St.Leger ve Roberts, 1997). Fakat, bu uygulamalar, bakteriler ve virüsler gibi diğer mikrobiyal mücadele etmeni için geliştirilen rekombinant teknolojilerin çok gerisindedir (Lacey vd., 2001).

Fungal patojenlerin neden olduğu doğal salgınlar, zararlı böcek popülasyonlarında büyük bir azalmaya yol açar (McCoy vd., 1988). Fungal patojenler konak böceğin dış iskeletine saldırdıkları için genelde emici ağız yapısına sahip zararlılar üzerinde de etkilidir (Latge ve Papierok, 1988; Lacey vd., 1996).

1.4.3.1.4. Entomopatojenik Funguslar (EPF)

Entomopatojenik funguslar böcek popülasyonlarının düzenlenmesinde önemli role sahiptir. Beş farklı sınıf içerisinde farklı bir diziliş göstermekte olan entomopatojenik funguslar spesifik böcek türlerini enfekte eden zorunlu patojenler, pek çok böcek türünü enfekte edebilen genel patojenler ve fakültatif patojenler olarak gruplandırılabilir. Fungal epizootikler bazı böcek türlerinde yaygın olmasına rağmen, bazı böcek türlerinde ise nadir görülür (Goettel vd., 2005). Entomopatojenik fungusların mikrobiyal mücadele etmeni

olarak 100 yılı aşkın bir süredir kullanılmakta olduğu bilinmektedir (Hall vd., 1982). Şimdiye kadar tanımlanan 700'ün üzerinde entomopatojenik fungus bilinmekte ve bunlardan bazıları biyolojik mücadele etmeni olarak üretilmekte ve kullanılmaktadır (Strasser vd., 2000). Entomopatojenik fungus orjinli yaklaşık 150 ticari preparat 2007 yılından itibaren kullanımdadır ve üretimi devam etmektedir (Faria ve Wraight, 2007).

Kolay tanınmaları ve doğal olarak yayılmaları nedeniyle en yaygın böcek patojenleri olarak kabul edilirler (Poinar, 1978). Yedi yüzü aşkın fungus türünün böcekleri enfekte ettiği rapor edilmesine karşın, bunlardan ancak 10 tanesi zararlı böceklerin için kullanılmak amacıyla geliştirilme aşamasındadır (Hajek ve St.Leger, 1994). Böcek patojeni olan funguslar genellikle Deuteromycota ve Entomophthorales gruplarına dahildir (Hajek, 1997). Entomopatojenik funguslar çok geniş bir konak spektrumuna sahiptirler. Birçok böcek ordosuna ait türleri enfekte edebilirler. Bir entomopatojenik fungus birden fazla böcek türünü enfekte edebilir.

1.4.3.1.4.1. Entomopatojenik Fungusların Sınıflandırılması

Fungi alemi içerisinde 700'den fazla entomopatojenik fungus yer almaktadır. Bunlardan pek çoğu Ascomycota ve Zygomycota bölümleri içerisinde bulunmaktadır. Ascomycota içerisinde ise pek çok tür Hypocreales, Zygomycota ve Entomophthoralean takımları içerisinde yer almaktadır (Roy vd., 2006). Entomopatojenik fungusların sistematik pozisyonlarına dayanarak ortaya çıkarılan gruplandırmada entomopatojenik veya entomoparazitik funguslar Blastocladiomycota (*Coelomomyces* spp, *Coelomycidium simulii*), Entomophthoromycotina, Kickxellomycotina (Harpellales ve Asellariales), Eurotiomycetes (Ascosphaera ve diğer cinsler), Laboulbeniomycetes (ektoparazitik ascomycetes), Dothideomycetes (Myriangium), Sordariomycetes (çoğunlukal Hypocreales içerisinde) ve Pucciniomycetes (*Septobasidium* ve akrabaları) grupları içerisinde yer aldığını söylemek mümkündür (Humber, 2008). Bazı önemli entomopatojenik fungusların detaylı sınıflandırılması Tablo 1'de verilmiştir (Humber, 2008; Roy vd., 2006; URL-2, 2009).

Tablo 1. Fungusların sınıflandırılması ve bazı önemli entomopatojenik fungusların fungi alemi içerisindeki taksonomik pozisyonları

Filum	Chytridiomycota	Eski adı: Zygomycota	Bazal Funguslar
Filum	Neocallimastigomycota		
Filum	Blastocladiomycota		
Filum	Microsporidia		
Filum	Glomeromycetes		
Alt filum	Mucormycotina (filum atanmadı)		
Alt filum	Kickxellomycotina (filum atanmadı)		
	Orders Harpellales, Asellariales		
Alt filum	Zoopagomycotina (filum atanmadı)		
Alt filum	Entomophthoromycotina (filum atanmadı)		
Takım	Entomophthoralean		
Familya	Entomophoraceae		
Cins	<i>Entomophaga</i>		
	<i>Entomophthora</i>		
	<i>Erynia</i>		
	<i>Eryniopsis</i>		
	<i>Furia</i>		
	<i>Massospora</i>		
	<i>Strongwellsea</i>		
	<i>Pandora</i>		
	<i>Tarichium</i>		
Familya	Neozygitaceae		
Cins	<i>Neozygites</i>		
	<i>Zoophthora</i>		
Alt alem	Dikarya		
Filum	Ascomycota		
Alt filum	Pezizomycotina		
Sınıf	Eurotiomycetes		
Sınıf	Dothideomycetes		
Sınıf	Laboulbeniomycetes		
Sınıf	Lecanoromycetes (likenler)		
Sınıf	Orbiliomycetes		
Sınıf	Sordariomycetes		
Takım	Hypocreales		
Familya	Clavicipitaceae		
Cins			
Telemorf	<i>Hypocrella</i>		
	<i>Metacordyceps</i>		
	<i>Regiocrella</i>		
	<i>Torrubiella</i>		
Anamorf	<i>Aschersonia</i>		
	<i>Metarhizium</i>		
	<i>Nomuraea</i>		

Tablo 1'in devamı

		<i>Paecilomyces-gibi</i> ¹
		<i>Pochonia</i>
		<i>Rotiferophthora</i>
		<i>Verticillium-gibi</i> ²
Familya		Cordycipitaceae
Cins		
Telemorf		<i>Cordyceps</i> s.str.
		<i>Torrubiella</i>
Anamorf		<i>Beauveria</i>
		<i>Engyodontium</i>
		<i>Isaria</i>
		<i>Lecanicillium</i>
		<i>Mariannaea-gibi</i>
		<i>Microhilum</i>
		<i>Simplicillium</i>
Familya		Ophiocordycipitaceae
Cins		
Telemorf		<i>Ophiocordyceps</i>
		<i>Elaphocordyceps</i>
Anamorf		<i>Haptocillium</i>
		<i>Harposporium</i>
		<i>Hirsutella</i>
		<i>Hymenostilbe</i>
		<i>Paecilomyces gibi</i> ¹
		<i>Paraisaria</i>
		<i>Sorospora</i>
		<i>Syngliocladium</i>
		<i>Tolypocladium</i>
		<i>Verticillium gibi</i> ²
Filum	Basidiomycota	
Alt filum	Pucciniomycotina	
Sınıf	Pucciniomycetes	
Takım	Septobasidiales	
Alt filum	Ustiaaginomycotina	
Alt filum	Agaricomycotina	

1 Önceden *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* içerisinde yer alan türler. Günümüzde bu türler *Paecilomyces*'den ve *Isaria*'dan kesin bir şekilde ayrılmıştır

2 Önceden *Verticillium* sect. *Prostrata* içerisinde yer alan türler. Günümüzde bu türler *Verticillium*'dan kesin bir şekilde, ayrılmış fakat yeni sınıflandırılmaları yapılmamıştır

1.4.3.1.4.1.1 Entomopatojenik Fungusların Sınıflandırılmasında Kullanılan Özellikler

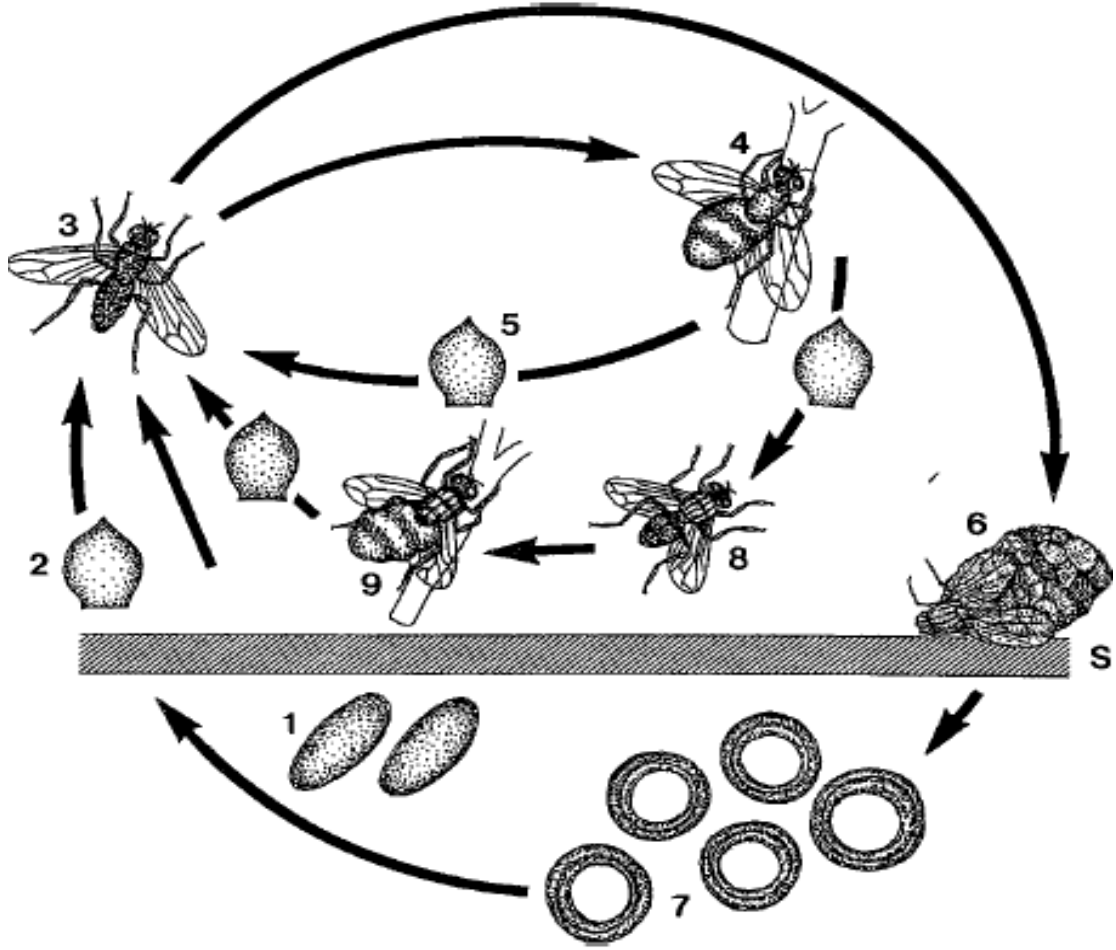
Entomopatojenik fungusların sınıflandırılmasında ana olarak morfolojik ve özellikle son zamanlarda moleküler karakterler yaygın olarak kullanılmaktadır.

Morfolojik özellikler: Entomopatojenik fungusların sınıflandırılmasında birçok farklı morfolojik özellikler kullanılmaktadır. Bunlar sırası ile, böcekte meydana gelen enfeksiyon şekli, katı besiyerindeki koloni morfolojisi ve rengi, sporların şekli ve boyutları, hiflerin yapısı, havai ve septalı olup olmadığı, synnema yapısı, sporların tek tek veya zincir şeklinde olup olmaması, sporokarp (fruiting body) yapısı, konidiyogenez hücrelerinin yapısı ve şekli, stroma yapısı, konidiyoforların yapısı, dinlenme yapılarının (resting spores) şekli ve büyüklüğü, sporangiyum yapısı ve şekli, fungusun hymenia oluşturup oluşturmaması, zoospor yapısı ve diğer bazı özellikler entomopatojenik fungusların morfolojik tür tayininde kullanılmaktadır (Humber, 1997).

1.4.3.1.4.2. Entomopatojenik Fungusların Biyolojileri

Entomopatojenik fungusların yaşam döngüleri çoğunlukla konaklarının gelişme safhaları ile eş zamanlı olarak gerçekleşmektedir (Shah ve Pell, 2003). Fakat, pek çok entomopatojenik fungus, hayat döngülerinde birçok benzerliğe sahiptir (Roy vd., 2006). Bakteri ve virüslerden farklı olarak, funguslar konaklarını yalnızca bağırsaktan değil, aynı zamanda böceklerin solunum deliklerinden ve integümentin yüzeyinden de enfekte edebilir. Bu özellik entomopatojenik fungusları böceklerin beslenme aktivitelerinden bağımsız olarak doğrudan enfekte edebileceği gerçeğini doğurmaktadır (Ferron, 1978). Bu durum bitkilerin özsuşması (başta afidler) veya hayvan kanı ile beslenen böceklerin mikrobiyal mücadelesinde entomopatojenik funguslara önemli avantajlar sağlamaktadır (Lacey ve Goettel, 1995). Entomopatojenik fungusların yaşam döngülerinde ilk olarak fungus enfektif bir spor üretir ve bu spor konağın kütikulasına tutunarak penetre olur. Penetrasyondan sonra spor çimlenerek germ tüpünü oluşturur ve bunu takiben appressorium oluşumu meydana gelir. Bu penetrasyon işlemi sıklıkla integümentin enfeksiyon bölgelerinde melanizasyon reaksiyonuna yol açmaktadır (Ferron, 1978). Melanizasyon sıklıkla geç olur veya yeterli oranda olur. Bu da patojenin yavaş büyümesini veya gücünü durdurmasına yardımcı olur (Hajek ve Leger, 1994). Bundan sonra, fungus

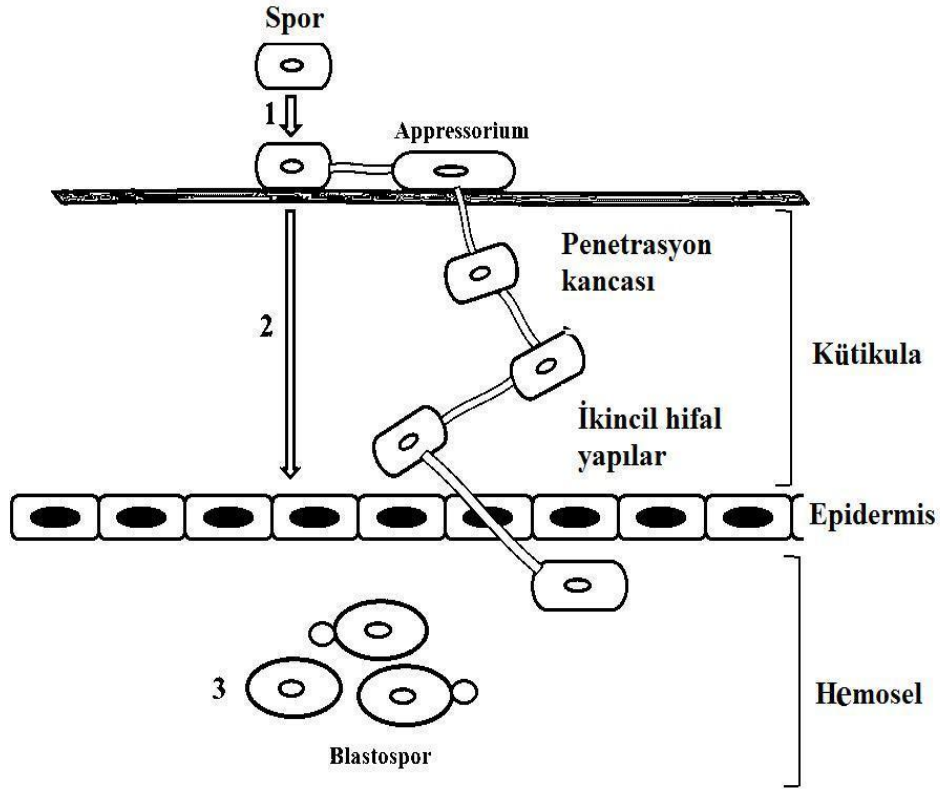
konağın hemoseline ulaşarak konağı istila eder ve konağı toksin üretimi veya çoğalma gibi nedenlerle öldürür. Uygun koşullar altında böceğin ölümünden sonra, fungus konaktan dışarı doğru sporlaşmaya başlar ve bu sporlaşma ya da konidiyogenezis kadavranın dış yüzeyinde meydana gelir (Goettel vd., 2005; Shah ve Pell, 2003). Alternatif olarak, fungus primer konağın olmadığı zamanlarda taksonomik olarak birinci derecede ilişkili bir başka konağı enfekte edebilir. Benzer olarak, alternatif konağın enfeksiyonundan sonra konak ölür ve üretilen sporlar primer ilişkili diğer bireyleri enfekte edebilir. Bunun haricinde, enfeksiyon için uygun olmayan çevresel koşullarda, fungus, bu koşullara dayanıklı dinlenme yapılarını (resting spores) oluşturur. Bu yapı çevrede konak olmadığı zaman uzun bir süre varlığını sürdürebilmektedir. Dinlenme yapılarının kendisi enfektif özelliğe sahip değildir. Fakat, yeniden enfektif spor oluşturabilir. Sporlaşmadan sonra çevreye yayılan sporlar başka konakları enfekte eder. Normal olarak bu yaşam döngüsünün pek çok istisnaları bulunmaktadır. Fakat, önemli olan husus çevresel faktörlerin fungusun üremesi ve hayatta kalması için son derece önemli olmasıdır. (Goettel vd., 2005). Entomopatojenik fungusların genel hayat döngüsü Şekil 2’de gösterilmektedir.



Şekil 2. *Entomophthora muscae*'nin *Delia radicum* konağındaki yaşam döngüsü. S: Toprak yüzeyi. 1. Konağın kışı geçirme safhası (topraktaki pupa). 2. Enfektif özelliğe sahip eşeysiz konidi fungusun kışın hayatta kalan yapıları tarafından üretilir ve konağın hassas safhasını enfekte etmeye hazırdır. 3. Ergin sinekler (burada konağın hassas safhası) pupadan çıkar ve enfekte olur. 4. İnkübasyon periyodunun ardından konak ölür. *E. muscae*'den ölmüş konak, ağaca yapışır ve konidiler ölmüş konakta üretilir. 5. Bu konidiler yeni hassas konakları enfekte edebilir. 6. Hassas konağın sayısı azaldığı zaman (örnek olarak sonbahar sırasında), bazı enfekte bireyler konağın ölümüne kadar enfektif konidi üretmez. Bunun yerine kışın uzun süre hayatta kalabilecek fungal yapılar üretilir. Bu durumda sinekler toprak yüzeyine düşer ve kalın duvarlı dinlenme sporları oluşturulur (eşeyli veya eşeysiz). 7. Dinlenme yapıları kışı toprakta geçirir ve gelecek yıl enfektif konidi üretir. 8. Alternatif olarak, fungus taksonomik olarak primer konak ile ilişkili bir başka konağı enfekte edebilir. Bu durumda bir başka sinek enfekte olur. 9. Enfeksiyondan sonra alternatif konak ölür ve bu konakta üretilen konidiler primer konağı yeniden enfekte edebilir (Roy vd., 2006).

1.4.3.1.4.3. Fungal Enfeksiyon

Genellikle eşeysiz olarak üreyen sporlar enfeksiyondan sorumludur ve enfeksiyondaki başlangıç aşaması pasif veya spesifik olmayan tutunmadır (Castrillo vd., 2005; Shah ve Pell, 2003). Bu adım böceğin kütikulasına temas için birçok farklı yol içermektedir. Örneğin, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* ve *Nomurae rileyi* durumunda, tutunma işlemi sporlarda yer alan iyi organize olmuş fasikül rodletler ve böcek kütikulası arasındaki hidrofobik ilişkinin sonucu olarak meydana gelir. Sucul ortamlarda yaşayan entomopatojenik funguslarda ise tutunma işlemi zoosporların kese oluşturması ile takip edilir (Castrillo vd., 2005). Tutunma işlemini takiben, sporlar konağın çeşitli bariyerlerinin üstesinden gelmek için fungusa yardımcı olan appressorium yapısını oluşturmak için çimlenmeye başlar (Hajek ve Leger, 1994). Bundan sonra, çemlenmiş spor kütikulanın içerisine penetre olur. Penetrasyon safhasında, proteaz, kitinaz ve lipaz gibi kütikulayı parçalayan bazı enzimler konağa girişte önemli rol oynamaktadır (Clarkson ve Chamley, 1996). Penetrasyonu takiben, hemoselin içerisindeki filamentöz fungus yapıları maya benzeri hifal yapılara veya protoplastlara (blastospor) geçiş yapar. Bu yapılar hemolenf içerisinde dolaşırlar ve tomurcuklanma ile çoğalırlar. Daha sonra tekrar filamentöz yapılara geçiş yapılarak fungus iç dokuları ve organları istila eder. Hemoseldeki besinin azalması (Feng vd 1994) ya da fungal metabolitlerin sonucu oluşan toksin maddelerin artmasıyla böcek ölür. Son olarak, fungus ölmüş böcek üzerinde sporlaşır ve yeni oluşmuş sporlar başka bir konağı enfekte edebilir. Uygun sıcaklık ve nemin varlığında, enfeksiyon aynı şekilde devam eder. Fungal enfeksiyon işleminin ayrıntılı şeması Şekil 3'de verilmiştir.



Şekil 3. Böcek kütikulasındaki fungal enfeksiyon basamaklarının gösterimi. 1. Böcek kütikulası ve spor arasındaki fiziksel temastan sonra fungusun konağı tanıması spor çimlenmesini ve appressorium oluşumunu başlatır. 2. Penetrasyon kancası ve çeşitli hifal yapılar kütikulayı ve epidermisi geçer. 3. Fungusun hemosele girmesinden sonra blastospor oluşumu başlar ve fungus konağı istila eder.

1.4.3.1.4.4. Entomopatojenik Fungusların Etki Şekilleri

Entomopatojenik funguslar, farklı metabolitler üreterek konaklarını birçok farklı şekilde öldürmektedir (Zimmermann, 2007b). Kimyasal olarak farklı toksik metabolitler *Beauveria*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Metarhizium*, *Paecilomyces* ve *Verticillium* gibi biyolojik mücadele etmenlerinde tanımlanmıştır. Bu metabolitlerden bazılarının önemli patojenite etmenleri olduğu bilinmektedir (Strasser vd., 2000). Şimdiye kadar birçok araştırmacı *Beauveria* spp. ve *M. anisopliae* tarafından üretilen metabolitler üzerine odaklanmıştır. Çünkü, bu iki fungus en önemli mikrobiyal mücadele etmenleridir. Bazı entomopatojenik funguslar tarafından üretilen bazı metabolitler Tablo 2’de verilmiştir (Zimmermann, 2007a; Zimmermann, 2007b; Strasser vd., 2000).

Tablo 2. Entomopatojenik funguslar tarafından üretilen bazı metabolitler

Fungus	Metabolitler
<i>Beauveria bassiana</i>	Beauverisin, bassianin, bassianolide, beauverolidler, tenellin, oosporein, oksalik asit, bassiakridin
<i>Beauveria brongniartii</i>	Oosporin
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Destruksinler (28 tip), swainsonie, sitokalasin C
<i>Metarhizium sp.</i>	Hidroksifungerin A ve B
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Beauvericin, beauverolidler
<i>Verticillium lecanii</i>	Dipicolonik asit, hidroksikarboksilik asit, siklosporin
<i>Hirsutella thompsonii</i>	Hirsutellin A, hirsutellin B, fomalakton

Beauveria spp. beauverisin, bassianin, bassianolide, oosporin, destruksin B gibi *in vivo* ve *in vitro* ortamda pek çok toksik bileşik üretmektedir (Zimmermann 2007a). Ayrıca, destruksinler (28 tip), sitokalasin C ve hidroksifungerin A ve B gibi metabolitler ise *Metarhizium* spp. tarafından üretilmektedir. Şimdiye kadar entomopatojenik fungusların hastalık sırasında herhangi bir toksini üretilip üretmedikleri veya virülans için toksin gerekir gerekeceği belirlenmemiştir. Quesada-Moraga ve Vey (2003) *B. bassiana*'nın çekirgelere karşı patojenik olması için toksin üretimine gerek duymadığını belirtmiştir. Bazı durumlarda, toksin üretiminden şüphelenilmesine rağmen, kesin olarak belirtilmemektedir. Farklı genotipe sahip *Beauveria bassiana* türleri farklı konak hücrelerde farklı patojenite etkisi göstermektedir (Jaronski ve Goettel 1997). Bu sebeple genellikle kabul edilen şudur ki; fungusun spesifik bir suşunun, orijinal konağı üzerinde veya konakla akraba olan türlerde virülansı daha fazladır (Xu 1998). *Coelomycidium*, *Coelomomyces* cins ve Entomophthoralean ordosuna ait bir kısım funguslar bazı çok zayıf toksinlere sahip olabilir. Fakat, büyük ihtimalle, bu funguslar konaklarını hayati dokuları istila ederek öldürürler (Goettel vd., 2005). İlave olarak, fungal enfeksiyon konak hareketlerinde ateş artması, yüksek yerlere çıkma, aktivitede artış veya azalma, semikimyasallara karşı azalmış cevap ve üreme davranışlarında değişme gibi değişiklikler meydana getirebilir (Roy vd., 2006).

1.4.3.1.4.5. Entomopatojenik Fungusların Özgüllüğü ve Konak Seçiciliği

Entomopatojenik fungusların özgüllüğü cinsler arasında, bir cins içerisinde ve hatta bir türün suşları arasında bile farklılık gösterebilmektedir (Goettel vd., 2005). Geniş konak spektrumuna sahip olmalarına rağmen epizootik oluşumu nadir rastlanan bir durumdur (Feng vd. 1994). Özellikle, Entomophthorales ordosuna dahil fungusların, dar konak aralığına sahip oldukları bilinir (*Zoophthora radicans* istisnadır) ve bunlar, genelde yaprakla beslenen böcekler ve akarlarda göze çarpan epizootiklerle ilişkilidir. Bunun tersine Hyphomycetes funguslar (son sınıflandırmaya göre şu anda Sordariomycetes olarak biliniyor) daha geniş bir konak aralığına sahiptir (*Verticillium lecanii* ve *Hirsutella thompsoni* istisnaları ile birlikte) ve genelde topraktaki böcek popülasyonlarında epizootik yaparlar (Pell vd., 2001). Her iki grubun da istisnaları bulunmaktadır. Örneğin, Sordariomycetes sınıfına ait iki tane iyi bilinen fungus türü olan *Beauveria bassiana* ve *Metarhizium anisopliae* geniş konak aralığına sahiptir. Şimdiye kadar *B. bassiana*'nın 707 adet konağa sahip olduğu bildirilmiştir (Zimmermann, 2007a). Bu sayı 521 cins, 149 familya ve 15 ordoyu kapsamaktadır. *B. bassiana* Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Diptera, Hemiptera, Orthoptera, Siphonaptera, Isoptera, Thysanoptera, Mantodea, Neuroptera, Dermaptera, Blattariae, Embioptera takımlarında patojen olarak etki gösterir (Zimmermann, 2007a). *M. anisopliae*'nin konak aralığı *B. bassiana*'dan daha sınırlı olmasına rağmen, bu türün de Symphyla, Orthoptera, Dermaptera, Isoptera, Homoptera, Heteroptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Siphonaptera, Lepidoptera, Malacostrata (Amphipoda), Acari, Ephemeroptera, Dermaptera, Heteroptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera ve Lepidoptera ordolarına ait böcekleri enfekte ettiği bildirilmiştir (Zimmermann, 2007b). Bu iki tür birçok böcek türünü enfekte etmelerine rağmen, izolatların alan uygulamalarında laboratuvar koşulları ile karşılaştırıldığında daha spesifik olabildikleri görülmektedir. Bu da patojene karşı duyarlılıktan daha çok diğer faktörlerin doğadaki hastalık oluşmasında önemli olduğunu göstermektedir. Bazı durumlarda, fungus sadece zayıflamış ve strese girmiş böcekleri öldürebilir (Goettel vd., 2005).

Pek çok Entomophthorales fungus konağa özgüdür ve hedef dışı organizmalar üzerinde bazı istisnalar hariç herhangi bir etki göstermez. Örneğin, *Entomophthore muscae*

Lepidoptera takımına ait bireyleri enfekte ederken, *Zoophthora radicans*'ın Diptera, Coleoptera, Lepidoptera ve Homoptera takımlarına ait 80'in üzerinde konağı enfekte ettiği bildirilmiştir (Hajek, 1999; Goettel vd., 2005).

1.4.3.1.4.6. Entomopatojenik Fungusların Dağılımı ve Yayılımı

Bir patojenin enfektif yapılarının dağılması hastalığın gelişmesinde oldukça önemlidir. Hypocreales ordosuna ait entomopatojenik fungusların enfektif yapıları kadavradan pasif olarak dağılmaktadır. Bu pasif yayılım rüzgar ve yağmur gibi etkenlerle meydana gelmektedir (Meyling ve Eilenberg, 2007). Entomophthoralean fungusların sporları ise hidrostatik basınç altında aktif olarak salınmaktadır. Salınımdan sonra sporların yayılımı rüzgar veya yeni bir enfeksiyon ile devam etmektedir (Shah ve Pell, 2003). Toprak ortamında ise entomopatojenik fungusların aşırı bir şekilde çoğalması ve yayılımı sınırlıdır. Popülasyonun oluşumu, kadavradan yayılan enfektif sporlar, içerisinde ana kadavrada yer alan kaynakların dönüşümüne dayanmaktadır (Meyling ve Eilenberg, 2007). Bazı durumlarda, entomopatojenik funguslar canlı haldeki enfekte böcek ile bir başka konağa veya çevreye yayılımlarını gerçekleştirmektedirler. Örneğin, bazı Entomophthoralean fungusların sporları konak hala canlı iken salınmaktadır. *Entomophthora thripidum* ve *Strongwellsea catrans* ile enfekte sinekler ve bazı afid türleri uzun mesafede fungusları taşıyarak göç edebilmektedir (Meyling ve Eilenberg, 2007; Shah ve Pell, 2003). Ayrıca, bazı eklem bacaklılar entomopatojenik türlerin yayılımının da görev yapabilmektedir (Dromph, 2003; Meyling vd., 2006). Bazen, *Cordyceps* spp. gibi entomopatojenik funguslar ve hatta onun anamorfları (örnek olarak *B. bassiana*) büyük bir stroma üretmektedir ve bu stroma bazen 30 cm'ye kadar ulaşabilmekte ve sonunda eşeyli ve eşeysiz sporları üretmektedir. Son olarak, dinlenme yapılarının (resting spores) oluşması pek çok fungusun yayılımı için ana faktör olmaktadır. Konağın sayısı azaldığı ve olumsuz çevre koşulları başladığı zaman, pek çok Entomophthoralean fungus uzun bir zaman toprakta sağ kalabilen mitozdan (azigospor) veya mayozdan (zigospor) oluşan dinlenme yapılarını (resting spores) üretmektedir (Goettel vd., 2005; Shah ve Pell, 2003). Bu da fungusun yayılımına katkı sağlayan faktörlerden birisidir.

1.4.3.1.4.7. Entomopatojenik Fungusların Avantaj ve Dezavantajları

Entomopatojenik fungusların mikrobiyal mücadelede bazı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. İnsektisid olarak fungusların kullanım avantajları şöyle sıralanabilir:

1. Zararlıyla mücadele açısından bazı durumlarda yüksek konak seçiciliğine sahip olmaları: Entomopatojenik funguslar zararlı olmayan parazit ve yararlı böcek popülasyonlarını etkilemeden zararlı böceklerin mücadelesinde kullanılabilir.

2. Memeliler üzerine herhangi bir olumsuz etki göstermemeleri, böylece çevre kirliliği gibi insektisid uygulamaları sonucu karşılaşılan zararların azaltılması.

3. İnsektisid direnci gibi problemlerin olmaması ve böylece uzun süreli bir mücadele sağlamaları.

4. Biyoteknolojik araştırmalar ile geliştirilmeye uygun olmaları.

Uygulama sonrası çevrede uzun süre kalmaları ve böylece, uzun süreli mücadelesinin sağlamaları (Wan, 2003).

Öteyandan, fungusların insektisid olarak kullanımlarının bazı dezavantajları da bulunmaktadır:

1. Kimyasal insektisidler böcekleri sadece 2-3 saatte öldürürken, entomopatojenik funguslar daha uzun bir süre gerektirmektedir (bazen 10-15 gün).

2. Uygulamalar yüksek nem, düşük zararlı sayısı ve fungusidler kullanılmadığı periyod da olmalıdır.

3. Bazen yüksek seçiciliğinden dolayı ilave mücadele etmenlerinin kullanılması gerekebilir.

4. Üretimleri nispeten pahalıdır ve sporların saklanması için soğuk ortamlar gereklidir.

5. Zararlı popülasyonları üzerine entomopatojenik fungusların etkinliği ve devamlılığı farklı konaklarda farklılık göstermektedir ve böylece, böceğe özgül uygulama tekniklerinin optimizasyonu uzun süreli çalışma ve araştırma gerekmektedir.

6. Bağışıklık sistemi baskılanmış insanlara karşı bazen potansiyel risk oluşturmaları (Wan, 2003).

1.4.3.1.4.8. Fungusların Mikrobiyal Mücadele Etmeni Olarak Kullanımı

Entomopatojenik funguslar, diğer doğal böcek düşmanları ile birlikte başlıca (1) klasik, (2) inokülatif salınım, (3) inundatif salınım ve (4) konzervatif olmak üzere dört geniş biyolojik mücadele stratejisinde kullanılabilirler (Eilenberg vd., 2001; Shah ve Pell, 2003).

Entomopatojenik fungusların klasik biyolojik mücadelede büyük bir kullanım potansiyeli mevcuttur. Fungusların klasik ve inokülatif biyolojik mücadele de kullanımları açısından pek çok tercih nedeni özellikleri vardır. Hızlı bir şekilde epizootiklere neden olabilir, dar konak aralığına sahiptir, çevrede ve böcek popülasyonlarında uzun süre varlıklarını sürdürebilirler (Goettel vd., 2005).

Klasik biyolojik mücadele uzun süreli bir mücadele sağlamak amacıyla, biyolojik mücadele etmeninin doğal olarak bulunmadığı bir yere (genellikle bu organizma konağa göre zaman içerisinde değişikliğe uğramıştır (co-evolved)) isteğe bağlı olarak bırakılmasıdır (Eilenberg vd., 2001). Bu mücadele stratejisinde, ilgili zararlının mücadelesi zararlının mücadelesinin gerektiği alana doğal olmayan uygun bir biyolojik mücadele etmeninin bırakılmasına bağlıdır. Böylece, klasik biyolojik mücadele ekzotik bir organizmanın salınımını gerektirmektedir (Eilenberg vd., 2001). Klasik biyolojik mücadele programları genelde uzun süre sürdürülebilir ve ekonomik bir mücadele sağlamaktadır (Shah ve Pell, 2003). Entomopatojenik fungusların klasik biyolojik mücadele de kullanımlarına yönelik birçok örnek vermek mümkündür. Amerika'da *Entomophaga maimaiga*'nın *Lymantria dispar*'a ve *Zoophthora radicans*'ın *Therioaphis trifolii*'ye karşı uygulanması bu alanda en güzel örneklerdir (Hajek vd., 1990; Pell vd., 2001; Milner vd., 1982; Shah ve Pell, 2003).

İnokülatif biyolojik mücadele ise biyolojik mücadele etmeni olan canlı bir organizmanın, mücadele bölgesine salınarak uzun bir süre zarfında çoğalması sonucu zararlı böceği kontrol altına almasıdır. Fakat, bu mücadele kalıcı değildir. Bu uygulama stratejisinde salınan organizmanın sayısı önemli değildir. Aksine biyolojik mücadele etmeninin salınan alanda çoğalması önemlidir. Genellikle alana düşük sayıda mücadele etmeni salınır. Bu kısmen de olsa salınan organizmanın kabul edilemez masraflarından kaynaklanmaktadır. Böcek patojenleri inokülatif mücadele için kullanılabilir. Örneğin, *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch (Deuteromycotina: Hyphomycetes) mayıs böceğiyle

(*Melolontha melolontha* L. (Coleoptera: Scarabaeidae)) mücadele etmek için İsviçre’de kullanılmıştır. Buradaki amaç, salınan fungusun zaman içerisinde çoğalarak uzun süreli bir mücadele elde edilmesini idi (Keller, 1997; Eilenberg vd., 2001). Bununla birlikte, *Entomophaga maimaiga* Amerika’da *Lymantria dispar* popülasyonlarında epizootik başlatmak amacı ile inokülatif olarak kullanılmıştır (Hajek ve Webb, 1999; Goettel vd., 2005).

Tablo 3. Ticari olarak geliştirilmiş, geliştirilmeye devam edilen ve potansiyel olarak dikkate alınan entomopatojenik funguslar

Fungus	Ürün	Zararlı	Ülke
<i>Beauveria bassiana</i>	Conidia	Kahve kurdu beyaz sinekler, afidler,	Almanya
<i>Beauveria bassiana</i>	Mycotrol WP	Kırpık kanatlılar	Amerika
<i>Beauveria brongniartii</i>	Engerlingspilz Schweizer	Mayıs böceği Mayıs böceği	İsviçre
<i>Beauveria brongniartii</i>	Beauveria Melocont-	Mayıs böceği	İsviçre
<i>Beauveria brongniartii</i>	Pilzgerste		Avusturya
<i>Metarhizium favoviride</i>	Green Muscle	Çekirgeler	İngiltere
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	PFR-97	Beyaz sinek	Amerika
<i>Verticillium lecanii</i>	Vertalec	Afidler ve beyaz sinek	İngiltere
<i>Verticillium lecanii</i>	Mycotal	Afidler ve beyaz sinek	İngiltere
<i>Entomophaga maimaiga</i>	–	Kır tırtılı (<i>L. dispar</i>)	–
<i>Hirsutella thompsonii</i>	–	Akarlar	–
<i>Lagenidium giganteum</i>	Laginex	Sivrisinekler	Amerika
<i>Metarhizium anisopliae</i>	BioBlast	Termitler	Amerika
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Green Muscle	Çekirgeler	G. Afrika

Üçüncü biyolojik mücadele stratejisi olan inundatif biyolojik mücadele de ise mücadele yalnızca canlı organizmanın kullanılması ile sağlanmaktadır (Eilenberg vd., 2001). Bu uygulama stratejisinde, biyolojik mücadele etmeni kısa dönemli bir mücadele için genellikle büyük miktarlarda salınır ve ikinci bir enfeksiyon beklentisi yoktur (Shah ve Pell, 2003). Sıklıkla biyopestisit, biyolojik pestisit veya mikopestisit olarak bilinen terimler funguslar ile yapılan inundatif biyolojik mücadeleyi tanımlamak için kullanılmaktadır (Goettel vd., 2005). Hyphomycetes funguslar inundatif biyolojik mücadele açısından büyük bir öneme sahiptir. Çünkü kitle üretimleri ve formülasyonları nispeten kolaydır ve

geleneksel sprey uygulamalarıyla kolaylıkla uygulanabilmektedirler. Pek çok ticari ürün farklı tarım alanlarında zararlılar ile mücadelede kullanılmaktadır. Bunların bazı örnekleri Tablo 3’de verilmiştir (Shah ve Pell, 2003; Strasser vd., 2000; Cross vd., 1999; Lacey ve Goettel, 1995; Montesinos, 2003; Scholte vd., 2004; Milner, 2000).

Konzervatif biyolojik mücadele ise zararlı böceğin etkisini azaltmak için çevresel veya mevcut uygulamalarda değişiklikler yaparak alanda bulunan doğal düşmanın veya diğer organizmaların korunmasıdır (Eilenberg vd., 2001). Bu stratejide etmen salınımı yoktur fakat tarım sistemleri ve uygulamaları doğal olarak mevcut olan düşmanı korumak veya sayısını arttırmak için modifiye edilir. Bu sayede zararlı böcek popülasyonunun zarar eşiğinin altında tutulması amaçlanmaktadır (Goettel vd., 2005). Bu uygulamada ilk örnek, *Neozygites fresenii*’nin Amerika’da bulunan pamuk tarlalarındaki uygulamadır. Çifçiler topladıkları afidlerin %15’inin bu fungusla enfekte olduğunu buldukları zaman mevcut patojeni korumak için herhangi bir insektisid uygulaması yapmadılar. Böylece, hem zamandan hem de paradan tasarruf ederek, çevresel kontaminasyonu azaltarak yararlı böcekleri de korumuş oldular (Shah ve Pell, 2003; Pell vd., 2001).

1.5. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, Doğu Karadeniz Bölgesi’ndeki tarım alanlarında çeşitli zararlar oluşturan Danaburnu (*Gryllotalpa gryllotalpa*) ile mücadelede etkin, güvenli, ekonomik ve çevreye duyarlı fungal mikrobiyal mücadele etmenleri izole etmek, bunların morfolojik ve moleküler karakterizasyonlarını yapmak ve hedef zararlılara karşı insektisidal etkilerini belirlemek amaçlanmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Böcek Örneklerinin Toplanması ve Laboratuvara Getirilmesi

Trabzon ilinin farklı tarım alanlarından *Gryllotalpa gryllotalpa* (Danaburnu) toplamak için arazi çalışmaları yapıldı. 2010-11 Mart-Nisan aylarında belleme yöntemiyle danaburnu nimf ve erginleri topraktan çıkarıldı ve yeterince havalandırma açıklığı bulunan plastik kaplara konuldu. Zararlıda kannibalizm görüldüğü için her kaba az sayıda böcek yerleştirildi. Kapların üzerine alındığı bölgenin adı ve tarih not edildi. Laboratuvara getirilen böcekler canlı ve ölü olmak üzere farklı kaplara alındı ve bu örnekler, günlük olarak incelemeye tabi tutuldu. Öldüğü tespit edilen böcekler, ölüm nedeninin fungus olup olmadığının tespit edilebilmesi için nemli filtre kağıdı içeren steril petri kaplarına alındı ve eksternal fungus büyümesi araştırıldı. Eksternal misel büyümesi görülen böcek örneklerinden fungus izolasyonu yapıldı ve bu izolatların patojen olup olmadığı araştırıldı.

2.2. Fungus İzolasyonu

Gerek arazi çalışmaları sırasında ölü bulunan, gerekse labaratuvar ortamında öldüğü belirlenen danaburnu örneklerinin fungal bir etmeden ölüp ölmedikleri araştırıldı. Bunun için ölü danaburunları (Şekil 4) nemli filtre kağıdı içeren steril petri kaplarına alındı ve 1-2 haftalık inkübasyonun ardından eksternal fungus büyümesi gözlenen kadavralardan fungus izolasyonu için böcekler öncelikle %1'lik sodyum hipoklorit solüsyonuyla 3 dk yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra, 3 kez distile su ile yıkandı. İşleme tabii tutulan böcekler içerisinde kurutma kağıdı bulunan petrilere alınarak 25°C 'de, nem ihtiyacını karşılanmak suretiyle inkübasyona bırakıldı (Ali-Shtayeh vd., 2002).

Gözle görülebilir fungal büyüme gerçekleştiğinde, öze yardımıyla fungusların patates dekstroz agar (PDA) besiyeri ihtiva eden petrilere inokülasyonu gerçekleştirildi (Vannien ve Husberg, 1989). İnokülasyon yapılan fungusların saflaştırılması için besiyeri olarak %1 yeast ekstrakt ilave edilmiş Patates Dekstroz Agar (PDA) kullanıldı. İstenmeyen bakteri kontaminasyonunu engellemek için besiyerine 50 µg/ml ampisilin, 20 µg/ml tetrasiklin ve

200 µg/ml streptomisin ilave edildi (Ihara vd., 2001). Parazitik fungusların büyümesini engellemek amacıyla ise 50 µg/ml oranında kloromfenikol kullanıldı.



Şekil 4. Doğal fungal enfeksiyondan ölmüş Danaburnu erginleri (Fotoğraflar, Doç. Dr. İsmail DEMİR tarafından çekilmiştir).

Gözle görülebilir fungal büyüme gerçekleştiğinde, öze yardımıyla fungusların patates dekstroz agar (PDA) besiyeri ihtiva eden petrilere inokülasyonu gerçekleştirildi (Vannien ve Husberg, 1989). İnokülasyon yapılan fungusların saflaştırılması için besiyeri olarak %1 yeast ekstrakt ilave edilmiş Patates Dekstroz Agar (PDA) kullanıldı. İstenmeyen bakteri kontaminasyonunu engellemek için besiyerine 50 µg/ml ampisilin, 20 µg/ml tetrasiklin ve 200 µg/ml streptomisin ilave edildi (Ihara vd., 2001). Parazitik fungusların büyümesini engellemek amacıyla ise 50 µg/ml oranında kloromfenikol kullanıldı.

2.3. Saf Kültürlerin Hazırlanması ve Stoklanması

İnkübasyondan sonra besiyeri üzerinde büyüyen funguslar incelenerek farklı koloni morfolojisine sahip olanlar, yuvarlak öze yardımıyla patates dekstroz agar (PDA) ihtiva eden petrilere çizgi ekim yapılarak 4-6 gün, 28 °C’de inkübasyona bırakıldı. Büyümenin ilk zamanlarında küçük koloniler bistüri yardımıyla agarla beraber kesilerek PDA ihtiva eden petrilere transfer edildi. Böylece tek spordan oluşan fungusun saf kültürü elde edildi. Saf kültürler numaralandırılarak, sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere 5:1 oranında steril gliserol kullanılarak -80°C’de muhafaza edildi. Petrilere kalan kültürler ise +4 °C’de bekletildi. Elde edilen saf kültürlerin 6 ayda bir pasajlamaları gerçekleştirildi.

Numaralandırılan fungusların tümünün ARSEF (ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures, Ithaca, New York, USA) kültür koleksiyonuna kayıtları yapıldı.

2.4. Fungusların Tür Tayinleri

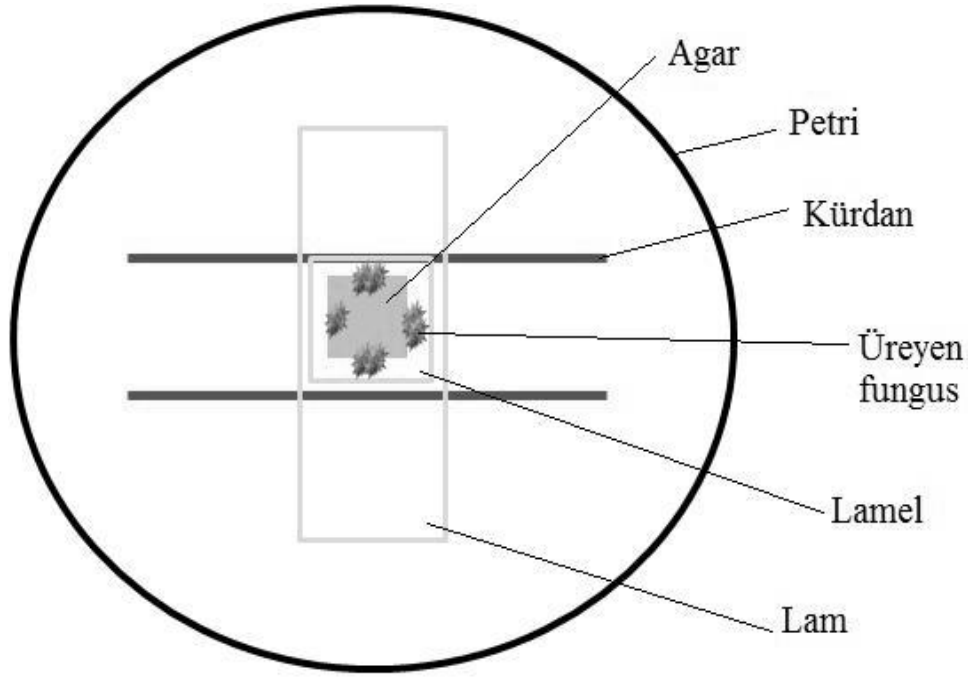
2.4.1. Morfolojik Tür Tayini

İlk olarak izolatların kadavralardaki görüntüleri ve etkileri belirlendi. Bunun için kadavralar steriomikroskopu ile incelendi. Fungusların misel yapılarının görüntülenmesi için ise agar blok kültürü hazırlandı ve miseller aseto-orsein boyası ile boyanarak mikroskopta incelemeleri yapıldı. Hazırlanan preparatların mikroskop altındaki incelemeleri sonucunda misellerin yapıları, spor şekilleri ve renkleri, havai olup olmadıkları, konidioforların yapıları incelendi ve sporların çap ve boy ölçümleri yapıldı. İzole edilen fungusların tür tayini Dr. Richard Humber (USDA-ARS Collection of Entomopathogenic Fungi, Ithaca, NY, USA) tarafından yayınlanan “Entomopathogenic Fungal Identification” adlı kaynaktan yararlanılarak yapıldı (Humber, 1997). Tür tayinini doğrulamak amacıyla bütün izolatlar Dr. Richard Humber’ın laboratuvarına gönderilerek onaylandı.

2.4.1.1. Agar Blok Kültürü

Agar blok kültürünün hazırlanması için eritilmiş PDA steril bir petri kutusuna ince bir tabaka (2-3 mm. kalınlıkta) halinde dökülür ve katılaşması beklendi. Agar, steril ve keskin bir bistüri ile 10 X 10 mm boyutlarında bloklar kesilir. Bunlar, steril bir pens ile alınarak, steril bir lâmin üzerine yerleştirildi. Bu agar bulunan lâm, steril petri kutusunda bulunan kürdanların (veya cam çubuğun) üzerine yerleştirildi. Agar bloğun kenarlarının orta yerine inokülasyon yapıldı ve lâmel ile kapatıldı (Şekil 5). Gerekli nemin sağlanması için petri kutusunun içine, distile suya veya %20 su + %80 gliserin karışımına batırılmış pamuk konuldu. Petriler kapatıldıktan sonra, 25-27°C’de 4-8 gün inkubasyona bırakıldı (koloniler iyice görülünceye kadar). Bu sürenin sonunda, agar bloğun üzerindeki lâmel bir pens ile kaldırıldı. Lâmelin mantarlı yüzeyine % 96’lık alkolden 1 damla damlatıldı ve bunun fungus kolonileri üzerine yayılması sağlandı. Tam bir kuruma elde edildikten sonra

lâmel, temiz bir lâm üzerinde bulunan lakto fenol pamuk mavisi solusyonuna, mantarlı yüz alt tarafa gelecek şekilde yerleştirildi. Boyanan preparat mikroskop altında incelendi.



Şekil 5. Fungal örneklerin 'Scotch tape' tekniğiyle mikroskopik incelenmesi

Fazla boya solusyonu akıtıldıktan sonra etrafı oje ile kapatılabilir. Geride kalan agar bloğu, üzerinde lakto fenol pamuk mavisi olan lâm üzerine tersine döndürülerek yatırıldı ve üzerine lâmel kapatıldı. Preparat mikroskopta incelendi. Mikroskop çalışmalarında Leica DM 1000, ışık mikroskobu kullanıldı. Funguslanmanın zamanına bağlı olarak kültürlerin konidiafor yapıları, miselleri ve spor şekilleri incelendi. Farklı cinslere ait fungusların spor çapları ölçüldü. Konidiaforların dallanma şekilleri, sporların büyüklükleri ve şekilleri arasındaki farklar not edildi.

2.4.2. Fungal İzolatların Moleküler Karakterizasyonu

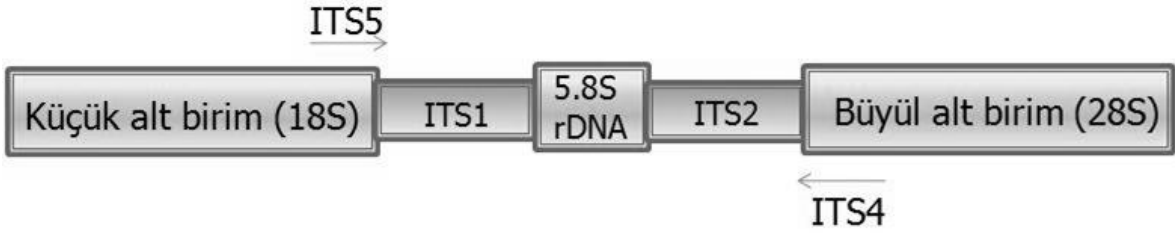
2.4.2.1. DNA İzolasyonu

Fungal izolatlardan DNA izolasyonu yapmak için ZR Tissue & Insect DNA MiniPrep kiti kullanıldı. İzolasyon için öncelikle fungusların PDA besiyerine ekimleri yapıldı ve 28°C'de 1 haftalık süre ile inkübasyona bırakıldı. Büyüyen funguslardan

yaklaşık 50 mg ağırlığında doku kesilerek alındı. Doku lisis tüplerine transfer edildikten sonra üzerine 750 µl lisis solusyonu eklenerek doku parçalayıcı içinde homojenize edildi. Doku parçalayıcıdan alınan tüpler 10.000 rpm de 1 dk santrifüj edildi. Pipet yardımıyla süpernetant kısımdan 400 µl alınarak filtrasyon tüplerine aktararak 1 dk 7.000 rpm'de santrifüj edildi. Filtrenin altında kalan sıvıya 1.200 µl genomik lisis solusyonu eklendi. Oluşan karışım DNA'nın tutunacağı filtreli tüplere alınarak 10.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Filtre yeni bir tüpe alınarak yıkama işlemi 200 µl ön yıkama solusyonu ile yıkama yapıldı ve 10.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Tüpün altında kalan sıvı uzaklaştırılarak ikinci kez yıkama yapmak için 500 µl fungal-bakteriyal DNA yıkama solusyonu eklendi. Tüpler bu haliyle 10.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek, DNA'nın saklanacağı ependorf tüplere alındı. Son olarak filtrenin üzerine 50 µl DNA Elution Buffer bırakılarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen DNA'lar -20 °C'de saklandı.

2.4.2.2. rRNA ITS1-5.8S-ITS2 Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması ve Veri Analizleri

18S ve 23S rRNA alt üniteleri arasında kalan ITS1-5.8S-ITS2 bölgelerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması için ileri ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' ve geri ITS4: 5'TCCTCCGCTTATTGATATCG- 3' primerleri kullanıldı (Şekil 6) (White vd., 1990). Reaksiyon karışımı, her bir 200 µM dNTP, 50 pmol primerden, 2,5 unite *Taq*-DNA-polimeraz, 5 µl 10X *Taq* DNA polimeraz reaksiyon tamponu, 50 ng genomik DNA içerecek şekilde hazırlandı. Son hacim ddH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı. Çoğaltma işlemi 200 µl'lik tüplerde "Biometra Personal Cycler" cihazında gerçekleştirildi. PCR koşulları: 95°C'de 5 dk'lık denatürasyondan sonra 95°C'de 1 dk, 50°C'de 45 sn. ve 72°C'de 2 dk. halinde 35 döngü ve son adım olarak 72°C'de 10 dk. olacak şekilde gerçekleştirildi (Muro vd., 2005). PCR reaksiyonu sonucu elde edilen ürünlerden 5'er µl alınarak 0,5 µg/ml etidyum bromür katkılı %1'lik agaroz jelde 90 V'de 45 dk elektroforez edildi ve "BioDocAnalyze" sistemiyle görüntülendi. DNA dizi analizi için PCR ürünleri MacroGen firması (Kore)'na gönderilerek, dizi analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen yaklaşık 500-600 bp uzunluğundaki 18S rRNA dizileri tür tayinini doğrulamak amacıyla NCBI GenBank'ta var olan dizilerle karşılaştırılarak aralarındaki benzerlik oranları ortaya çıkarıldı.



Şekil 6. ITS1-5.8S-ITS2 bölgesini çoğaltmak için kullanılan primerlerin pozisyonları. Reaksiyonda ITS5 ileri ve ITS4 geri primer olarak kullanılmıştır.

2.4.2.3. *Uzama Faktörü-1-alfa (EF1-α), RPB1, RPB2a, RPB2b Bloc ve β-Tubulin* Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması

ITS gen bölgelerine göre *Beauveria* ve *Metarhizium* cinsine ait olduğu belirlenen izolatların tür tanımlamalarının moleküler düzeyde doğrulamak için ilave gen bölgeleri çoğaltılarak dizi analizi yapıldı. Bu gen bölgelerinden *EF1-α*, *RPB1*, *RPB2a* ve *RPB2b* bölgeleri *Beauveria* ve *Metarhizium* cinsleri için ortaktır. Ancak, *Bloc Beauveria*, *β-Tubulin* ise *Metarhizium* cinsi için spesifik bölgelerdir.

Her iki cinse ait izolalardan yukarıda belirtildiği gibi DNA izolasyonu yapıldı. *Beauveria* cinsi için *EF1-α*, *RPB1*, *RPB2a*, *RPB2b* ve *Bloc* gen bölgeleri PCR ile çoğaltıldı (Rehner vd. 2011). *EF1-α* gen bölgesinin yaklaşık olarak 1150 bp'lik, *RPB1* bölgesinin 800 bp'lik, *RPB2a* bölgesinin 1150 bp'lik, *RPB2b* bölgesinin 1000 bp'lik ve *Bloc* bölgesinin 1050 bp'lik bölgeleri çoğaltılarak DNA dizi analizi yapıldı ve filogenetik ağaçları çizildi.

Metarhizium cinsi için *EF1-α*, *RPB1*, *RPB2a*, *RPB2b* ve *β-Tubulin* gen bölgeleri PCR ile çoğaltıldı (Bischoff vd. 2009). *EF1-α*, *RPB1*, *RPB2a* ve *RPB2b* bölgeleri *Beauveria* cinsi için verilen baz çifti dizileri ile aynı uzunlukta, *β-Tubulin* bölgesi ise 1350 bp'lik uzunluğunda çoğaltılarak DNA dizi analizi yapıldı ve filogenetik ağaçları çizildi.

EF1-α bölgesi için ileri olarak EF1T (5'-TGGGTAAGGARGACAAGAC-3') ve geri olarak 1567R (5'-CHGTRCCRATACCACCSATCTT-3') primer çifti 1150 bp'lik bölgeyi çoğaltmak için, *RPB1* bölgesi için ileri olarak RPB1Af (5'-GARTGYCCDGGDCAYTTYGG-3') ve geri olarak RPB1C (5'-CCNGCDATNTCRTRTCCATRTA-3') primer çifti 800 bp'lik bölgenin çoğaltılması için, *RPB2a* bölgesi için ileri olarak Frpb2-5F (5'-GAYGAYMGWGATCAYTTYGG-3') ve geri olarak RPB2-7cR (5'-CCCATRGCTTGYTTRCCCAT-3') primer çifti 1150 bp'lik

bölgenin çoğaltılması için, *RPB2b* bölgesi için ileri olarak Frpb2-7cf (5'-ATGGGYAARCAAGCYATGGG-3') ve geri olarak RPB2-3053R (5'-TGRATYTTTRTCRTCSACCATRTG-3') primer çifti 1000 bp'lik bölgeyi çoğaltmak için, β -*Tubulin* bölgesi için ileri olarak T1 (5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3') ve geri olarak T22 (5'-TCTGGATGTTGTTGGGAATCC-3') primer çifti 1350 bp'lik bölgeyi çoğaltmak için, *Bloc* bölgesi için ileri olarak B5.1F (5'-CGACCCGGCCAACTACTTTGA-3') ve geri olarak B3.1R (5'-GTCTTCCAGTACCACTACGCC-3') primer çifti 1050 bp'lik bölgeyi çoğaltmak için kullanıldı (Rehner vd. 2011, Bischoff vd. 2009). (S=G veya C, R=A veya G, H=A, C veya T).

Tablo 4. *Beauveria* ve *Metarhizium* türlerinin moleküler karakterizasyonunda kullanılan gen bölgeleri ve primer sıraları.

Genler	Kullanılan primerler	Uzunluk (bp)
<i>EF1-α</i>	EF1T: 5'-TGGGTAAGGARGACAAGAC-3' 1567R: 5'-CHGTRCCRATACCACCSATCTT-3'	1150
<i>RPB1</i>	RPB1Af: 5'-GARTGYCCDGGDCAYTTYGG-3' RPB1C: 5'CCNGCDATNCRTRTCCATRTA-3'	800
<i>RPB2a</i>	Frpb2-5F: 5'-GAYGAYMGWGATCAYTTYGG-3' RPB2-7cR: 5'-CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT-3'	1150
<i>RPB2b</i>	Frpb2-7cf: 5'-ATGGGYAARCAAGCYATGGG-3' RPB2-3053R: 5'-TGRATYTTTRTCRTCSACCATRTG-3'	1000
β - <i>Tubulin</i>	T1: 5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3' T22: 5'-TCTGGATGTTGTTGGGAATCC-3'	1350
<i>Bloc</i>	B5.1F: 5'-CGACCCGGCCAACTACTTTGA-3' B3.1R: 5'-GTCTTCCAGTACCACTACGCC-3'	1050

PCR koşulları, Rehner ve Buckley (2005) tarafından uygulanan metoda göre yapıldı. PCR reaksiyonu toplam 50 μ l hacim olacak şekilde; 10 μ l 10X PCR buffer, 1 μ l dNTP karışımı (1.25 mM herbir dNTP'den), 10'ar pmol primer, 0.5 μ l *Taq* polimeraz ve 5-20 ng genomik DNA olacak şekilde gerçekleştirildi. Son hacim ddH₂O ile 50 μ l'ye tamamlandı. PCR işlemleri 'touchdown PCR prosedürü' kullanılarak yapıldı (Rehner ve Buckley, 2005). Touchdown PCR reaksiyonu 98°C'de 30 sn. denatürasyon ile başlatıldı. Sonraki basamak 98°C'de 10 sn, 50°C'de 30 sn ve 72°C 30 sn ayarlanarak 35 döngü ve son olarak 72°C'de 10 dk inkübasyon olacak şekilde gerçekleştirildi. PCR reaksiyonundan oluşan ürünlerden 5'er μ l alınarak 0.5 μ g/ml etidyum bromür katkılı %1'lik agaroz jelde 90 V'de 45 dakika yürütüldü ve geri kalan PCR ürünleri DNA dizi analizi için Macrogen firması (Kore)'na gönderildi. Elde edilen DNA dizileri tür tayinlerini doğrulamak için NCBI

GenBank'ta yer alan DNA dizileri ile karşılaştırıldı ve filogenetik analizleri gerçekleştirildi.

2.5. Fungal İzolatların Patojenite Testleri

İzolatlar, her ne kadar böcekten izole edilmiş olsa da bunların entomopatojenik olup olmadıklarını doğrulamak ve virulanslarını belirlemek için patojenite testleri yapıldı.

2.5.1. Spor Süspansiyonlarının Hazırlanması

Patojenite testlerinde kullanılan fungal izolatların 1×10^7 spor/ml'lik stok solusyonlarından PDAY besiyeriye 100 µl yayma ekim yapıldı ve 25°C'de 2-3 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Büyüme periyodunun sonunda, tek koloniler seçilerek başka bir PDAY besiyerine transfer edildi ve 25°C'de 4 hafta boyunca inkübe edildi. Büyüyen fungusların üzerine 10 ml steril % 0,01'lik Tween 80 eklendi ve cam baget ile kazınarak sporlar elde edildi. Spor süspansiyonları iki katlı steril tülbent ile 50 ml'lik steril falkon tüplerine süzülerek misel ve agar parçalarının uzaklaştırılması sağlandı. Elde edilen süspansiyonlar 5 dk vortekslenerek homojen hale getirildi. Spor konsantrasyonları Neubauer hemositometresi ile sayılarak arzu edilen konsantrasyonlara ayarlandı. Sporların yaşayabilirliği, 100 µl spor süspansiyonun PDAY agar üzerine yayma ekim yapılması ve 24 saatlik bir inkübasyondan sonra çimlenme özelliğinin belirlenmesi ile test edildi. Germ tüpü spor çapından büyük olan sporlar çimlenmiş olarak kabul edildi. Bunun sonucunda %95 oranında çimlenen sporlar patojenite testlerinde kullanıldı.

2.5.2. İzolatların *Galleria mellonella* Üzerindeki Patojenite Testleri

İzolatların entomopatojenik olup olmadığının belirlenmesi için ilk olarak bir laboratuvar kültürü olan *Galleria mellonella* üzerinde patojenite testleri yapıldı. Yukarıdaki gibi hazırlanan spor süspansiyonları 1×10^7 spor/ml'ye ayarlandı. Larvalar spor süspansiyonlarında 1–2 dk bekletilerek enfekte edildi. Kontrol grubundaki larvalar ise %0,01'lik Tween 80 ile muamele edildi (Goettel ve Inglis, 1997). Spor bulaştırılan larvalar içerisinde yapay besiyeri bulunan plastik kaplara yavaşça transfer edildi. Her izolat için deneyler 3'er kez tekrar edildi ve her bir deney kabı 10 adet larva içerecek şekilde

hazırlandı. Deney süresi 15 gün olarak belirlendi ve böcekler 5., 10. ve 15. günlerde sayılarak ölümler deney kaplarından uzaklaştırılarak kurutma kağıdı ihtiva eden steril petrilere transfer edildi. Ölü larvaların mikoz oranlarının belirlenmesi için petrilere %60 nem ortamında 28°C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı ve yüzde ölüm ve mikozlanma değerleri hesaplandı.

2.5.3. İzolatların *Grylotalpa grylotalpa* Üzerindeki Entomopatojenite Testleri

Biyotestlerde kullanılan *G. grylotalpa* nimfleri Trabzon'un çeşitli tarım alanlarından toplanarak laboratuara getirildi ve sağlıklı nimfler seçilerek biyotestlerde kullanıldı. Spor süspansiyonları Bölüm 2.5.1.'de belirtilen şekilde hazırlandıktan sonra konsantrasyon 1×10^7 'ye ayarlandı ve nimfler 1-2 dk süspansiyona maruz bırakılarak sporun nimflere bulaşması sağlandı. Kontrol grubu ise steril %0,01'lik Tween 80 ile muamele edildi. Nimfler spor süspansiyonuna batırıldıktan sonra içerisinde steril toprak ve besin bulunan plastik kaplara transfer edildi. Muamele edilen böcekler, içerisinde patates bulunan plastik kutulara konuldu. Bütün deneyler 3 defa tekrar edildi. Deney düzenekleri 20°C'de 12: 12 (I:K) ışık periyodunda 15 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. İncelemeler 5. 10. ve 15. günlerde yapıldı ve 15. gün sonunda ölü nimfler sayıldı ve yüzde ölüm değerleri hesaplandı. Yüzde mikoz değerini hesaplamak için ise ölü bulunan larva ve erginler %1'lik sodyum hipoklorit çözeltisi ile yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra 3 kez steril ditle su ile yıkandı ve steril nemli filtre kağıdı içeren petrilere alındı. Bunu takiben sporlaşan larva ve erginler sayılarak yüzde mikoz değerleri hesaplandı.

2.6. Veri Analizi

Elde edilen bütün DNA dizileri BioEdit (Hall, 1999, version 7.09) programı ile düzenlendi ve NCBI GenBank'ta blastlanarak GenBank'ta yer alan diğer DNA dizileri ile yüzde benzerlikleri belirlendi. Buradan elde edilen veriler, izolatların morfolojik ve ITS gen tanımlamalarını doğrulamak için kullanıldı. DNA dizilerinin Cluster analizi aynı şekilde BioEdit programını kullanarak Clustal W programı ile yapıldı ve buradan elde edilen veriler MEGA5 filogenetik programı yardımıyla neighbor-joining (NJ) analizinde kullanıldı. Aligment boşlukları kayıp veri olarak değerlendirildi. Oluşturulan dendrogramların güvenilirliği MEGA5 programı kullanarak seç-bağla (bootstrap) analizi ile 1000 tekrarlı olacak şekilde test edildi.

Biyotestlerden elde edilen veriler Abbott formülü kullanılarak anlamlandırıldı ve aynı zamanda ölü böcekler nem bölümünde bekletilerek yüzde mikoz değerleri hesaplandı (Abbott, 1925). Elde edilen veriler SPSS 15.0 programı kullanılarak analiz edildi. Patojenite verilerinin analizinde varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. İzolatların kontrol grubu ile karşılaştırılmasında ise Dunnett'in tek yönlü t testi kullanıldı.

3. BULGULAR

Danaburnu (*Gryllotalpa gryllotalpa*) ile fungal mücadelede yeni bir etmen belirlemeye yönelik olarak yapılan bu çalışmada, zararlının fungal florası belirlendi. Bu çalışma sonucunda zararlıdan 15 fungal izolat elde edildi ve bunların saf kültürleri oluşturuldu. İzolatların morfolojik ve moleküler karakterizasyonları gerçekleştirildikten sonra 15 izolatın model organizma *Galleria mellonella* ve *G. gryllotalpa* üzerindeki insektisidal etkileri araştırıldı. Yapılan çalışmalarda aşağıdaki sonuçlara ulaşıldı.

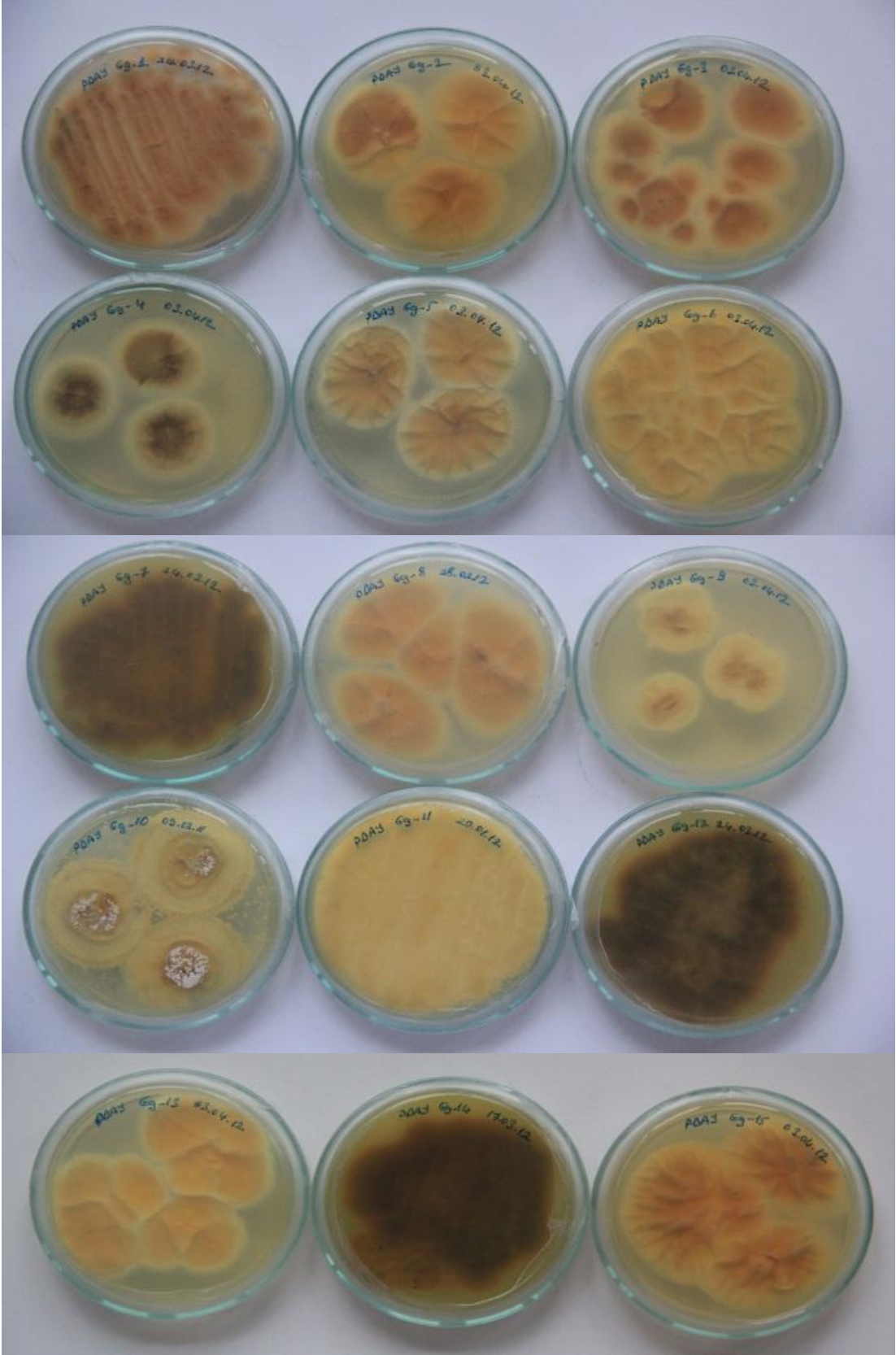
3.1. *Gryllotalpa gryllotalpa*'dan Fungus İzolasyonu

Yapılan arazi çalışmaları sonucunda labaratuara getirilen 100 adet danaburnu fungal enfeksiyon yönünden araştırıldı. Bu örnekler, günlük olarak incelemeye tabi tutuldu ve vücut yapıları sertleşmiş ve mikozlanmaya uğramış kadavralardan (Şekil 6) yapılan izolasyon sonucunda 15 adet izolat elde edildi. Bu izolatlar Gg-1, Gg-2, Gg-3, Gg-4, Gg-5, Gg-6, Gg-7, Gg-8, Gg-9, Gg-10, Gg-11, Gg-12, Gg-13, Gg-14, Gg-15 şeklinde kodlandı.

3.2. İzolatların Morfolojik Tür Tayinleri

İzole edilen fungal izolatlar ilk olarak böceklerde meydana gelen enfeksiyon şekline göre değerlendirildi. Buna ilave olarak izolatların agar besiyerinde meydana getirdikleri koloni morfolojileri de değerlendirildi (Şekil 7). İzolatların mikroskobik yapıları (spor, fiyalid, konidioforlar vb.) 'Scotch tape' ve 'Slide mounts' tekniklerine göre hazırlanan preparatların 40X ve 100X'lik objektifte incelenmesiyle sağlandı (Şekil 8). Bunun sonucunda elde edilen veriler ile 'Entomopatojenik Fungal Identifikasyon' isimli teşhis anahtarı (Humber, 1997) kullanılarak morfolojik olarak tür tayinleri yapıldı.

İzolatların morfolojik tür tayinlerini doğrulamak açısından bütün örnekler bu konuda uzman bir araştırmacı olan Dr. Richard Humber'a (USDA-ARS Collection of Entomopathogenic Fungi, Ithaca, NY, USA) gönderilip, teyit edildi. Fungusların birer örneği de ARSEF'de stoklandı. İzolatların *Beauveria*, *Clonostachys*, *Metarhizium* ve



Şekil 7. *Gryllotalpa gryllotalpa*'dan izole edilen fungus cinslerine ait koloni morfolojileri.

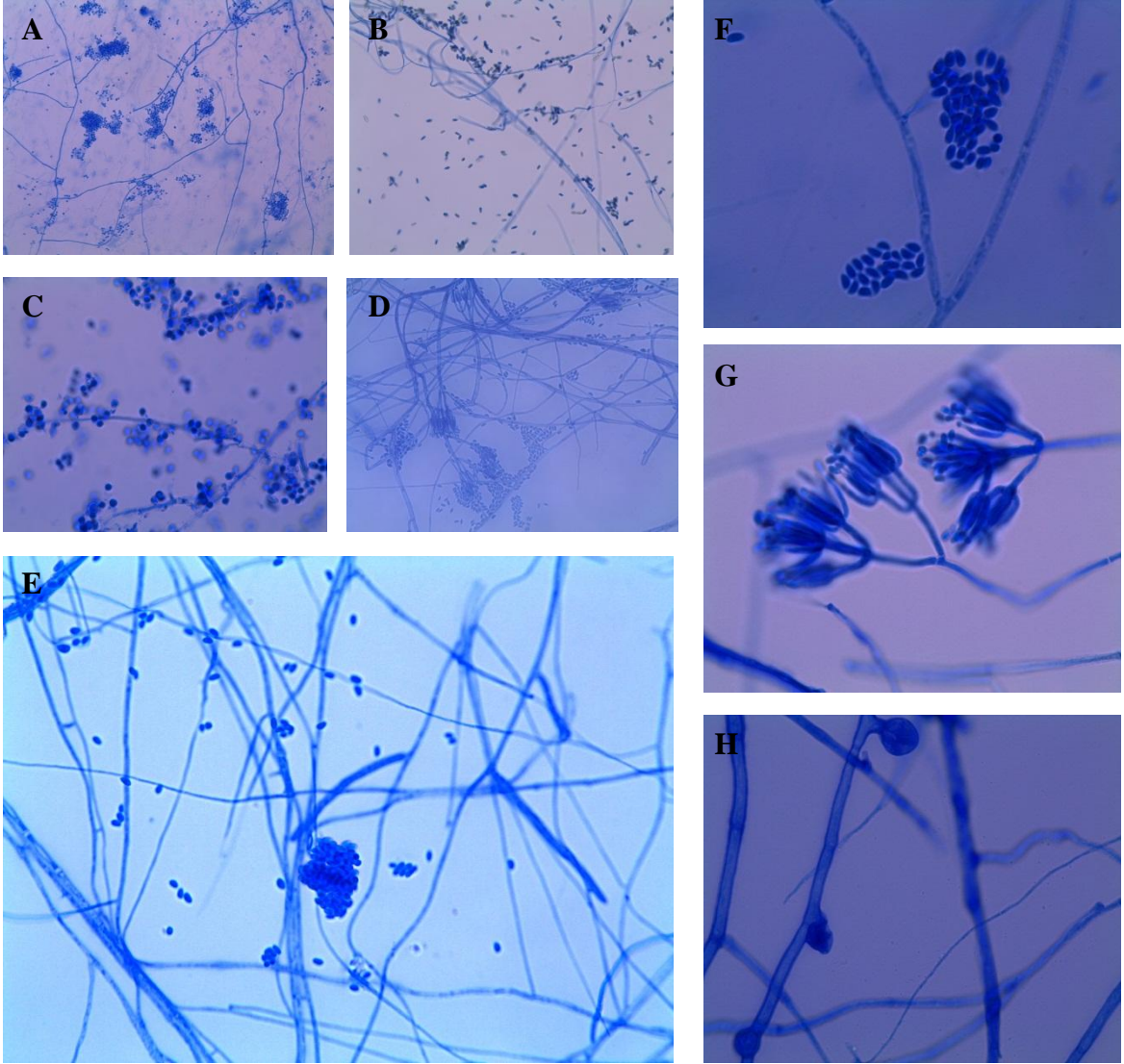
Myriodontium olmak üzere 4 farklı cinse ait oldukları bulundu. *Gryllotalpa gryllotalpa*'dan izole edilen 15 izolatin, morfolojik karakterizasyon sonucunda sırasıyla *Beauveria bassiana* (ARSEF 11688), *Clonostachys* sp. (ARSEF 11689, ARSEF 11690, ARSEF 11691, ARSEF 11693, ARSEF 11695, ARSEF 11700, ARSEF 11701, ARSEF 11702) *Metarhizium anisopliae* (ARSEF 11694) ve *Myriodontium keratinophilum* (ARSEF 11697, ARSEF 11698) olduğu belirlendi (Tablo 5). *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Myriodontium keratinophilum* ve *Clonostachys* sp. izolatları bu çalışma ile ilk kez *G. gryllotalpa*'dan izole edilmiştir.

Beauveria cinsine ait funguslar yüzeyi tozsu, pamuksu görünümde, düzgün yuvarlak koloniler oluşturur. Koloni başlangıçta beyaz, sonraları pembe-ten rengi bir renk alır. *Clonostachys* cinsine ait funguslar beyaz renkli koloniler oluşturmakla beraber bu cinse ait farklı türler sporlanmaya başladıklarında pembemsi bir renk alır. *Myriodontium* cinsine ait funguslar beyaz renkli, pamuğumsu görünümde ve düzgün yuvarlıktır. *Metarhizium* cinsine ait funguslar ise tozsu yeşil renkte spor oluştururlar. Ayrıca enfeksiyon sonucunda böcekleri saran yeşil renkli misel oluşumu gözlenir.

Agar blok kültüründe 4-8 gün inkübasyonun ardından büyüyen funguslar lakto fenol pamuk mavisi ile boyanarak, preparatların mikroskop incelemeleri yapıldı. Mikroskop incelemelerinde fungusların konidiafor yapıları, spor boyları ve şekilleri, miselleri ve spor oluşumları incelendi. 40X ve 100X'lik objektifte Leica DM 1000, ışık mikroskobu kullanılarak her izolatin fotoğrafları çekildi. Elde edilen görüntüler Şekil 8'de gösterilmektedir.

Beauveria cinsine ait fungusların spor şekillerinin tam yuvarlak olduğu tespit edildi. Bu fungusların konidiyajen hücreleri (konidiya üreten hücreler) globoz ya da şişe şeklinde ve çoğunlukla zig-zag'lı bir yapı oluşturmalarıyla karakteristiktir. Çok sayıda, ufak, mikrokonidyumlar konidyoforlar çevresinde kümeler oluşturabilir (Şekil 8 A).

Clonostachys cinsine ait funguslar beyaz renkli koloniler oluşturmakla beraber bu cinse ait farklı türler sporlanmaya başladıklarında pembemsi bir renk alır. Konidiafor yapıları oldukça belirgin ve parlaktır. Üzüm salkımı veya süpürge gibi farklı şekillerde konidiafor yapıları mevcuttur ve konidiaforların uç kısmında konidium oluşumu gözlenir (Şekil 8 D,E,F,G).



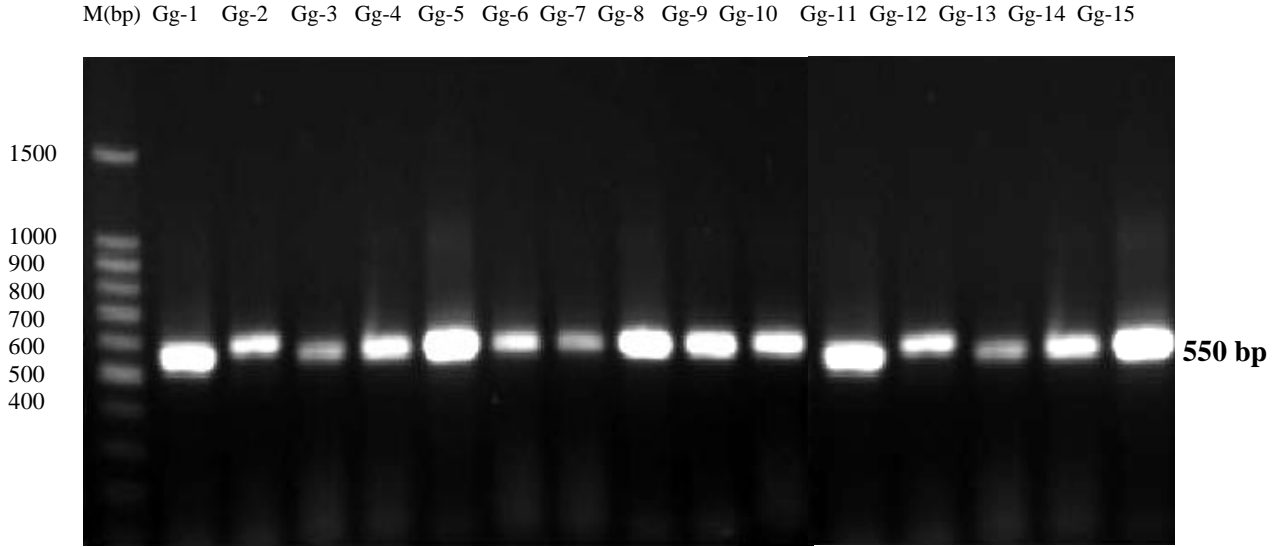
Şekil 8. İzolatların spor ve konidiafor yapıları. A: *Beauveria bassiana* B: *Metarhizium anisopliae*. C: *Myriodontium keratinophilum* D: *Clonostachys* sp. E: *Clonostachys* sp. F: *Clonostachys* sp. G: *Clonostachys* sp. H: *Clonostachys* sp.

Tablo 5. Fungal izolatların morfolojik tür tayinleri

İzolat No	Kaynak	Tür Tayini	ARSEF No	Toplama Tarihi
Gg-1	Ergin	<i>Beauveria bassiana</i>	11688	15.04.2010
Gg-2	Ergin	<i>Clonostachys rosea</i>	11689	15.04.2010
Gg-3	Ergin	<i>Clonostachys rosea</i>	11690	15.04.2010
Gg-4	Ergin	<i>Clonostachys rosea</i>	11691	15.04.2010
Gg-5	Ergin	<i>Clonostachys rosea</i>	11692	15.04.2010
Gg-6	Ergin	<i>Clonostachys rosea</i>	11693	15.04.2010
Gg-7	Ergin	<i>Metarhizium anisopliae</i>	11694	15.04.2010
Gg-8	Ergin	<i>Clonostachys rosea</i>	11695	15.04.2010
Gg-9	Ergin	<i>Clonostachys rosea</i>	11696	15.04.2010
Gg-10	Nimf	<i>Fusarium sp.</i>	11697	20.03.2011
Gg-11	Nimf	<i>Myriodontium keratinophilum</i>	11698	20.03.2011
Gg-12	Ergin	<i>Metarhizium anisopliae</i>	–	20.03.2011
Gg-13	Nimf	<i>Clonostachys rosea</i>	11700	20.03.2011
Gg-14	Nimf	<i>Metarhizium anisopliae</i>	–	20.03.2011
Gg-15	Nimf	<i>Clonostachys rosea</i>	11702	20.03.2011

3.3. İzolatların Moleküler Karakterizasyonları

Fungal izolatların moleküler karakterizasyonlarının gerçekleştirilmesi amacıyla *B. bassiana* izolatları için ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgesinin yaklaşık olarak 581 bp'lik, *Metarhizium* izolatları için yaklaşık 559 bp'lik, *Clonostachys* izolatları için yaklaşık 525 bp'lik ve *Myriodontium keratinophilum* sp. izolatları için yaklaşık 528 bp'lik gen bölgesi PCR ile çoğaltıldı. Elde edilen bantlar Şekil 9'da gösterilmektedir.

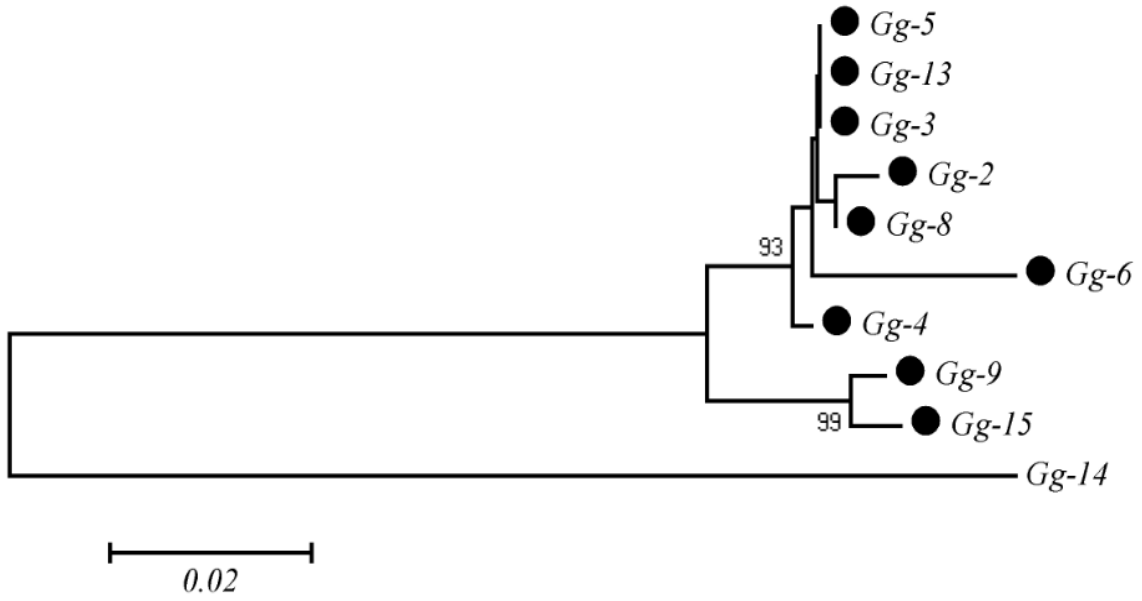


Şekil 9. Fungal izolatların rDNA ITS1-5.8S-ITS2 bölgesinin PCR ile çoğaltılması. M: 100 bp DNA ladder

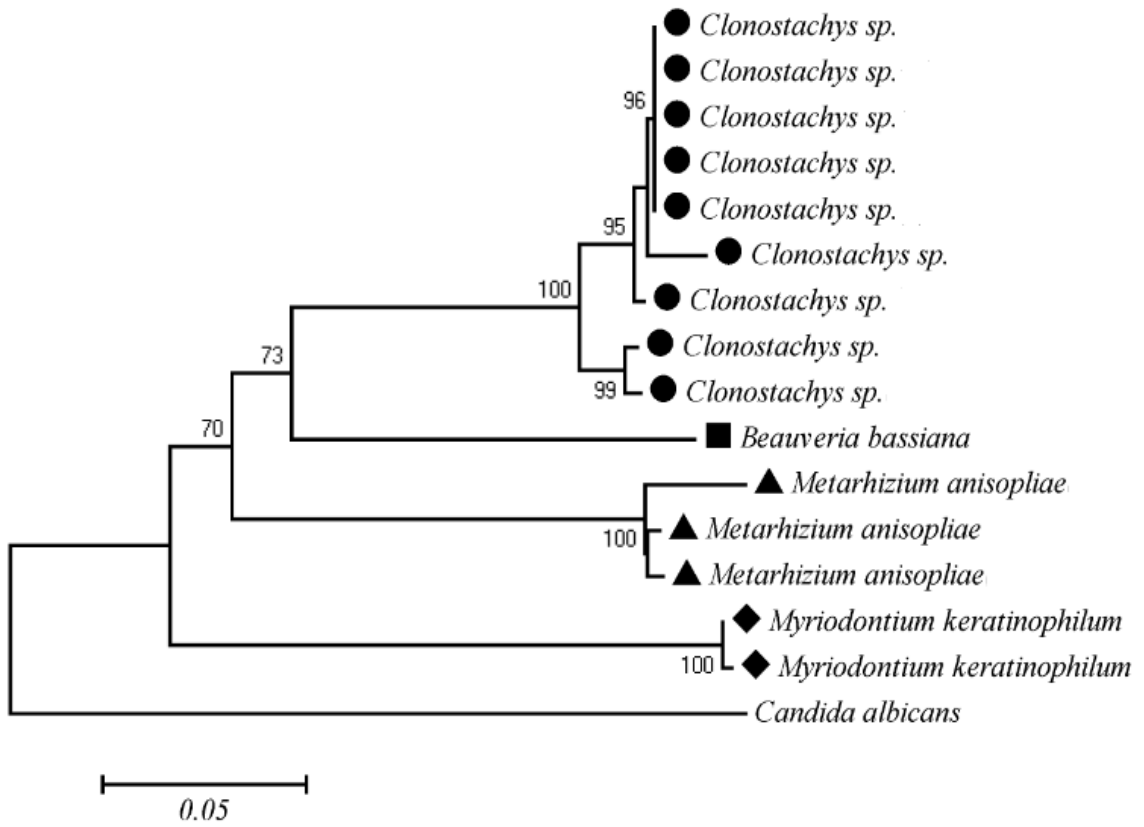
Elde edilen ITS DNA dizileri NCBI GenBank'ta blastlanarak izolatların GenBank'ta yer alan diğer entomopatojenik fungus türleri ile yüzde benzerlik oranları belirlendi. Morfolojik olarak *Beauveria bassiana* olarak tanımlanan 1 adet izolat *Beauveria* türleri ile karşılaştırıldı ve bu izolatın ITS dizi analizi sonucunda % 99 oranında *B. bassiana* ile homoloji gösterdiği belirlendi. Morfolojik tür tayinlerine göre 3 izolat *Metarhizium anisopliae* olarak tanımlandı. GenBank'ta yer alan diğer *Metarhizium* türleri ile karşılaştırıldı ve tür tayinleri doğrulandı. Morfolojik karakterizasyon sonucunda *Myriodontium keratinophilum* olarak belirlenen 2 adet izolatın ITS bölgesinin DNA dizi analizi yapıldı ve NCBI GenBank'ta blastlanarak GenBank'ta yer alan diğer *Myriodontium* türleri ile karşılaştırılarak tür tayinleri doğrulandı. Buna göre, izolatın % 99 oranında *M. keratinophilum* ile homoloji gösterdiği belirlendi. Morfolojik tür tayinlerine göre 9 izolat *Clonostachys* sp. olarak tanımlandı. Bu izolatlar GenBank'ta yer alan diğer *Clonostachys* türleri ile karşılaştırıldı ve buna göre bütün *Clonostachys* sp. izolatlarının %98 ile %100 arasında homoloji gösterdiği belirlendi (Tablo 6). Ayrıca, bu izolatların farklı suşlar olduğunu ıspatlamak için filogenetik ağaçları çizildi (Şekil 10). Son olarak *G. gryllotalpa*'dan izole edilen 15 izolatın kendi aralarındaki filogenetik ağaçları çizilerek aynı cinslerin kendi aralarındaki akrabalık dereceleri belirlendi (Şekil 11).

Tablo 6. Fungus izolatlarının rRNA ITS1-5.8S-ITS2 dizisine göre tür tayinleri

İzolatlar	Türler	ITS benzerliği	Acession No
Gg-1	<i>Beauveria bassiana</i>	%99	DQ682566
	<i>Beauveria bassiana</i> voucher FJAT-9719	%99	JQ320366
Gg-2	<i>Clonostachys</i> sp. LF254	%99	FR822797
	<i>Clonostachys</i> sp. CBS 118525	%99	AJ890438
Gg-3	<i>Clonostachys</i> sp. CBS 118525	%99	AJ890438
	<i>Clonostachys</i> sp. LF254	%100	FR822797
Gg-4	<i>Clonostachys</i> sp. C18	%99	JN198459
	<i>Clonostachys</i> sp. LF576	%99	FR822830
Gg-5	<i>Clonostachys</i> sp. CBS 118525	%100	AJ890438
	<i>Clonostachys</i> sp. LF254	%100	FR822797
Gg-6	<i>Clonostachys</i> sp. LF254	%98	FR822797
	<i>Clonostachys</i> sp. CBS	%98	AJ890438
Gg-7	<i>Metarhizium anisopliae</i> isolate LSPK	%99	FJ545314
	<i>Metarhizium anisopliae</i> isolate CNGD4	%99	FJ545279
Gg-8	<i>Clonostachys</i> sp. CBS 118525	%99	AJ890438
	<i>Clonostachys</i> sp. LF254	%99	FR822797
Gg-9	<i>Clonostachys</i> sp. INBio2890D	%99	HM770981
	<i>Clonostachys rogersoniana</i> strain CBS	%99	AF210691
Gg-10	<i>Myriodontium keratinophilum</i>	%99	EU925387
Gg-11	<i>Myriodontium keratinophilum</i>	%98	EU925387
Gg-12	<i>Metarhizium anisopliae</i> isolate LSPK	%97	FJ545314
	<i>Metarhizium anisopliae</i> isolate CNGD4	%97	FJ545279
Gg-13	<i>Clonostachys</i> sp. CBS	%99	AJ890438
	<i>Clonostachys</i> sp. LF254	%100	FR822797
Gg-14	<i>Metarhizium anisopliae</i> isolate KTU-32	%99	FJ177479
	<i>Metarhizium anisopliae</i> isolate LSPK	%99	FJ545314
Gg-15	<i>Clonostachys</i> sp. INBio2890D	%99	HM770981
	<i>Clonostachys rogersoniana</i> strain CBS	%99	AF210691



Şekil 10. *Clonostachys* sp. izolatlarının ITS dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı. *Gg-14* (*Metarhizium anisopliae*) dış grup olarak kullanılmıştır.

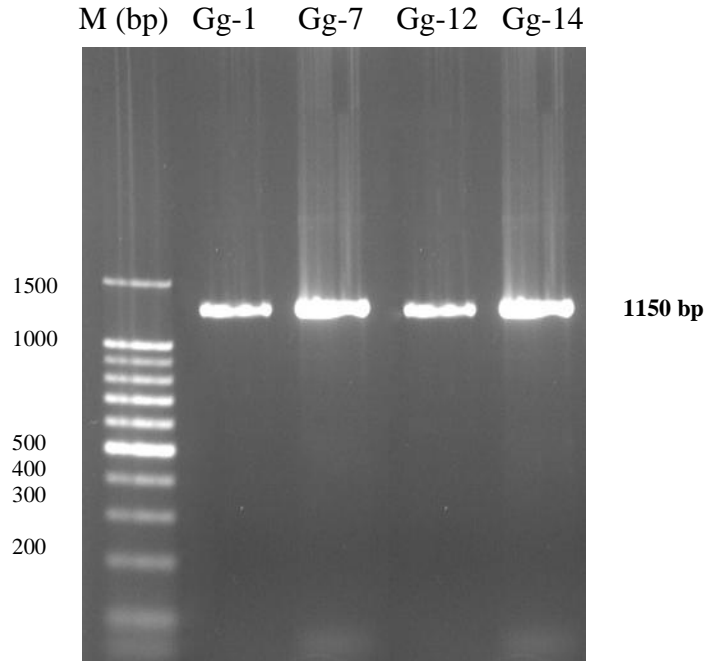


Şekil 11. İzolatlarının ITS dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı. *Candida albicans* dış grup olarak kullanılmıştır.

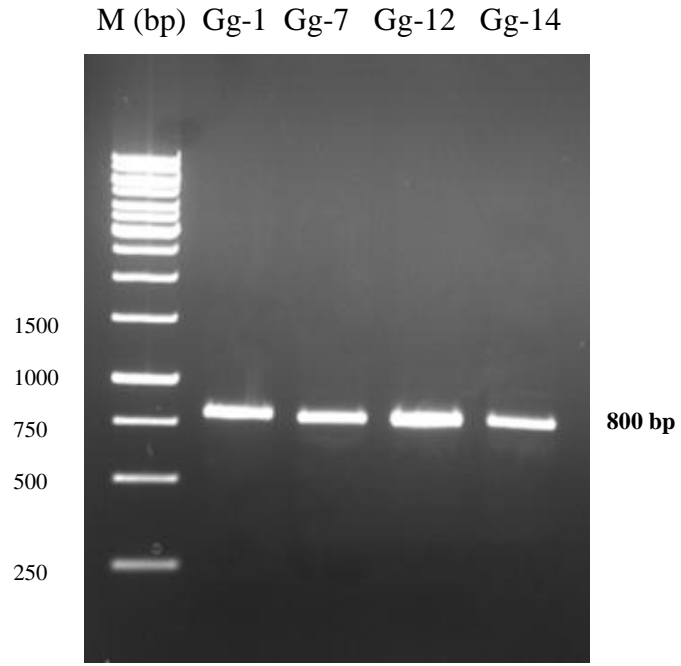
Son yıllarda *Beauveria* ve *Metarhizium* cinslerinin yeni taksonomik revizyonları yapıldı (Bischoff vd., 2009; Rehner vd., 2011). Her iki cinste de ITS gen bölgelerinden başka *EF1- α* , *RPB1*, *RPB2a*, *RPB2b*, *Bloc* ve *β -Tubulin* gen bölgelerinin de veri analizi yapılmıştır.

Beauveria ve *Metarhizium* cinslerinin ayrıntılı tanımlamalarını yapmak amacıyla *EF1- α* bölgesi için yaklaşık 1150 bp, *RPB1* bölgesi için 800 bp, *RPB2a* bölgesi için 1150 bp, *RPB2b* bölgesi için 1000 bp ve *Bloc* bölgesi için 1050 bp'lik gen bölgeleri PCR ile çoğaltıldı. Elde edilen bantlar Şekil 11, 12, 13, 14 ve 16'da gösterilmektedir. Belirtilen gen bölgelerine ilave olarak *Metarhizium* izolatları için *β -Tubulin* bölgesinin 1350 bp'lik gen bölgesi çoğaltıldı. Elde edilen bantlar Şekil 11, 12, 13, 14 ve 15'de gösterilmektedir. Elde edilen DNA dizileri NCBI GenBank'ta blastlanarak izolatların GenBank'ta yer alan diğer *Beauveria* ve *Metarhizium* türleri ile yüzde benzerlik oranları belirlendi.

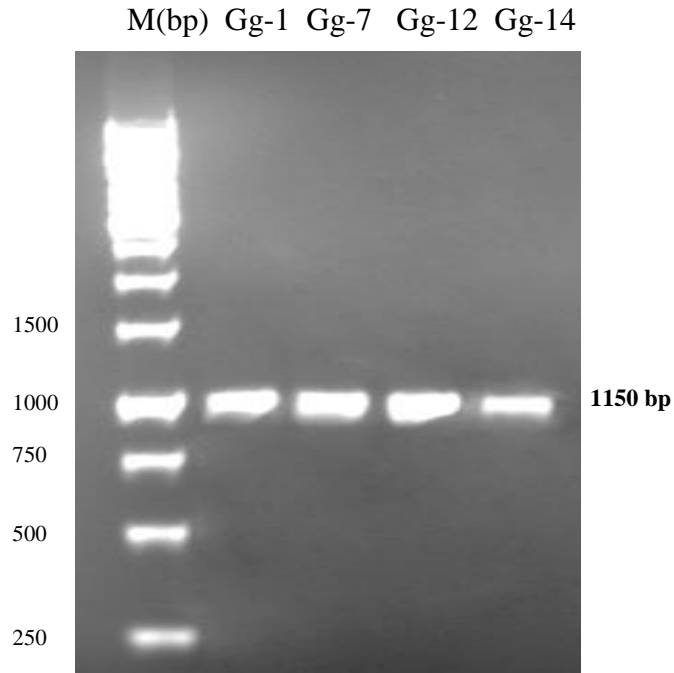
ITS gen bölgesi dizi analizleri ve morfolojik tanımlamalar sonucunda *Beauveria bassiana* olarak tanımlanan 1 adet izolat diğer *Beauveria* türleri ile karşılaştırıldı ve bu izolatın *EF1- α* , *RPB1*, *RPB2a*, *RPB2b* ve *Bloc* gen bölgelerinin blastlanması sonucunda % 99 oranında *Beauveri bassiana* ile homoloji gösterdiği belirlendi (Tablo 7).



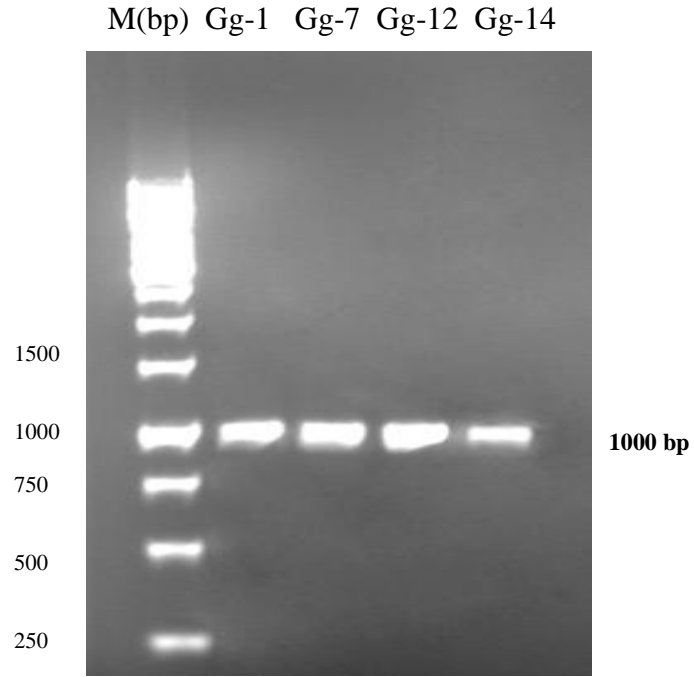
Şekil 12. Bazı *Beauveria* ve *Metarhizium* izolatlarının *EF1- α* bölgesinin PCR ile çoğaltılması. M: 1000 bp DNA ladder



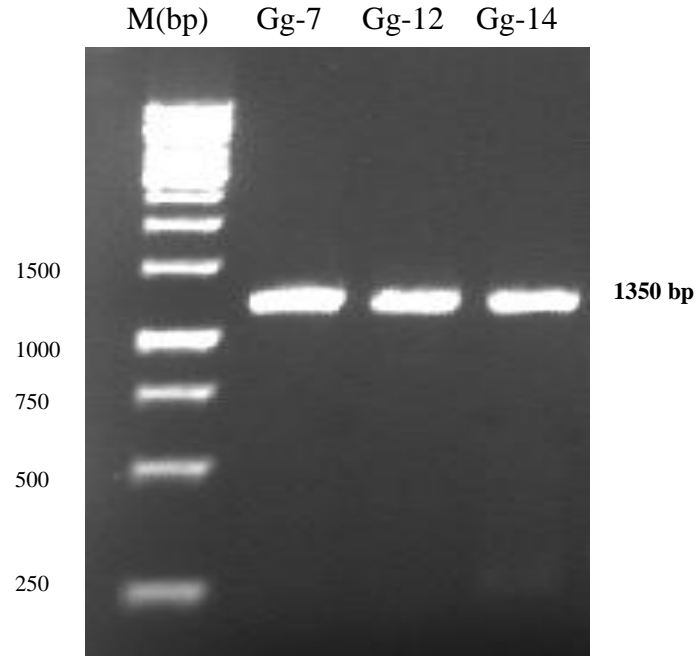
Şekil 13. Bazı *Beauveria* ve *Metarhizium* izolatlarının *RPB1* bölgesinin PCR ile çoğaltılması. M: 1000 bp DNA ladder.



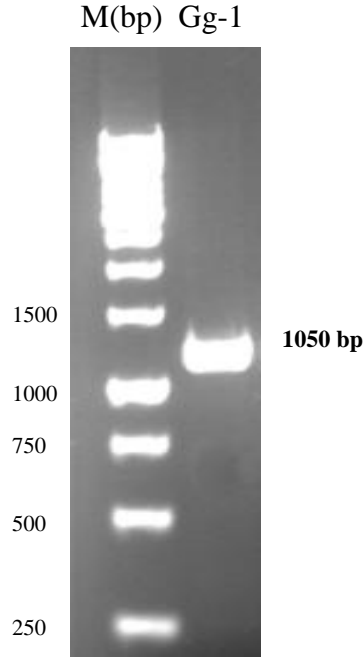
Şekil 14. Bazı *Beauveria* ve *Metarhizium* izolatlarının *RPB2a* bölgesinin PCR ile çoğaltılması. M: 1000 bp DNA ladder.



Şekil 15. Bazı *Beauveria* ve *Metarhizium* izolatlarının *RPB2b* bölgesinin PCR ile çoğaltılması. M: 1000 bp DNA ladder.



Şekil 16. Bazı *Metarhizium* izolatlarının β -*Tubulin* bölgesinin PCR ile çoğaltılması. M: 1000 bp DNA ladder.

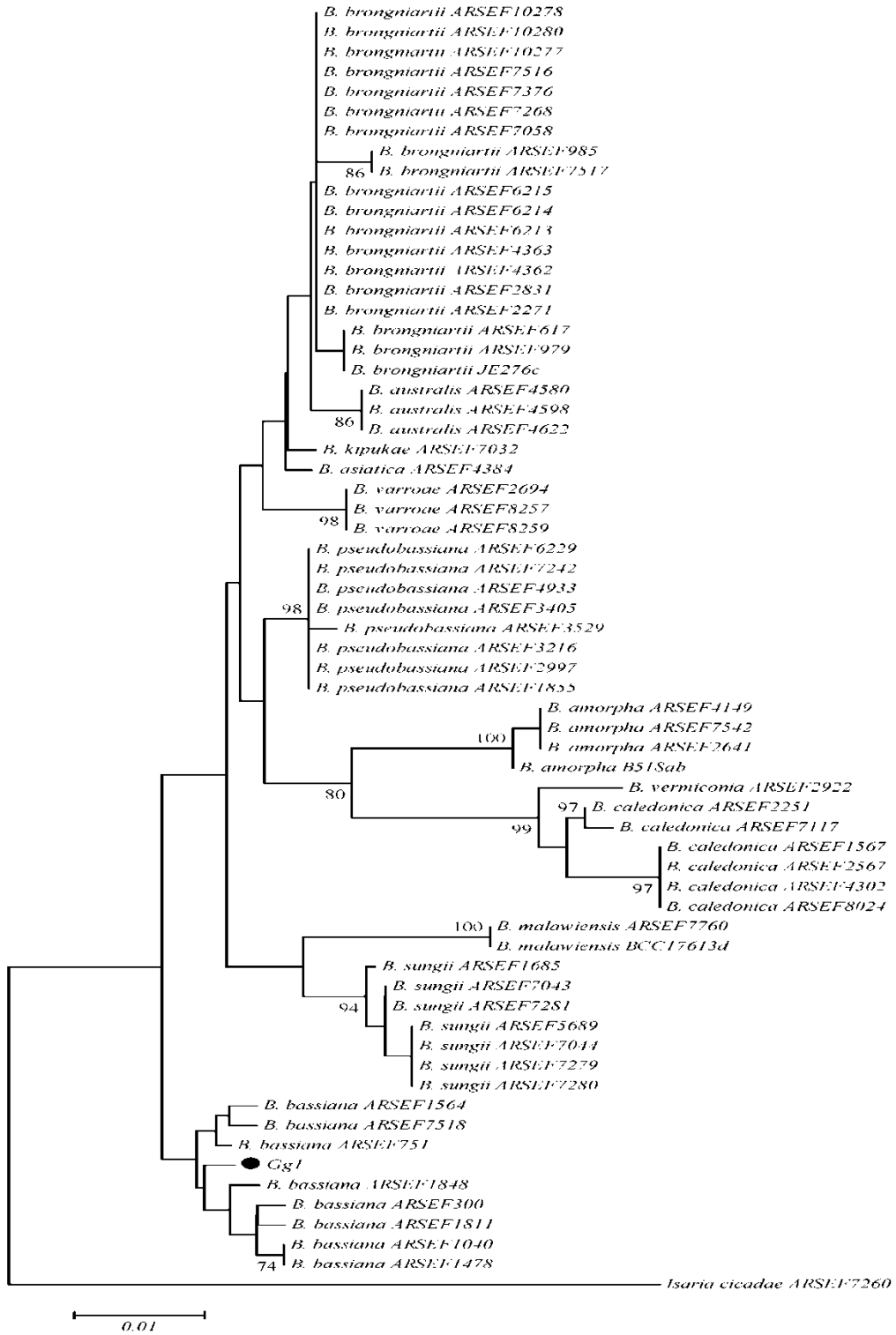


Şekil 17. *Beauveria* izolatının *Bloc* bölgesinin PCR ile çoğaltılması. M: 1000 bp DNA ladder.

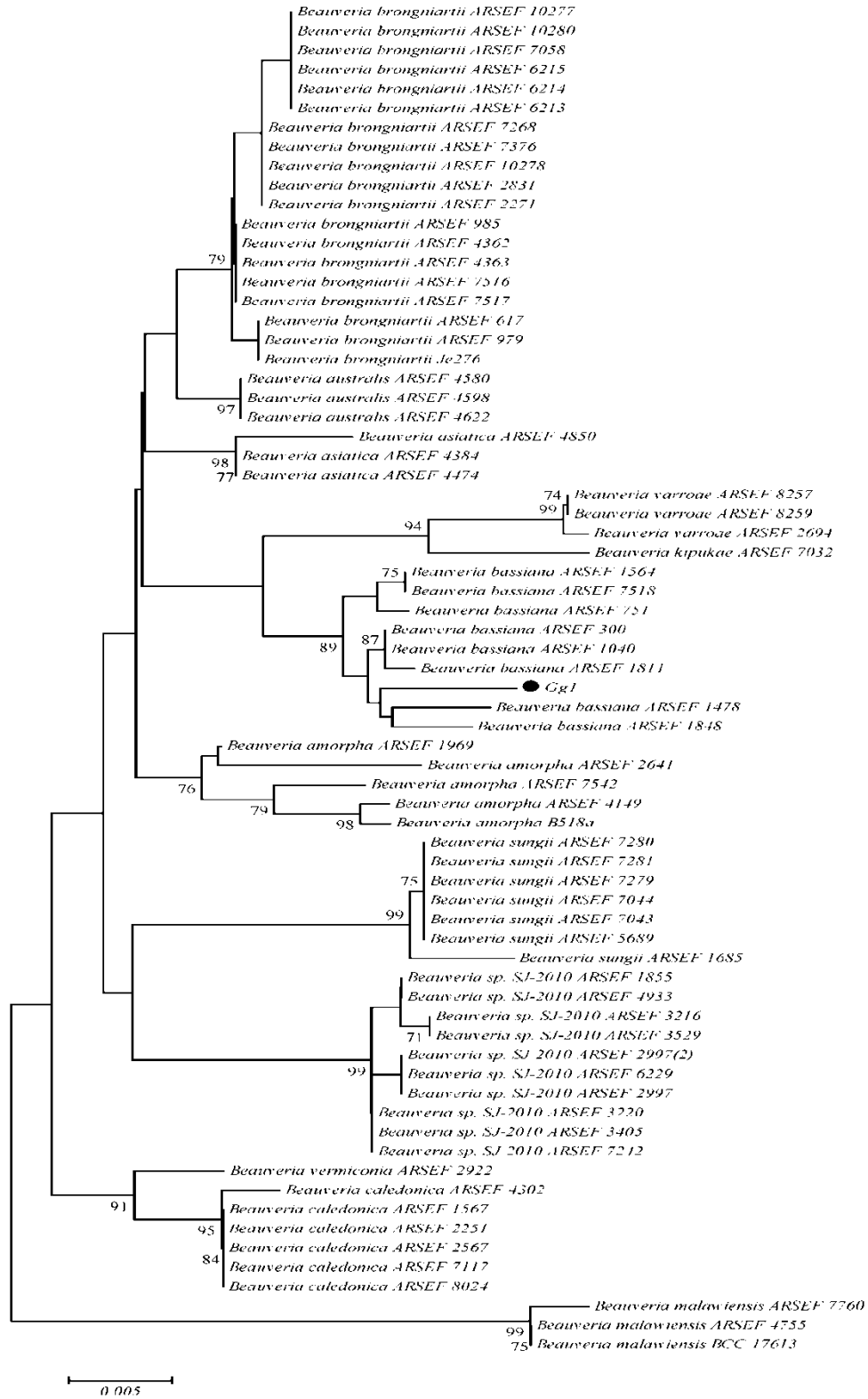
Tablo 7. Gg-1 izolatının *EF1- α* , *RPB1*, *RPB2a*, *RPB2b* ve *Bloc* gen bölgelerine göre tür tayinleri

Genler	Türler	Benzerlik	Genbank Kodu
<i>EF1-α</i>	<i>Beauveria bassiana</i> isolate 252	%99	AY531913
	<i>Beauveria bassiana</i> isolate 1479	%99	AY531891
<i>RPB1</i>	<i>Beauveria bassiana</i> strain ARSEF 300	%99	HQ880831
	<i>Beauveria bassiana</i> strain ARSEF 1040	%99	HQ880830
<i>RPB2a</i>	<i>Beauveria bassiana</i> strain ARSEF 1811	%99	HQ880909
	<i>Beauveria bassiana</i> strain ARSEF 751	%99	HQ880907
<i>RPB2b</i>	<i>Beauveria bassiana</i> strain ARSEF 300	%99	HQ880903
	<i>Beauveria bassiana</i> strain ARSEF 1478	%99	HQ880908
<i>Bloc</i>	<i>Beauveria bassiana</i> strain ARSEF 1456	%99	DQ384356
	<i>Beauveria bassiana</i> strain IBL 03006	%99	DQ384358

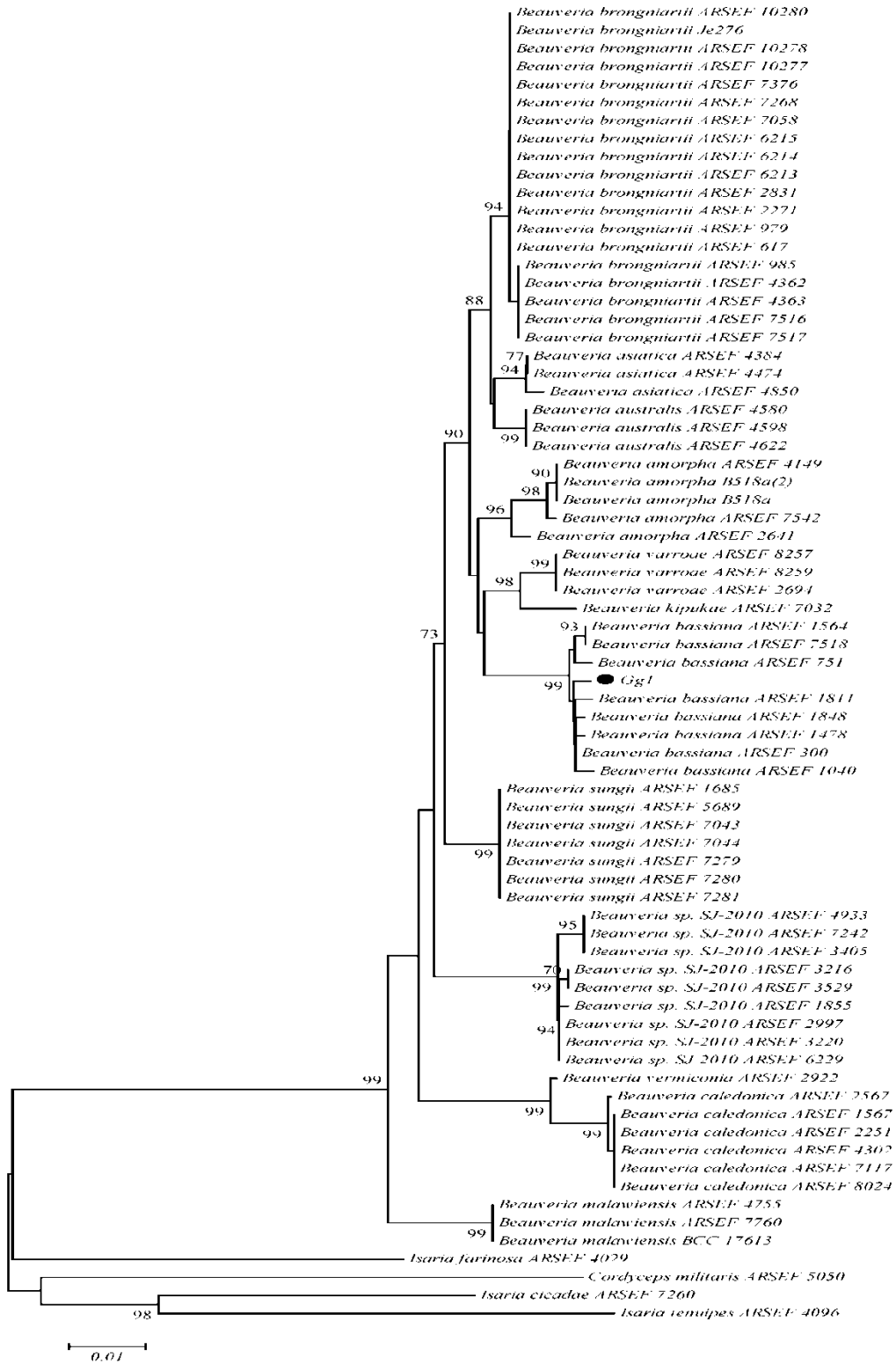
B. bassiana izolatlarının taksonomik pozisyonlarını son revizyona göre belirlemek için elde edilen ITS, RPB1, RPB2b dizileri filogenetik analizlerde kullanıldı. *Beauveria* cinsine ait olduğu morfolojik ve ITS gen bölgesi ile belirlenen Gg-1 kodlu izolat ile *Beauveria* genusunun son taksonomik revizyonunun yer aldığı, Rehner vd. (2011)'leri tarafından yapılan çalışmadaki tüm *Beauveria* izolatları karşılaştırıldı. ITS, RPB1, RPB2b dizilerine göre çizilen filogenetik ağaçta morfolojik olarak *B. bassiana* olarak tanımlanan Gg-1 izolatının taksonomik pozisyonları Şekil 17, 18 ve 19'da görülmektedir.



Şekil 18. Gg-1 izolatının Rehner vd. (2011)'lerinin çalışmasında kullanılan *Beauveria* türleri ile ITS dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı. Seç-bağla (bootstrap) değerlerinin %70 ve yukarısı olanlar belirtildi.



Şekil 19. Gg-1 izolatının Rehner vd. (2011)'lerinin çalışmasında kullanılan *Beauveria* türleri ile RPBI dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı. Seç-bağla (bootstrap) değerlerinin %70 ve yukarısı olanlar belirtildi.



Şekil 20. Gg-1 izolatının Rehner vd. (2011)'lerinin çalışmasında kullanılan *Beauveria* türleri ile RPB2 dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı. Seç-bağla (bootstrap) değerlerinin %70 ve yukarısı olanlar belirtildi.

Morfolojik karakterizasyon çalışmaları ve ITS gen bölgesi analiz çalışmalarına göre *Metarhizium anisopliae* olduğu belirlenen üç izolattın (Gg-7, Gg-12, Gg-14), *EF1- α* , *RPB1*, *β -Tubulin*, *RPB2a* ve *RPB2b* gen bölgelerinin NCBI GenBank'ta blastlanmaları sonucunda üç izolattın da *Metarhizium anisopliae* olduğu tespit edildi (Tablo 8, 9, 10).

Tablo 8. Gg-7 izolattının *EF1- α* , *RPB1*, *RPB2a*, *RPB2b* ve *β -Tubulin* gen bölgelerine göre tür tayini

Genler	Türler	Benzerlik	Genbank Kodu
<i>EF1-α</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i> strain ARSEF 7487	%98	DQ463996
	<i>Metarhizium anisopliae</i> strain E6	%97	AY445082
<i>RPB1</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i> strain ARSEF 3145	%99	DQ522399
	<i>Metarhizium anisopliae</i> strain ARSEF 7487	%99	DQ468355
<i>RPB2a</i>	<i>Metarhizium brunneum</i> ARSEF 4152	%99	EU248933
	<i>Metarhizium brunneum</i> ARSEF 4179	%99	EU248934
<i>RPB2b</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF 7450	%99	EU248932
	<i>Metarhizium anisopliae</i> strain ARSEF 7487	%99	DQ468370
<i>β-Tubulin</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i>	%99	AY995134
	<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF:7450	%99	EU248823

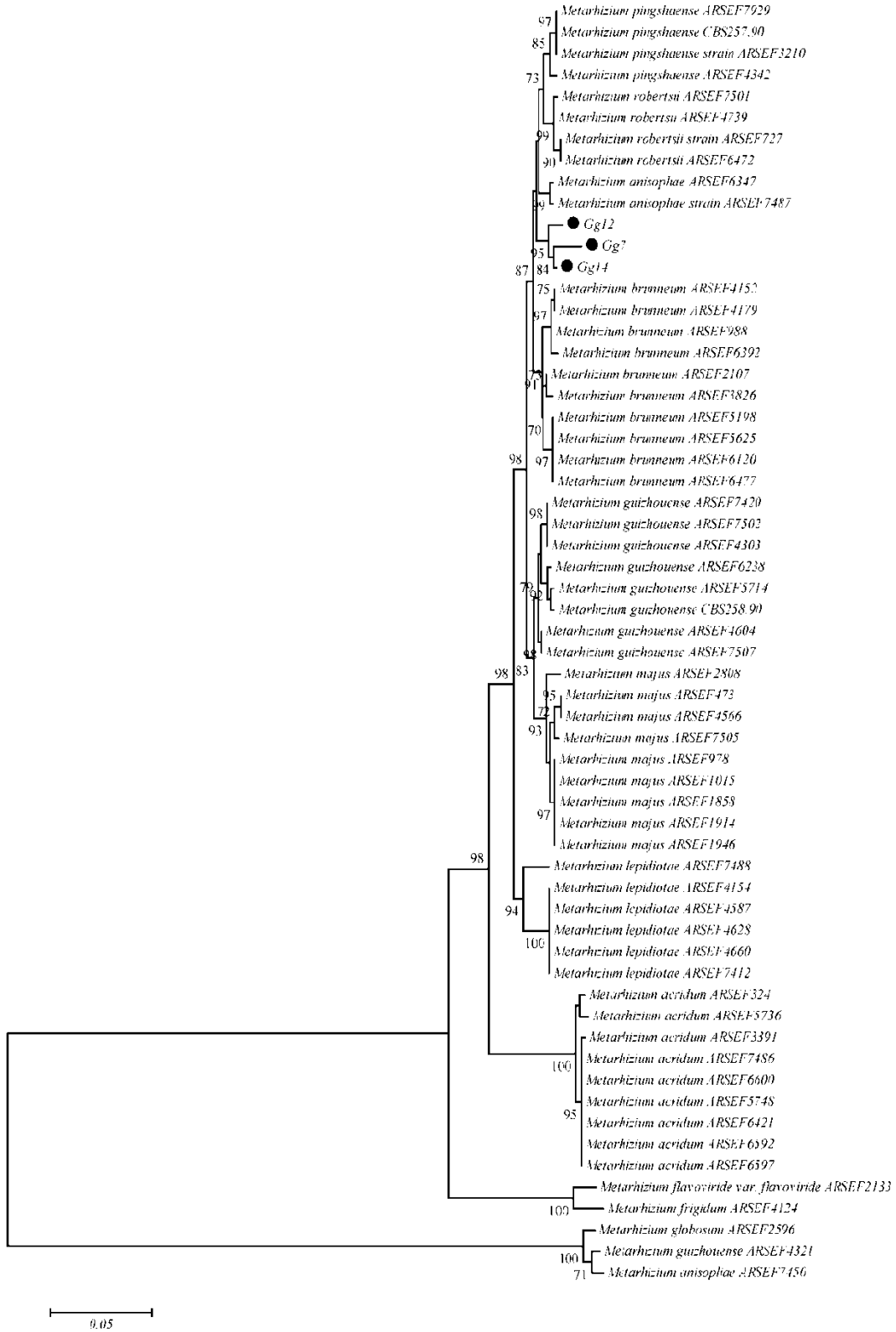
Tablo 9. Gg-12 izolattının *EF1- α* , *RPB1*, *RPB2a*, *RPB2b* ve *β -Tubulin* gen bölgelerine göre tür tayini

Genler	Türler	Benzerlik	Genbank Kodu
<i>EF1-α</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i> strain ARSEF 7487	%98	DQ463996
	<i>Metarhizium pingshaense</i> CBS:257.90	%98	EU248850
<i>RPB1</i>	<i>Metarhizium pingshaense</i> strain ARSEF 3210	%99	DQ468354
	<i>Metarhizium robertsii</i> strain ARSEF 727	%99	DQ468353
<i>RPB2a</i>	<i>Metarhizium brunneum</i> ARSEF:2107	%98	EU248935
	<i>Metarhizium brunneum</i> ARSEF:4152	%98	EU248933
<i>RPB2b</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF:7450	%99	EU248932
	<i>Metarhizium anisopliae</i> strain ARSEF 7487	%99	DQ468370
<i>β-Tubulin</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF:7450	%98	EU248823
	<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF:7487	%98	EU248822

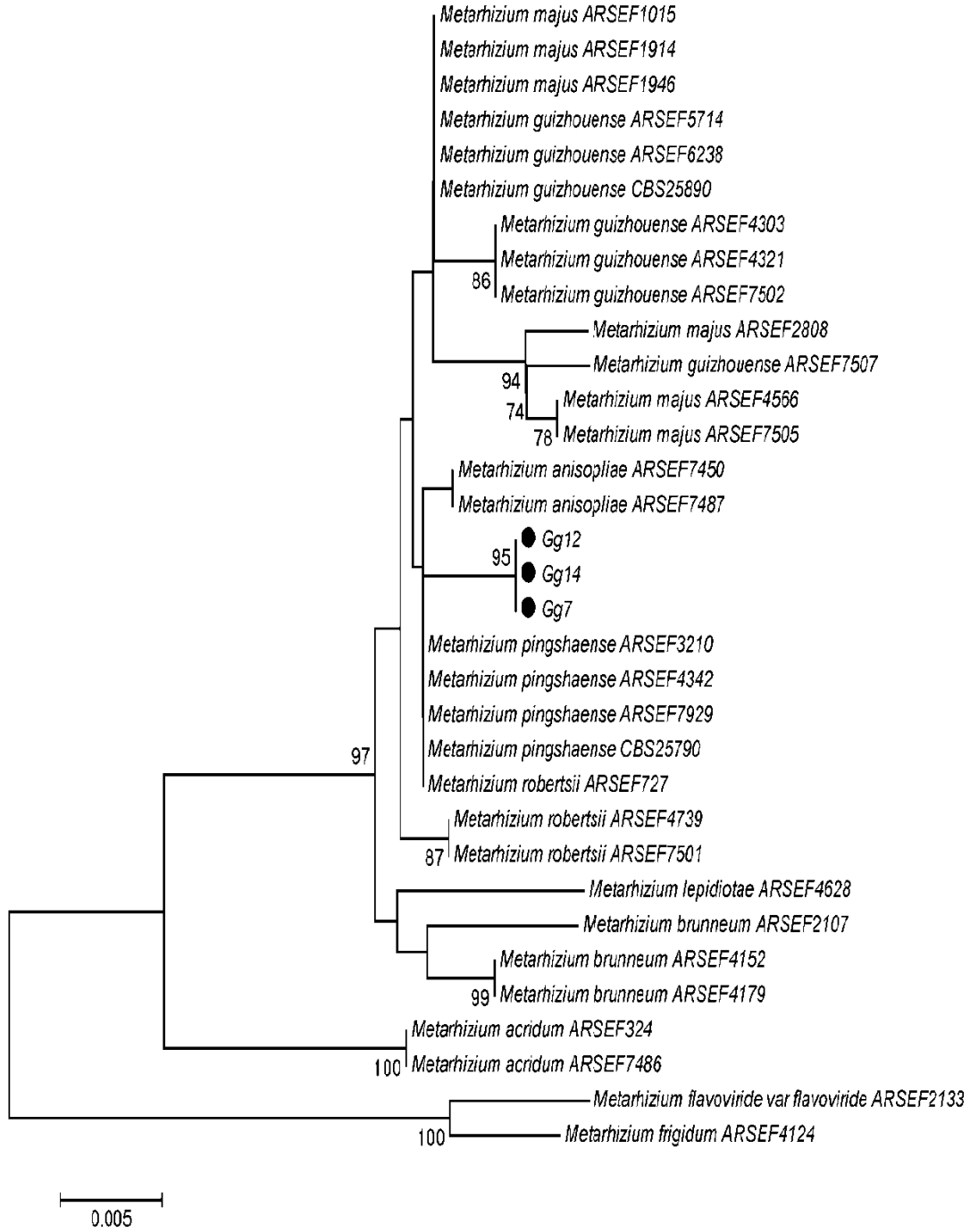
Tablo 10. Gg-14 izolatının *EF1- α* , *RPB1*, *RPB2a*, *RPB2b* ve *β -Tubulin* gen bölgelerine göre tür tayini

Genler	Türler	Benzerlik	Genbank Kodu
<i>EF1-α</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i> strain ARSEF 7487	%98	DQ463996
	<i>Metarhizium pingshaense</i> CBS:257.90	%98	EU248850
<i>RPB1</i>	<i>Metarhizium pingshaense</i> strain ARSEF 3210	%99	DQ468354
	<i>Metarhizium anisopliae</i> strain ARSEF 7487	%99	DQ468355
<i>RPB2a</i>	<i>Metarhizium brunneum</i> ARSEF:4152	%99	EU248933
	<i>Metarhizium brunneum</i> ARSEF:2107	%99	EU248935
<i>RPB2b</i>	<i>Metarhizium brunneum</i> ARSEF:4152	%97	EU248933
	<i>Metarhizium brunneum</i> ARSEF:4179	%97	EU248934
<i>β-Tubulin</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i>	%99	AY995134
	<i>Metarhizium brunneum</i> ARSEF:2107	%99	EU248823

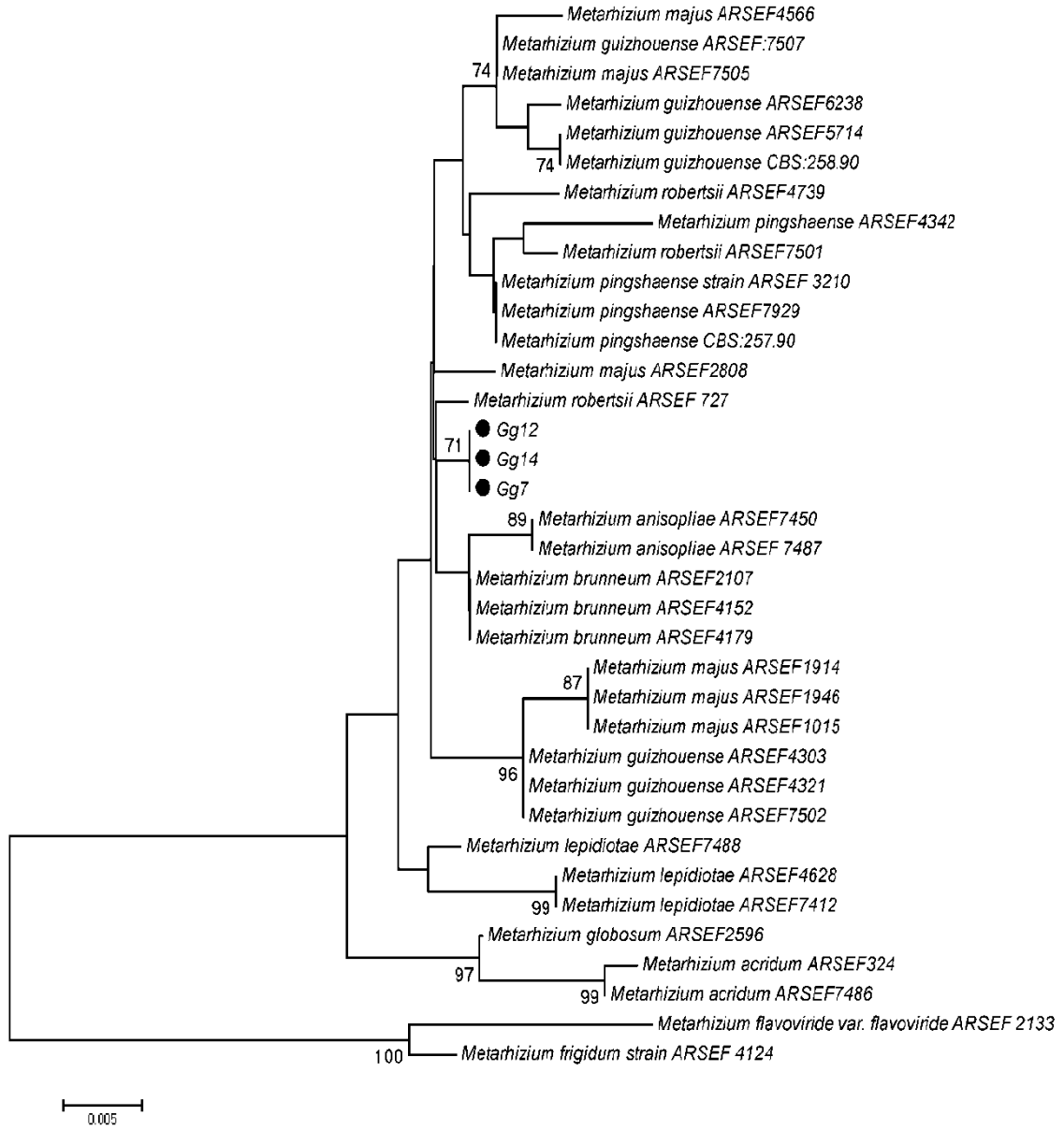
G. gryllotalpa'dan izole edilen ve morfolojik ve ITS gen bölgelerine göre *M. anisopliae* olduğu belirlenen izolatların taksonomik pozisyonlarını Bischoff vd. tarafından gerçekleştirilen son revizyona göre belirlemek için elde edilen *EF1- α* , *RPB1*, *RPB2a* ve *RPB2b* dizileri filogenetik analizlerde kullanıldı. *Metarhizium* genusunun son taksonomik revizyonunun yer aldığı, Bischoff vd. (2009)'leri tarafından yapılan çalışmadaki tüm *Metarhizium* izolatları karşılaştırıldı. *EF1- α* , *RPB1*, *RPB2a* ve *RPB2b* dizilerine göre yapılan filogenetik ağaçta morfolojik olarak *M. anisopliae* olarak tanımlanan 3 izolatın taksonomik pozisyonları görülmektedir (Şekil 20, 21, 22, 23). Bu filogenetik analizde *Gryllotalpa gryllotalpa*'dan izole edilen Gg-7, Gg-12 ve Gg-14 izolatlarının *M. anisopliae* ile yüksek oranda benzer olduğu görülmektedir.



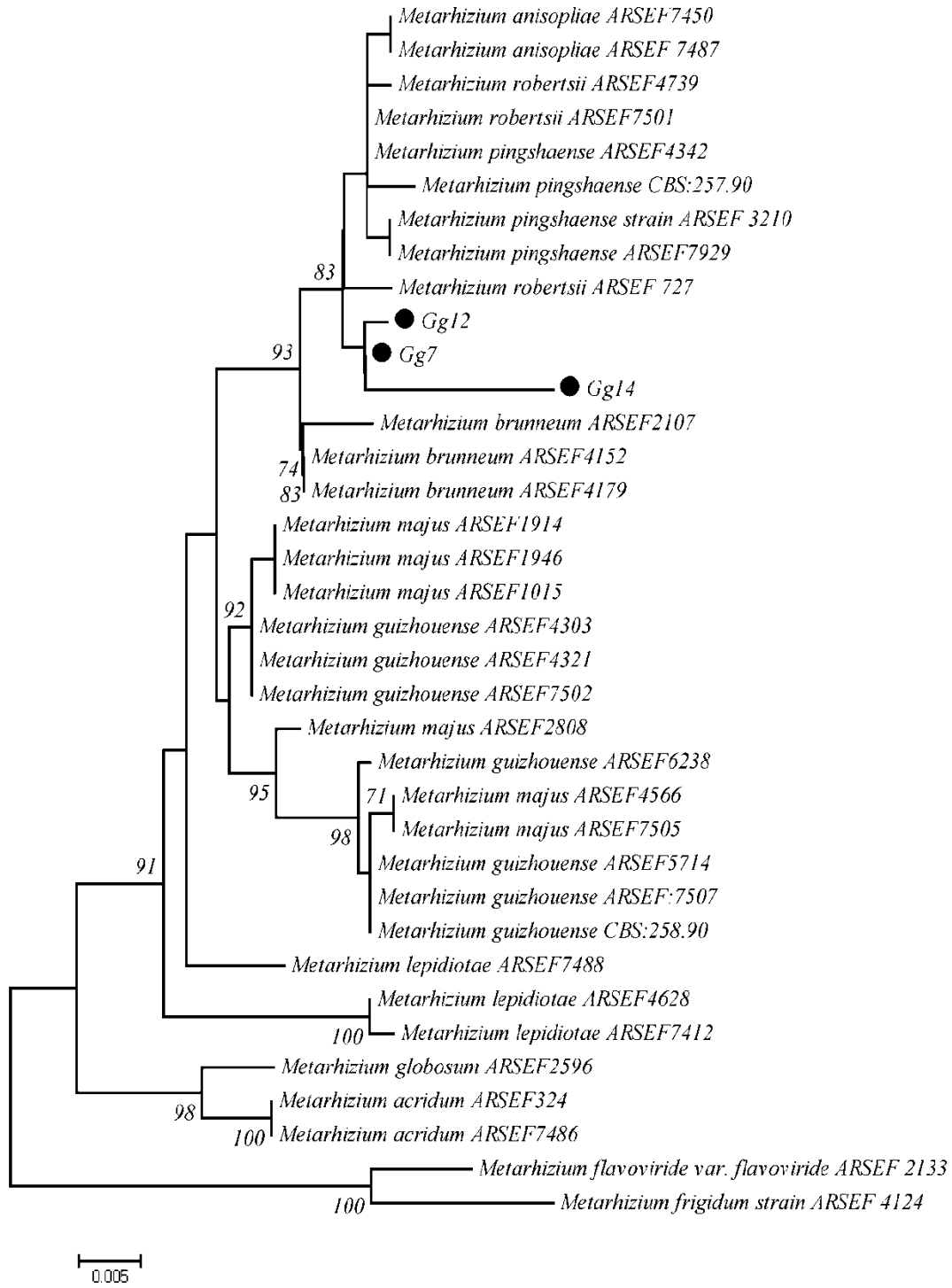
Şekil 21. Gg-7, Gg-12 ve Gg-14 izolatlarının Bischoff vd. (2009)'lerinin çalışmasında kullanılan *Metarhizium* türleri ile *EFl-α* dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı. Seç-bağla (bootstrap) değerlerinin %70 ve yukarısı olanlar belirtildi.



Şekil 22. Gg-7, Gg-12 ve Gg-14 izolatlarının Bischoff vd. (2009)'lerinin çalışmasında kullanılan *Metarhizium* türleri ile *RPBI* dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı. Seç-bağla (bootstrap) değerlerinin %70 ve yukarısı olanlar belirtildi.



Şekil 23. Gg-7, Gg-12 ve Gg-14 izolatlarının Bischoff vd. (2009)'lerinin çalışmasında kullanılan *Metarhizium* türleri ile *RPB2a* dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı. Seç-bağla (bootstrap) değerlerinin %70 ve yukarısı olanlar belirtildi.

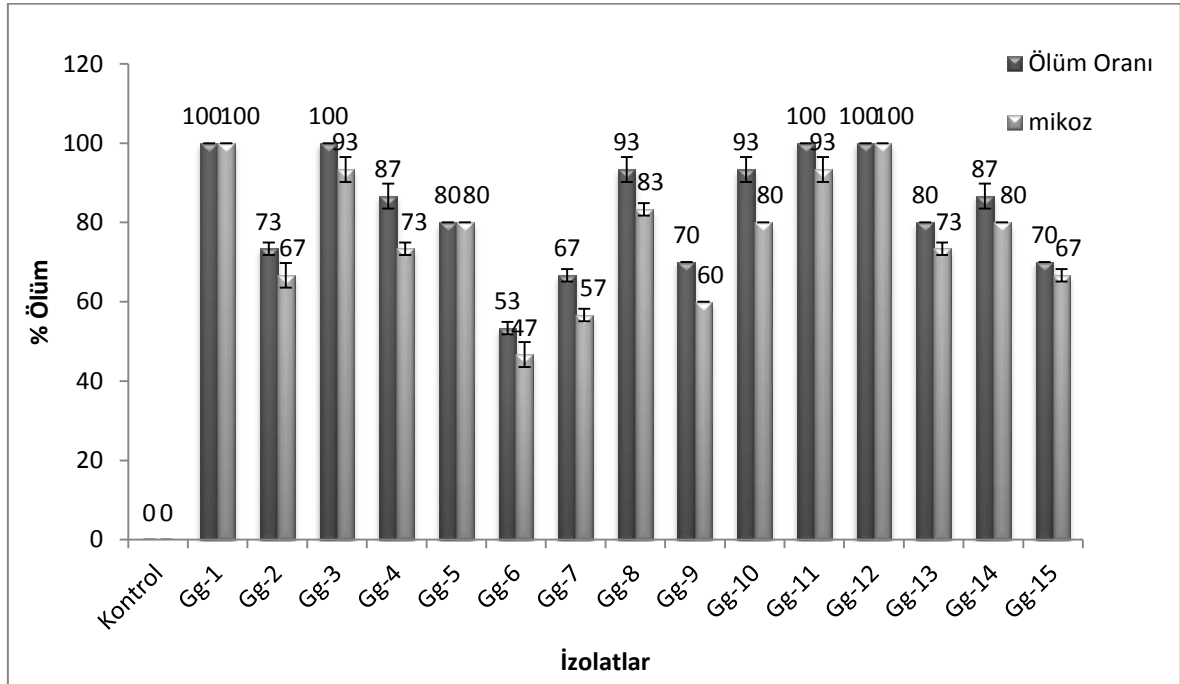


Şekil 24. Gg-7, Gg-12 ve Gg-14 izolatlarının Bischoff vd. (2009)'lerinin çalışmasında kullanılan *Metarhizium* türleri ile *RPB2b* dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı. Seç-bağla (bootstrap) değerlerinin %70 ve yukarısı olanlar belirtildi.

3.4. Patojenite Testleri

3.4.1. İzolatların *Galleria mellonella* Üzerindeki Entomopatojenite Testleri

Yüksek patojeniteye sahip fungal izolatların seçimi ve fungal izolatlar arasındaki virulans farklarını belirlemek amacı ile bütün izolatlar *G. mellonella*'ya karşı test edildi. *G. mellonella* üzerindeki patojenite değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, bütün izolatların kontrol grubundan farklı ölüm değerlerine sahip oldukları belirlendi ($p < 0,05$). Birbirleriyle karşılaştırıldıklarında ise 15 günlük test sürelerinde izolatların *G. mellonella* üzerinde istatistiksel olarak farklı ölüm oranlarına neden oldukları tespit edildi ($F=33,570$, $df=15$, $p < 0,05$). Testler sonucunda izole edilen 4 cinse ait birer izolatın *G. mellonella* üzerine %100'lük ölüm etkisine sahip olduğu belirlendi. Bu izolatlar *B. bassiana* (Gg-1), *Clonostachys* sp. (Gg-3), *M. keratinophilum* (Gg-11) ve *M. anisopliae* (Gg-12)'dir ($p < 0,05$).



Şekil 25. İzolatların *G. mellonella* larvalarına karşı patojeniteleri ve kadavralar üzerindeki sporlaşma oranları. Ölüm değerleri Abbott formülü (Abbott, 1925) kullanılarak hesaplandı. Sutunların üzerindeki sayılar patojenite değerlerini, barlar ise standart sapmayı göstermektedir.

Ölü böcekler üzerindeki büyüme ve sporlaşma oranlarının karşılaştırılmasında da bütün izolatların kontrol grubundan farklı olduğu ($p<0,05$) ve aralarında değişik mikozlanma seviyeleri gösterdikleri tespit edildi ($F=16,170$, $df=14$, $p<0,05$). *G. mellonella* üzerinde %100 ölüm etkisi gösteren *B. bassiana* (Gg-1) ve *M. anisopliae* (Gg-12)'de gözlemlendi (Şekil 25, 26).



Şekil 26. *Meterheziium anisopliae* ile enfekte olmuş *Galleria mellonella* larvası

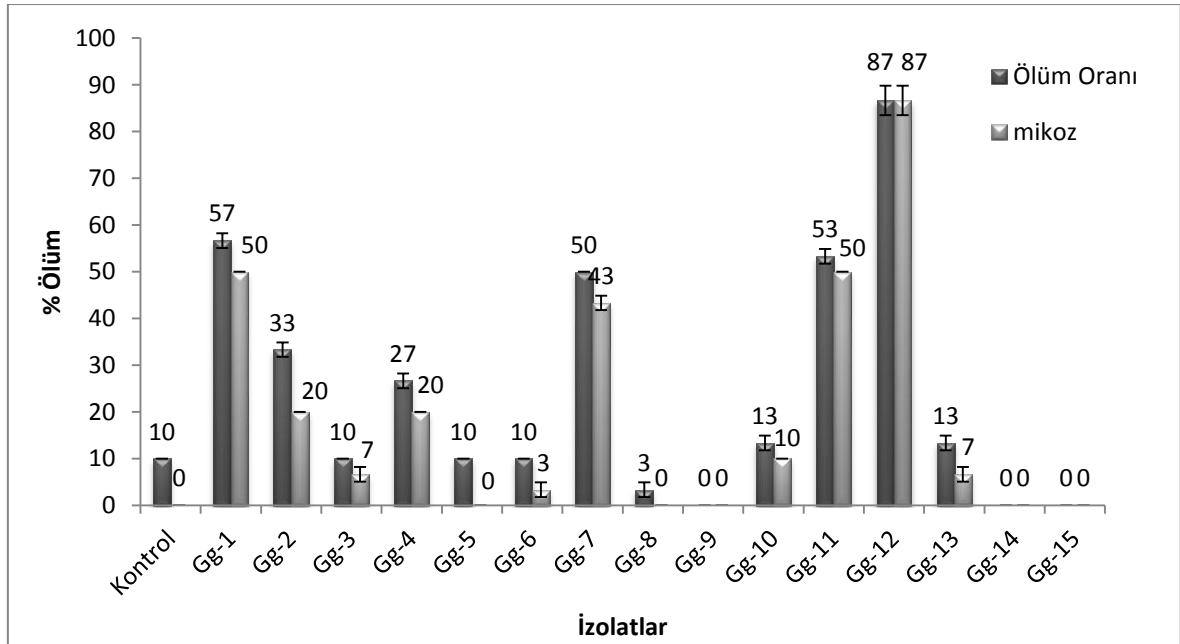


Şekil 27. *Beauveria bassiana* ile enfekte olmuş *Galleria mellonella* larvası

Zararlıdan en fazla izole edilen *Clonostachys* sp. (Gg-2, Gg-3, Gg-4, Gg-5, Gg-6, Gg-8, Gg-9, Gg-13 ve Gg-15) izolatları arasında *G. mellonella* üzerinde farklı ölüm oranları ve farklı mikozlanma oranları gösterdi ($p<0,05$). Bunların arasında %100 oranında ölüm etkisi gösteren *Clonostachys* sp. (Gg-3), %93.4 oranında da mikozlanma gösterdi. *M. anisopliae* olduğu belirlenen üç izolattan (Gg-7, Gg-12, Gg-14) *M. anisopliae* (Gg-12) %100 oranında en yüksek ölüm ortaya koydu (Şekil 24). Bu grup içinde yine *M. anisopliae* (Gg-12) en yüksek mikozlanma oranı gösterdi. *M. keratinophilum* Gg-10 ve *M. keratinophilum* Gg-11 izolatlarında ise Gg-11, Gg-10'a göre daha yüksek mikozlanma oranına sahipti. Kontrol grubu %0 ölüm oranı sergiledi (Şekil 24). *B. bassiana* Gg-1'in *G. mellonella* larvaları üzerinde 5.gün %100 ölüme neden olduğu tespit edildi. *Clonostachys* sp. Gg-3, *M. keratinophilum* Gg-11 ve *M. anisopliae* Gg-12 izolatları ise 10. gün sonunda larvalar üzerinde %100 ölüme sebep olmuştur.

3.4.2. *Gryllotalpa gryllotalpa* (Danaburnu)'ya Karşı İsektisidal Aktivite Testleri

G. gryllotalpa'ya karşı yapılan patojenite deneyleri sadece nimfler üzerinde gerçekleştirildi. Nimfler üzerine uygulanan izolatların patojenite değerleri kontrol grubundan farklı bulundu ($F=55,275$, $df=15$, $p<0,05$). *M. anisopliae* (Gg-12)'nin 20 günlük deney süresinin sonunda %86,7'lik ölüm oranı ile en yüksek ölüm etkisine sahip olduğu belirlendi. İzolatın mikozlanma oranının ise ölüm oranına paralel olduğu bulundu (Şekil 27) *Clonostachys* sp. (Gg-13) ve *M. keratinophilum* (Gg-10) aynı oranda ölüm değerleri göstermelerine karşın farklı oranda mikozlanmaya sebep oldu (Şekil 26). *Clonostachys* sp. (Gg-3, Gg-5, Gg-6) izolatları yine aynı oranda ölüm etkisi göstermesine karşın farklı oranlarda mikozlanma gösterdi ($F=118,658$, $df=15$, $p<0,05$). *Clonostachys* sp. (Gg-9, ve Gg-15) ile *M. anisopliae* (Gg-14) izolatlarının *G. gryllotalpa* nimflerine karşı virulent olmadıkları tespit edildi (Şekil 27).



Şekil 28. İzolatların *G. mellonella* larvalarına karşı patojeniteleri ve kadavralar üzerindeki sporlaşma oranları. Ölüm değerleri Abbott formülü (Abbott, 1925) kullanılarak hesaplandı. Sutunların üzerindeki sayılar patojenite değerlerini, barlar ise standart sapmayı göstermektedir.

4. TARTIŞMA

Dünya nüfusunun sürekli artması, insanların tarım ürünlerine talebini de aynı oranda artırmaktadır. Artan talebin karşılanması için ürün kalitesinin toplumun ihtiyacı ölçüsünde yeterli miktarda artırılması gerekir. Üretimi artırabilmek için verimi direkt olarak yükselten gübreleme, sulama, ilaç kullanımı gibi verim artırıcı yenilikler ve teknolojik çalışmalar yapılmaktadır. Bütün bunların nedeni ise nüfusun beslenme ihtiyacını ülke içerisinde sağlamaktır. Geçmiş yıllarda tarım üretiminde kendi ihtiyaçlarını karşılayan birkaç ülkeden biri olmasına rağmen ülkemiz, şu anda önemli bir tarım ithalatçısı durumundadır. Bunun temel sebeplerinden biri sanayi toplumuna geçişte tarım alanlarının azalması ve nüfus artışına paralel olarak sağlanan ürün ve birim alana düşen tarım miktarının arttırılamamasıdır. Birim alandaki ürün miktarını arttırma koşullarının başında, bitki ve ürünlerinin zararlı böceklerden korunması gelmektedir. Bu böceklerin zarar seviyelerini en alt düzeyde tutmak için yapılan çalışmalar zararlılarla mücadele yöntemleri olarak adlandırılmaktadır. Tarımda çeşitli zirai mücadele yöntemleri vardır. Tarımsal üretimde bitki koruma alanında kullanılan teknikler, insan ve çevre sağlığı açısından özel bir öneme sahiptir. Genel olarak bitki hastalık ve zararlılarıyla, zamanında ve doğru mücadele yapılmadığında, ürün kaybının %30-35 civarında olduğu kabul edilmektedir. Bu kaybı önlemek amacıyla en fazla kullanılan yöntem, kimyasal mücadeledir. Ancak, bilinçsizce pestisit uygulandığında, tarım ilaçları sadece zararlıları değil, bunları baskı altında tutan faydalı böcekleri de doğrudan ve dolaylı olarak etkilemektedir. Böylece, doğal denge bozulmakta, tür çeşitliliği azalmakta, daha önceden problem olmayan potansiyel zararlılar sorun olmaya ve bu zararlılara karşı ek ilaçlama yapma zorunluluğu ortaya çıkmaktadır.

Toprak altında yaşayan *Gryllotalpa gryllotalpa* (Danaburnu, Orthoptera: Gryllotalpidae) gerek dünya gerekse ülkemiz açısından ciddi ürün kayıpları ve ekonomik zararlara sebep olan tarım zararlıları arasındadır. Günümüze kadar kültürel, kimyasal ve biyolojik mücadele yöntemlerine ait çeşitli uygulamalarla zararlılarla mücadele edilmeye çalışılmıştır. Dünyada böceklerden izole edilen virüs, bakteri, fungus, nematod ve protozoonları kapsayan çeşitli preparatlar zararlıların mikrobiyal mücadelesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Boucias ve Pendland, 1998; Demirbağ vd., 2008). *G. gryllotalpa* ile mücadelede bakteri ve virüslerden farklı olarak, funguslar konaklarını yalnızca

bağırsaktan değil, aynı zamanda böceklerin solunum deliklerinden ve integumentin yüzeyinden de enfekte edebilir. Bu özellik entomopatojenik fungusları böceklerin beslenme aktivitelerinden bağımsız olarak doğrudan enfekte edebileceği gerçeğini doğrulamaktadır (Ferron, 1978).

Doğu Karadeniz Bölgesi'nin iklimsel koşulları dikkate alındığında, bu zararlılarla mücadelede en etkili mikrobiyal yöntemin entomopatojenik funguslar olduğu düşünülmüştür. Mücadelede kimyasal insektisidlerin kullanımını azaltacak, daha etkin, güvenli, ekonomik ve çevreye duyarlı etkili bir fungal mikrobiyal mücadele etmeni tespit etmek amacıyla tez çalışmasına başlanmıştır. Bu kapsamda Trabzon İli'nin farklı tarım alanlarından *G. gryllotalpa* (Danaburnu)'ya karşı etkili bir mikrobiyal mücadele etmeni bulabilmek için yaklaşık 100 adet nimf ve ergin böcek toplandı. Toplanan böcekler ölü ve sağlıklı olmak üzere ayrılarak doğal ölüm gözlemlenen kadavralar üzerinden entomopatojenik fungus izolasyonu yapıldı. Elde edilen fungal izolatların saflaştırma işleminden sonra öncelikle morfolojik karakterizasyonları yapıldı. Ardından moleküler karakterizasyonları yapılan izolatların tür tayinleri tamamlanarak, mikrobiyal mücadelede kullanılma potansiyelleri araştırıldı. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda 4 farklı fungal cinse ait toplam 15 adet fungus elde edildi. Bu güne kadar *G. gryllotalpa*'dan entomopatojen fungus izolasyonu yapıldığına dair bir kayda ulaşılamamakla beraber, yapılan bu çalışma ile danaburnundan ilk kez izole edilen izolatlardan 1 tanesinin *Beauveria bassiana* (ARSEF 11688), 9 tanesinin *Clonostachys* sp. (ARSEF 11689, ARSEF 11690, ARSEF 11691, ARSEF 11693, ARSEF 11695, ARSEF 11700, ARSEF 11701, ARSEF 11702), 3 tanesinin *Metarhizium anisopliae* (ARSEF 11694) ve 2 tanesinin *Myriodontium keratinophilum* (ARSEF 11697, ARSEF 11698) olduğu belirlendi. Bu izolatlar bu çalışma ile *G. gryllotalpa*'dan ilk kez izole edilmiştir.

Yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda elde edilen izolatlardan biri *Beauveria bassiana* (Gg-1)'dir. *B. bassiana* iyi bilinen bir böcek patojeni olup, doğada geniş yayılım gösterir ve birçok böcek türünde hastalık ve ölümler gerçekleştirir (Lacey vd., 2001; Goettel vd., 2005; Zimmermann, 2007). Orta hızda yüzeyi tozsu olan pamuksu görümlü koloniler oluşturur. Koloni başlangıçta beyaz, sonraları pembe-ten rengi bir renk alır. Mikroskopik incelemede tabanı şişkin konidyojenöz hücrelerin simpodiyal bir uzama ile zikzak oluşturmaları karakteristiktir (Şekil 7). Çok sayıda, ufak, globoz mikrokonidyumlar konidyoforlar çevresinde kümeler oluşturabilir (Gürcan vd., 2006, Tucker vd., 2004,

Koneman vd., 1992). *B. bassiana* beyazsinek, ekinbiti ve yaprakbiti gibi çok sayıda zararlı böceğe karşı arazide ve laboratuarda kontrol ajanı olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında *B. bassiana* hedef olmayan organizmalara da zarar vermemektedir (Sáenz-de-Cabezón Irigaray et al. 2003). *B. bassiana* böceklerde “beyaz muskadin” olarak bilinen bir hastalığa sebep olmaktadır. Bu fungusun sporları böceklerin üst deri tabakası ile temasa geçtiği zaman çimlenirler ve doğrudan üst derisinden konakçılarının vücutlarının içine doğru büyürler. Fungus toksin üreterek ve böceğin gıdalarını kurutarak vücudunda hızla çoğalır. Fungus; konakçısını öldürdüğü zaman, böceğin dış iskeletinin arasından böceği beyaz bir küf tabakası ile kaplayarak dışarıya doğru büyür. Bu ince tüylü küf çevreye salıverilen milyonlarca yeni infektif sporlar üretir. *B. bassiana* günümüzde böceklere karşı konidiyal spreyler olarak uygulanmaktadır. Papparatti ve Speranza (2005) yaptıkları bir çalışmada ticari olarak satılan *B. bassiana* preparatını biyolojik mücadele etmeni olarak alan uygulamasıyla *Curculio nucum* (findık kurdu)’a karşı test ettiler. Yapılan bu çalışmada fungus ile muamele edilen kafeslerde larva ölümünde %35 oranında artış gözlemlendi. *B. bassiana* aynı zamanda benzer hayat döngüsüne sahip bir başka önemli zararlı olan *Curculio elephas* (Kestane kurdu) üzerinde de aynı oranda ölüme neden olmuştur (Papparatti ve Speranza, 1999). *B. bassiana* ile başarıyla yapılmış sayısız biyolojik kontrol deneyleri bulunmaktadır (Eken et al., 2006). Bu türün 200 den fazla böcek türünü enfekte edebildiği bilinmektedir. Ayrıca kışı atlatabilen toprak böceklerine karşı en yaygın ve en etkili fungus olduğu belirtilmiştir (Hicks vd., 2001). Bu bilgiler doğrultusunda bu zararlıların yaşam döngüsünde toprak fazının önemli bir yeri olduğunu göstermektedir.

G. grylotalpa’dan izole edilen diğer bir izolat ise *Clonostachys* sp.’dir. *Clonostachys* sp. beyaz pamuğumsu bir morfolojiye sahip olup, sıcak ve tropikal bölgelerde yaşayıp, ormanlık alanlarda, sürülebilir arazilerde ve fundalıklarda, alkali toprakları tercih eden bir fungus türüdür (Schroers, 2001; Sutton vd., 1997). Önceleri mikoparazitik olduğu bilinen bu fungusun, Toledo vd. (2005) tarafından yapılan bir çalışma ile entomopatojen olduğu rapor edildi.

Yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda elde edilen Gg-7, Gg-12, Gg-14 kodlu izolatların koloni morfolojileri, spor şekilleri, konidiafor yapıları ve koloni renkleri incelendi. Mikroskop incelemelerinin ardından koloni renginin yeşilimsi, spor şekillerinin eliptik, konidiyaforlar yoğun paketler halinde, tekil olarak genişçe dallanmış, yoğun bir şekilde birbirine geçmiş, konidiya aseptat, silindirik ya da ovoid, konidiyaların oluşturduğu

zincirler, silindirik ya da prizmatik diziler halinde gözlemlendi (Hasenekoğlu, 1991; Humber, 1998). Morfolojik ve moleküler karakterizasyon çalışmalarının ardından izolatların *M. anisopliae* olduğuna karar verildi. *M. anisopliae* entomopatojen fungusunun saf kültürleri veya onların ölü arthropod konakçıları üzerindeki sporları genellikle yeşilimsidir. Çoğunlukla topraktan ya da birçok böcek türüne zarar veren parazitlerden izole edilir. Tropik ve ılıman bölgeler boyunca bulunurlar. Bu cinse ait türler, çekirgeler dahil olmak üzere, Acridoidea familyasında bulunan çeşitli türlerin istilasını önlemek için biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılmaktadır (Lomer vd. 1997, Milner 1997, Milner ve Pereira 2000, Hunter vd. 2001, Lomer vd. 2001). Bundan başka hamam böceği ve sineklerin üzerinde de etkin bir şekilde kullanılan mikrobiyal kontrol ajanıdır (Yıldırım 2000).

Yine danaburnundan ilk defa izole edilen *Myriodontium keratinophilum* 1973'ten bu yana dünyanın herhangi bir yerinde rastlanmamış (Richard Humber, kişisel iletişim) ve entomopatojenitesi hakkında herhangi bir bilgiye sahip olunmayan bir fungus türüdür. Beyaz-krem rengi, pamuğumsu bir morfolojiye sahip olup, sporlanma miktarı yüksek bir fungustur. Enfekte ettiği böcekte *Beauveria* enfeksiyonunda olduğu gibi beyaz, kremrengi mikozlanma görülür. Yapılan mikroskopi çalışmaları sonucunda sporların bir konidiafor yapısından değil, direk misellerden meydana geldiği tespit edildi. Uzun yıllardır yeryüzünde rastlanmayan bu izolat hakkında yeterli literatür bilgisi bulunmamakla beraber, bu tez çalışmasında, zararlılar üzerinde entomopatojenik etki gösterdiği ilk kez kayıt altına alındı. Bu tür şimdiye kadar, Türkiye'de ne toprak örneklerinden ne de herhangi bir böcek örneğinden izole edilmemiştir ve bu tez çalışmasıyla *G. gryllotalpa*'dan ilk kez izole edilip, Türkiye için yeni kayıt olarak literatüre geçmiştir.

G. gryllotalpa'dan ilk kez izole edilen fungusların, entomopatojenitesini test etmek için öncelikle izolatların laboratuvar kültürü olan *Galleria mellonella* üzerindeki insektisidal aktivite deneyleri yapılmıştır. Daha sonra yüksek virulansa sahip olanlar, kendi konukçusu üzerinde test edilmiş ve biyolojik mücadele etmeni olarak kullanım potansiyelleri araştırılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda aşağıdaki verilere ulaşılmıştır.

Farklı bölgelerden elde edilen izolatların değişik konaklardaki etkilerinin farklı olabileceği bilinmektedir. Ayrıca, fungusun uygulanacağı konsantrasyonun doğru saptanması mücadele etmeni olarak başarısını etkileyen önemli bir faktördür. Birçok çalışmada uygulanacak alandan elde edilen entomopatojen fungusun, o alanda dışarıdan ithal edilene göre daha başarılı olacağı belirtilmiştir (Beron ve Diaz, 2005). Bu nedenle bu

konudaki birçok araştırmada deney materyali olarak tercih edilen model organizmalardan biri olan *Galleria mellonella* larvaları kullanılarak, *G. gryllotalpa*'dan ilk kez izole edilen *Beauveria bassiana*, *Clonostachys* sp., *Metarhizium anisopliae* ve *Myriodontium keratinophilum*'un farklı suş ve konsantrasyonlarının etkilerini araştırmak amacıyla bu larvalar insektisidal aktivite testlerinde ilk basamak olarak belirlenmiştir. *Galleria* deneylerinde, larvanın enfekte olmasının ardından ölüm nedeninden fungusun sorumlu tutulabilmesi için larva öldükten sonra 1-2 gün içinde larvanın içinin hifal yapılarla dolması sonucunda sert bir yapı kazanması ve kötü koku oluşturmaması özellikleri beklenmiştir. Bu belirtilerin gözlemlendiği larvaların ölüm nedenlerinin entomopatojen fungus olduğu belirtilmiştir (Şekil 26,27). Ayrıca, biyolojik mücadele çalışmalarında hedef organizma ile aynı orjinli etmen aramak yaygın olmakla birlikte, hedef zararlının doğal alanından gelmemiş doğal düşmanlarla da başarılı kontroller elde edilmiştir (Hicks vd., 2001).

Yapılan bu tez çalışmasında, *G. gryllotalpa*'dan ilk kez izole edilen *B. bassiana* (Gg-1)'nin virulansını test etmek için *G. mellonella* üzerinde insektisidal aktivite testleri yapılmıştır. Gupta vd. (1994) *Beauveria bassiana* suşunu *Galleria* larvalarını 6×10^7 spor/ml konsantrasyonda enfeksiyona maruz bırakmışlar ve 12 günlük deney süresinin ardından *Galleria* larval ölümde logaritmik bir artış gözlemişlerdir. Lozano vd. (2008) *Galleria* larvalarını *Beauveria bassiana*'nın BbZ3 ve BbZ4 suşları ile enfekte etmiş ve 11-12 gün sonrasında %100 oranında ölüm elde etmişlerdir. El-Sinary vd. (2007) yaptıkları çalışmada 4. instar *Galleria* larvalarını 10^4 ve 10^8 spor/ml yoğunluğunda hazırlanmış spor süspansiyonuna daldırıp ardından 50, 100 ve 150 Gy gamma ışınına maruz bırakmışlar. Gamma ışınına maruz kalan larvalarda ölüm oranının ışın miktarındaki artışla paralel olduğunu bildirmişlerdir. Alia Zayed (2003) yaptığı bir çalışmada iki farklı *Beauveria* suşunun (Bb1 ve Bb2) virulanslarını test etmek için son instar *Galleria* larvalarını 2.5×10^6 spor/ml yoğunluğundaki süspansiyona daldırmış ve 8. gün sonunda *Galleria* larvalarının Bb2 suşuna %100 ölüm oranıyla daha duyarlı olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada *G. gryllotalpa*'dan ilk kez izole edilen *Beauveria bassiana* (Gg-1) izolatının *Galleria* larvaları üzerinde 10 günlük deney süresinin ardından %100 oranında ölüm etkisi göstermesi (Şekil 24) adı geçen araştırmacıların çalışmaları ile paralellik göstermektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda *Beauveria bassiana* (Gg-1) izolatu lepidoptera grubuna ait zararlılar üzerinde iyi bir mücadele etmeni olması bakımından umut vaat etmektedir.

Klingen vd. (2002), yaptıkları bir çalışmada *M. anisopliae* suşunun (ARSEF 5520) *G.mellonella*'ya karşı oldukça patojen olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada araştırmacılar ARSEF 5520'nin *G. mellonella*'ya karşı oldukça patojen olmasına rağmen, tuzak yönteminde *Delia floralis* kullanılarak izole edildiğinde *Delia floralis* larvalarına patojen olmadığını gözlemlemişlerdir. Yapılan bu tez çalışmasında ise *G. gryllotalpa*'dan ilk kez izole edilen *M. anisopliae* (Gg-12)'nin *G. mellonella* üzerinde, 10. gün sonunda %100 ölüm etkisi göstermesi Klingen vd.'nin sonuçları ile uyum sağlamaktadır. Bu sonuç Doğu Karadeniz Bölgesi'nden izole edilen bu entomopatojenik fungusun bölgedeki birçok tarım zararlısına karşı iyi bir biyolojik mücadele etmeni adayı olabileceğini göstermiştir.

Danaburnundan izole edilen diğer izolat ise *M. keratinophilum* (Gg-11)'dur. Bu izolatin *Galleria* larvaları üzerinde 10. gün sonunda %100 oranında ölüm etkisi göstermesi *Beauveria bassiana* (Gg-1) ile benzerlik göstermektedir. *G. gryllotalpa*'dan ilk kez izole edilen bu türün enfeksiyon şekli de *Beauveria* türleri ile benzerdir. Enfeksiyon şekli ve virulansındaki bu yakınlık izolatin *Beauveria* türleri gibi ticari preparat haline getirilmesi çalışmalarını beraberinde getirmektedir. Yapılan literatür araştırmasında dünyada *M. keratinophilum*'un entomopatojenitesi ile ilgili bu güne kadar herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Daha önceki çalışmalarda entomopatojen olduğu bilinen *Clonostachys* sp. türünün *G. mellonella* üzerindeki entomopatojenitesi ilk kez bu çalışma ile tespit edildi ve *G.gryllotalpa*'dan izole edilen *Clonostachys* sp. (Gg-3) *G. mellonella* üzerinde %100 ölüm etkisi gösterdi (Şekil 24). Kadavralar üzerinde, gerekli nem ve sıcaklık koşullarında ise ölü sayısına paralel olarak %100 oranında misellenme görüldü (Şekil 24). *Clonostachys* sp. (Gg-8) *G. mellonella* larvaları üzerinde %93, *Clonostachys* sp. (Gg-4) %86, *Clonostachys* sp. (Gg-14) %86 ölüm oranı göstermesi bu türe ait suşların *G. mellonella* larvaları üzerinde virulansın türden türe, hatta suştan suşa dahi değiştiğini göstermektedir. Virulansın suştan suşa değişmesi ise mikrobiyal mücadele çalışmalarında kullanılabilmeleri açısından belirtilen izolatlara ümit verici hale getirmektedir. Bu türün entomopatojenitesi ile ilgili bu güne kadar literatürde tek bir kayda rastlanmıştır (Toledo vd., 2005). Arjantin'de yapılan bu çalışmada *Clonostachys* sp., *Oncometopia tucumana* ve *Sonesimia grosa*'dan izole edildi ve yine aynı zararlılar üzerindeki insektisidal aktivite düzeylerini incelendi. Deney sonucunda %82.5'e varan ölüm oranlarına ulaşılmasına rağmen, bu ölümün yaklaşık %12.5'inin fungal enfeksiyon sonucu olduğu belirtilmiştir. Yapılan bu tez çalışmasında ise

ölüm oranıyla paralel yüksek oranda mikozlanma elde edilmesi, araştırmacıların çalışmasından farklı olarak izolatların daha etkili olduklarını ortaya koymaktadır. Ayrıca, bu çalışma ile *Clonostachys* sp. suşu tür seviyesinde tanımlanamamıştır. Morfolojik karakterizasyon sonucuna göre bu izolat *Clonostachys rosea* olarak tanımlanmasına rağmen, moleküler veriler bu izolatın tanımlanmamış yeni bir *Clonostachys* türü olabileceğini göstermektedir.

Bu güne kadar *G. grylotalpa* ile mücadelede klasik mücadele yöntemleri öncelikli olarak kullanılmış, zararlının yaşadığı alanda ekonomik zararlı durumuna geldiğinde doğal düşmanları isteğe bağlı olarak alana salınmıştır (Thompson, 2003). Bundan başka zararlının doğal düşmanlarının sayısının artırılması yöntemi de denenmiştir. Grylotalpidae familyası parazitoidlerinden *Larra* spp.(Hymenoptera) *G. grylotalpa*'da paralizasyonun sebep olarak böceğin ölümüne neden olmaktadır (Frank vd., 1995). Bundan başka *Ormia depleta* (Diptera) *G. grylotalpa* ile mücadelede kullanılan bir başka parazitoit türüdür (Frank, 1994). Uruguay'da *G. grylotalpa* ile mücadelede zararlının doğal düşmanları araştırılırken, yapılan arazi çalışmalarında %8 ile %50 oranında nematod enfeksiyonundan ölmüş danaburnu bulundu (Parkman ve Smart 1996). Bu doğal ölüm araştırmacılar için danaburnu ile yeni bir biyolojik mücadele yöntemi olarak düşünüldü (Parkman ve Smart 1996). Nyguyen ve Smart (1991) yaptıkları bir çalışmada *Steinernema scaterisci* ile enfekte edilen erginlerin %50 ile %94 arasında, nimflerin ise %20 oranında ölümle sonuçlandığını tespit ettiler. Enfeksiyon oranının nimflerde daha az olmasının sebebini ise nimflerde pronotumun daha kısa olmasından kaynaklandığını belirttiler (Hudson ve Nguyen 1989). Yapılan bu tez çalışmasında *G. mellonella* üzerine yapılan insektisidal aktivite testleri sonucunda entomopatojen olduğu belirlenen izolatların kendi konağı üzerinde, 1×10^7 spor/ml yoğunlukta hazırlanan spor süspansiyonu ile enfeksiyonu sonucunda 20 günlük deney sürecinin ardından *M. anisopliae* (Gg-14) %86.7 oranında ölüm etkisi göstermiştir (Şekil 27). Diğer izolatlardaki ölüm oranı ise %60'ın altındadır (Şekil 27). Daha önceleri danaburnu ile mücadelede fungus, biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılmaya çalışılmış ancak yürütülen çalışmalarda istenilen sonuç elde edilememiştir (Thompson, 2003). Cornell Üniversitesi'nde Villani vd. (1999) *G. grylotalpa* ile fungus enfeksiyonunun başarısız olma nedenlerini araştırmış ve zararlının fungus sporlarının bulaştırıldığı tünellerden kaçındığını belirtmiştir. Bu sebeple fungus sporları böcek kutikulası ile temas edememekte ve böylece enfeksiyon

gerçekleşmemektedir (Villani vd., 2002). Thompson vd. (2003) yaptıkları bir çalışmada 10^8 spor/ml'den daha az yoğunlukta hazırlanan spor süspansiyonları ile yapılan *G. gryllotalpa* enfeksiyonunun daha az oranla ölümle sonuçlandığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen bulgulara göre ölüm oranını artırabilmek için, hazırlanan spor süspansiyonunun Thompson vd.'nin yaptığı çalışmadaki gibi artırılması gerekmektedir. Biyolojik mücadele çalışmalarında entomopatojen fungusların biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılmalarında, kendi konağından izole edilen suşların daha başarılı olduğu belirtilmiştir (Hicks vd., 2001; Pliz vd., 2007; Bugeme vd., 2008). Ancak, bu çalışmada izolatların kendi konağı üzerinde virulansları oldukça düşüktür. Virulansın düşük olmasının sebeplerinden bazıları, uygulanan biyolojik mücadele etmeninden daha önce böcek vücuduna giriş yapmış herhangi bir patojen, kutikulanın penetrasyona karşı dirençli olması ya da konukçunun savunma sisteminin güçlü olmasıdır (St. Leger 1990). Mücadele etmenine karşı böcekte meydana gelen bu dirençlilik, kutikulanın elverişsiz yüzey koşullarına sahip olduğunda, kendisinden önce giriş yapan başka bir etmeden, kutikulanın başlıca gerekli maddelerden yoksunluğundan ya da penetrasyonun gerçekleşmesi için gereken kimyasal inhibitörlerin bulunmamasından kaynaklanmaktadır (St. Leger 1990). Fungus sporlarının kutikulaya penetrasyonunun gerçekleşmesi için ortamda başlıca etmenlerin bulunması gerekir. Bunlar su, çeşitli bileşenler ve kutikula yüzeyindeki tanıma proteinleridir (Willmer, 1986; Hunt vd., 1984; Pehrul vd., 1990). Farklı izolatların kutikulaya penetrasyonunu sağlamak ve virulansı arttırmak için bu tanıma proteinlerinin fungus sporlarında bulunması gerekmektedir (Thompson vd., 2003).

Sonuç olarak bu çalışmada, Trabzon İli'nin farklı tarım alanlarından toplanan böcek örneklerinden toplam 15 adet entomopatojenik fungus izole edildi ve izole edilen funguslar ayrıntılı bir şekilde karakterize edildi. Ayrıca, bu izolatların tarım alanlarında yayılış gösteren *G. gryllotalpa* ve laboratuvar kültürlerinden biri olan *G. mellonella*'ya karşı etkinlikleri belirlendi. Bunun sonucunda, *Clonostachys* sp. türünün bu bölgedeki tarım alanlarında yaygın olarak bulunduğu, dolayısıyla bu izolatların bu bölgede yayılış gösteren bazı zararlı böceklerle karşı biyolojik mücadele stratejileri altında kullanılabileceği bu çalışmayla gösterildi. Buna dayanarak, *Clonostachys* sp. izolatlarının bu bölgedeki belirli iklim koşullarına adapte olduğu ve burada sunulan bilgilerin gelecek izolat seçim programlarında yararlı olabileceği tespit edildi. Ayrıca böcekten ilk defa izole edilen *M. keratinophilum* (Gg-11)'in *G. mellonella*'ya karşı iyi bir biyolojik mücadele etmeni

olabileceği belirlendi. Son olarak *M. anisopliae* (Gg-12)'nin tarım alanlarında önemli zararlara yol açan *G. gryllotalpa*'ya karşı iyi bir biyolojik kontrol ajanı adayı olduğunu gösterdi.

5. SONUÇLAR

“*Gryllotalpa gryllotalpa*’dan entomopatojen fungusların izolasyonu ve karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmada tarım alanlarında önemli ekonomik hasara sebep olan tarım zararlılarına karşı etkili bir fungal etmen tespit etmek amacıyla *Gryllotalpa gryllotalpa*’dan entomopatojenik fungus izolasyonu yapılarak, izolatların öncelikle model organizma olan *Galleria mellonella* üzerinde virulansları belirlendikten sonra, kendi konağı üzerindeki insektisidal aktiviteleri belirlendi. Yapılan çalışmada ulaşılan sonuçlar aşağıdaki gibidir.

1. Trabzon ilinin farklı tarım alanlarından toplanan 100 adet *G. gryllotalpa*’dan toplam 15 adet entomopatojenik fungus izolasyonu yapıldı.

2. *Gryllotalpa gryllotalpa*’dan ilk kez entomopatojenik fungus izolasyonu yapıldı.

3. İzole edilen fungusların morfolojik ve moleküler teknikler kullanılarak tür tayinleri yapıldı ve izolatların *Beauveria bassiana* (Gg-1), *Clonostachys* sp. (Gg-2, Gg-3, Gg-4, Gg-5, Gg-6, Gg-8, Gg-9, Gg-13, Gg-15), *Metarhizium anisopliae* (Gg-7, Gg-12, Gg-14) ve *Myriodontium keratinophilum* (Gg-10, Gg-11) oldukları belirlendi.

4. *Clonostachys* sp.’nin en fazla izole edilen ve yaygın olarak bulunan (% 60) izolat olduğu belirlendi.

5. *Clonostachys* sp. ve *M. keratinophilum* Türkiye’de ilk kez tespit edildi.

6. *M. keratinophilum* böcekten ilk kez izole edildi.

7. Moleküler karakterizasyon yöntemleri kullanılarak *Metarhizium* ve *Beauveria* cinslerine ait fungusların *ITS* gen bölgelerinden başka *EF1- α* , *RPB1*, *RPB2a*, *RPB2b*, β -*Tubulin* ve *Bloc* gen bölgeleri de tanımlanarak filogenetik analizleri yapıldı.

8. *M. keratinophilum*’un entomopatojenitesi bu çalışma ile ilk kez kayıt altına alındı.

9. İzolatların *G. mellonella* üzerinde insektisidal aktivite testleri yapılarak entomopatojeniteleri belirlendi.

10. *G. mellonella* üzerine yapılan insektisidal aktivite testleri sonucunda en yüksek öldürücü etkiye sahip fungusların *Beauveria bassiana* (Gg-1), *Clonostachys* sp. (Gg-3), *M. keratinophilum* (Gg-11) ve *M. anisopliae* (Gg-12), olduğu tespit edildi.

11. *G. mellonella*’ya karşı yüksek aktivite gösteren izolatların *G. gryllotalpa*’ya karşı insektisidal aktiviteleri belirlendi.

12. *M. anisopliae* (Gg-12)'nin *G. gryllotalpa* üzerinde %86.7 oranında ölüm etkisi gösterdiği belirlendi.

13. *Clonostachys* sp. izolatlarının yeni bir *Clonostachys* türü olabileceği düşünülmektedir fakat bu tez çalışmasında tür tayinine yönelik çalışmalar henüz sonuçlandırılmamıştır.

6. ÖNERİLER

Bu çalışmada *G. gryllotalpa*'dan ilk kez entomopatojenik fungus izolasyonu yapıldı ve 15 adet entomopatojenik fungus elde edildi. Bunların morfolojik ve moleküler karakterizasyonları yapıldı. İzolatların, *Galleria mellonella* üzerinde entomopatojeniteleri belirlendikten sonra başta kendi konukçusu olmak üzere *Agriotes lineatus* ve *Leptinotarsa decemlineata* üzerindeki insektisidal etkileri araştırıldı. Çalışmanın yaygın etkisini arttırmak için aşağıdaki hususlar dikkate alınmalıdır.

1. İzolatların öldürücü etkileri üzerine sıcaklık, UV ve toprak pH'ı gibi fiziksel faktörlerin etkileri araştırılabilir.

2. Bu çalışmada tür seviyesinde tanımlanamayan *Clonostachys* sp. izolatları bundan sonraki tanımlama çalışmalarında tür düzeyinde teşhis edilebilir.

3. Insektisidal aktivite çalışmaları sonucunda *G. gryllotalpa* üzerinde öldürücü etkisi gözlenen Gg-12 kodlu izolatın zararlı üzerindeki virulansını arttırıcı çalışmalar yapılabilir.

4. *G. gryllotalpa* üzerinde yüksek öldürücü etkiye sahip *M. anisopliae* (Gg-12)'nin zararlı üzerinde doz denemeleri yapılabilir.

5. Entomopatojenitesi ilk defa kayıt altına alınan *M. keratinophilum*'un moleküler çalışmalar başta olmak üzere, izolatın konukçusuyla aynı ortamı paylaşan farklı zararlılar üzerindeki insektisidal aktivite testlerinin yapılması gibi daha geniş kapsamlı çalışmaları başlatılabilir.

6. Yüksek insektisidal aktiviteye sahip izolatların alan uygulamaları yapılabilir.

7. Bu çalışmada elde edilen fungusların ticari olarak geliştirilmesine yönelik çalışmalar başlatılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Ali-Shtayeh, M., S., Abdel-Basit, M. ve Jamous, R., 2002. Distribution, Occurrence and Characterization of Entomopathogenic Fungi in Agricultural Soil in the Palestinian Area, Mycopathologia, 156, 235-244.
- Anonymous, 1982. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of plant pathogens to fungicides. FAO Plant Protection Bulletin, 30,2,51-54.
- Arif, B. ve Kurstak, E., 1991. Viruses of Invertebrates, Kurstak, E. (Ed.), Marcel Dekker, Inc., 179, New York, USA.
- Aydemir, M., 2008. Zirai Mücadele Teknik Talimatları, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, 2, 3.
- Bernard, R. G. ve Jack J. P., 2003. Molecular Biotechnology - Principles and Applications of Recombinant DNA, Baskı: 3, Amer Society for Microbiology, New York.
- Beron, C. M. ve Diaz, B.M., 2005. Pathogenicity of hyphomycetous fungi against *Cyclocephala signaticollis*, BioControl, 50, 143-150.
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A. ve Humber, R. A., 2009. A Multilocus Phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* Lineage, Mycologia, 101, 4, 512-530
- Boucias, D. G. ve Pendland, J. C., 1998. Principles of Insect Pathology. Kluvar Academic Publisher, London.
- Brandenburg, R. L., 1997. Managing mole crickets: developing a strategy for success. Turfgrass Trends. 6,1,1-8.
- Brandenburg, R. L. ve Villani, M. G., 1995. Handbook of Turfgrass Insect Pests. Entomological Society of America, Lanham, MD.
- Brandenburg, R. L., Xia, Y., ve Schoeman, A. S., 2002. Tunnel architectures of three species of mole crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae). Fla.Entomol. 85,2,383-385.
- Brooks, W. M., 1988. Entomogenous Protozoa, In "Handbook of Natural Pesticides", Vol. V: "Microbial Insecticides, Part A: Entomogenous Protozoa and Fungi" (Ignoffo, C. M. ve Mandava, E. D., Eds.), 1-149, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Brown, W. 1958. Insecticide Resistance in Arthropods. W.H.O., 240, Genève.
- Bugeme, D.M., Maniania, N.K., Knapp, M. ve Boga, H.I., 2008, Effect of temperature on virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to *Tetranychus evansi*, Exp. Appl. Acarol., 46, 275-285.

- Castrillo, L. A., Roberts. D. W. ve Vandenberg, J., D., 2005. The Fungal Past, Present, and Future: Germination, Ramification, and Reproduction, J. Invertebr. Pathol., 89, 46-56.
- Charnley, A. K., Cobb, B. ve Clarskson, J. M., 1997. Toward the Improvement of Fungal Insecticides, In "Microbial Insecticides: Novelty or Necessity?" (Evans, H. F., Chair), Proc. Br. Crop. Prot. Council Symp., 68, 115-126.
- Choi, J. W., Matsuda, M., Kawano, M., Mim, B. Y. ve Wakimoto, T., 2001 Accumulation profiles of persistent organochlorines in waterbiros from an Estuary in Korea. Arc. Environ-Contam. Toxicol. 41, 353-363.
- Clarkson, J., M. ve Chamley, A., K., 1996. New Insights into the Mechanisms of Fungal Pathogenesis in Insects, Trends Microbiol., 4, 5.
- David, A., Nickle, L., James Castner, 1984. Introduced Species of Mole Crickets in The United States Puerto Rico, and The Virgin Islands (Orthoptera: Gryllotalpidae), Ann.Entomol.Soc.77,450-465 s.
- DeBach, P., 1974. Biological Control by Naturel Enemies. Cambridge University Prass, Cambridge, UK
- Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C. ve Burçak, A., 2005. Türkiye'de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Organizmalarda Duyarlılık Azalışı Sorunları, Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongresi. Ankara
- Demir, İ., 2004. *Hyphantria cunea* nükleopolihedrovirus'ünün *Spodoptera frugiperda* ve *Lymantria dispar* Hücre Kültürlerinde Replikasyonunun Karşılaştırılması. Doktora Tezi. K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Demirbağ, Z. ve Beldüz, A. O., 1997. Baculovirüs'ün Biyolojik Mücadeledeki Önemi, Kükem Dergisi, 20, 1, 49-58.
- Demirbağ, Z., Nalçacıoğlu, R., Katı, H., Demir, İ., Sezen, K. ve Ertürk, Ö., 2008. Entomopatojenler ve Biyolojik Mücadele, Trabzon.
- Devi, P. S. V., 1994. Conidia Production of the Entomopathogenic Fungus *Nomuraea riley* and its Evaluation for Control of *Spodoptera litura* (Fab) on *Ricinus communis*, J. Invertebr. Pathol., 63, 145-150.
- Ecevit, O., 1988. Zirai Mücadele İlaçları ve Çevreye Olan Etkileri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları, 27, Samsun.
- Eken, C., Tozlu, G., Dane, E., Çoruh, S. ve Demirci, E., 2006, Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hypomycetes) to larvae of the small poplar longhorn beetle, *Saperda populnea* (Coleoptera:Cerambycidae), Mycopathologia, 162, 69-71.

- El-Sinary, N.H. ve Rizk, S.A., 2007. Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana* (Bals.) and Gamma Irradiation Efficiency Against the Greater Wax Moth *Galleria mellonella*(L), American-Eurasian Journal of Scientific Research, 2,1,13-18.
- Fan, Y., Fang, W., Guo, S., Pei, X., Zhang, Y., Xiao, Y., Li, D., Jin, K., idochka, MJ. ve Pei, Y., 2007. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. Appl. Environ. Microbiol. 73, 295-302
- Fargues, J. ve Maniania, N. K., 1992. Variabilité de la Sensibilité de *Spodoptera littoralis* (Lep.:Noctuidae) a L'hypomycete Entomopathogene *Nomuraea rileyi*, Entomophaga, 37, 545-554.
- Feng, M. G., Poprawski, T. J. ve Khachatourians, G. G., 1994. Production, Formulation and Application of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* for Insect Control: Current Status, Biocontr. Sci. Technol., 4, 3-34.
- Ferron P., 1978. Biological Control of Insects by Entomogenous Fungi, Annu. Rev. Entomol., 23, 409-42.
- Ferron, P., Fargues, J. ve Riba, G., 1991. Fungi as Microbial Insecticides Against Pests, In "Handbook of Applied Mycology" (Arora, D. K., Ajelio, L. ve Mukerji, K. G., Eds.), 2, 665-706. Dekker, New York.
- Forrest, T. G., 1986. Oviposition and maternal investment in mole crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae): effects of season, size, and senescence. Ann. Entomol. Soc. Am. 79,6, 918-924.
- Frank, J. H., 1994. Biological control of pest mole crickets, 343-352, *In* D. Rosen, F.D. Bennett, and J.L. Capinera (eds.), Pest management in the subtropics: biological control – a Florida perspective. Intercept Limited, Andover, UK.
- Frank, J. H., Parkman J. P. ve Bennett, F. D., 1995. *Larra bicolor* (Hymenoptera: Sphecidae), a biological control agent of *Scapteriscus* mole crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae), established in northern Florida. Fla. Entomol., 78,4,619-623.
- Faria, M. R. D. ve Wraight, S. P., 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological Control 43, 237-256.
- Furlong, M. J., Pell, J. K., Choo, O. P. ve Rahman, S. A., 1995. Field and Laboratory Evaluation of a Sex Pheromone Trap for the Autodissemination of the Fungal Entomopathogen *Zoophthora radicans* (Entomophtharales) by the Diamon-Back Moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae), Bull. Entomol. Res., 85, 331-337.
- Fuxa, J., R., 1987. Ecological Considerations for the Use of Entomopathogens in IPM, Annu. Rev. Entomol., 32, 225-51.
- Gaugler, R., 1997. Alternative Paradigms for Commercializing Biopesticides, Phytoparasitica, 25, 179-182.

- Georgis, R., 1997. Commercial Prospects of Microbial Insecticides in Agriculture, In "Microbial Insecticides: Novelty or Necessity?" (Evans, H. F., Chair), Proc. Br. Crop. Prot. Council Symp., 68, 243-252.
- Giray, H., 1977. Böceklerin İsektisitlere Karşı Dayanıklılığı, Türkiye Bitki Koruma Dergisi, 1,1,29-38.
- Glare, T. R., Milner, R. J. ve Beaton, D. C., 1996. Variation in *Metarhizium*, a Genus of Fungal Pathogens Attacking Orthoptera: Is phialide morphology a useful criterion? J Orthopt Res 5,19-27.
- Glazer, I. ve Lewis, E. E., 2000. Bioassays for Entomopathogenic Nematodes, In "Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes" (Navon, A. ve Ascher, K. R. S., Eds.), 229-247, CAB International Publishing.
- Goettel, M. S. ve Inglis, G. D., 1997. Fungi: Hyphomycetes. In: Manual of Techniques in Insect pathology, Lacey, L., A. (Ed.), Academic Press, Amsterdam, 213-249.
- Goettel, M. S. Johnson, D. L. ve Inglis, G. D., 1995. The Role of Fungi in the Biological Control of Grasshoppers, Can. J. Bot., 73, 1, 51-575.
- Goettel, M. S., Eilenberg, J. ve Glare, T., 2005. Entomopathogenic Fungi and Their Role in Regulation of Insect Populations. In: Comprehensive Molecular Insect Science, Gilbert, L., I., Iatrou, K. ve Gill, S., S. (Ed.), Amsterdam, 361-405.
- Granados, R. R. ve Federici, B. A., 1986. The Biology of Baculoviruses, Vol. 2, Practical Applications for Insect Control, Boca Raton, FL.
- Gupta, S.C., Leathers, T.D., El-Sayed, G. ve Ignoffo, C.M., 1994. Relationships Among Enzyme Activities and Virulence Parameters in *Beauveria bassiana* Infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*, Journal of Invertebrate Pathology, 64,13-17.
- Gürcan, S., Tuğrul, H. M., Yörük, Y., Özer, B., Tatman-Otkun, M. ve Otkun, M., 2006. First case report of empyema caused by *Beauveria bassiana*. Mycoses . 49,246-248.
- Hajek, A. E., 1997. Ecology of Terrestrial Fungal Entomopathogens, In "Advanced in Microbial Ecology" (Jones, J. H., Ed.), 15, 193-249, Plenum Press, New York.
- Hajek, A. E. ve Leger, R. J., 1994. Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts, Ann. Rev. Entomol., 39, 293-322.
- Hall, R. A. ve Papierok, B., 1982. Fungi as Biological Control Agents of Arthropods of Agricultural and Medical Importance, Parasitology, 84, 205-240.
- Hasenekoğlu, G., 1991, Toprak mikrofungusları, Atatürk Üniversitesi Yayınları, No:689, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Yayınları, II, II, 39-46.
- Hayslip, N. C., 1943. Notes on biological studies of mole crickets at Plant City, Florida. Fla. Entomol. 26,33-46.

- Hernandez, F., Morell, I., Beltran, J. ve Lopez, F. J., 1993. Multi-residue procedure for the analysis of pesticides in groundwater: Application to samples from the Comunidad Valenciana, Spain. *Chromatographia*, 37,516.
- Hertl, P.T., Brandenburg, R.L. ve Barbercheck, M.E., 2001. Effect of soil moisture on ovipositional behavior in the southern mole cricket (Orthoptera: Gryllotalpidae). *Env. Entomol.* 30,3,466-473.
- Hicks, Barry J., Watt, Allan D. ve Cosens, D., 2001, The potential of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) as a biological control agent against to pine beauty moth, *Panolis flammea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Forest Ecology and Management* 149, 275-281.
- Hoffman, M. P. ve Frodsham, A. C., 1993. Naturel Enemies of Vegetable Insect Pests, Cooperative Extension, 63, Cornell University, Ithaca.
- Hudson, W. G., 1988. Field sampling of mole crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae: *Scapteriscus*): a comparison of techniques. *Fla. Entomol.* 71,2, 214-216.
- Hudson, W.G. ve Nguyen, K.B., 1989. Infection of *Scapteriscus vicinus* (Orthoptera: Gryllotalpidae) nymphs by *Neoaplectana* sp. (Rhabditida: Steinernematidae). *Fla. Entomol.* 72,2, 383-384.
- Humber, R., A., 1997. Entomopathogenic Fungal Identification. In: Manual of Techniques in Insect Pathology, Lacey, L., A. (Ed.), San Diego, 153-185.
- Humber, R.A., 1998. Entomopathogenic Fungal Identification. APS/ESA Joint Annual Meeting. http://www.ppru.cornell.edu/mycology/Insect_mycology.html.
- Humber, R., A., 2008. Evaluation of Entomopathogenity in Fungi, *J. Invertebr. Pathol.*, 98, 262-266.
- Hunt, D.W.A., Borden, J.H., Rahe, J.E. ve Whitney, H.S., 1984. Nutrient mediated germination of *Beauveria bassiana* conidia on the integument of the bark beetle *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). *J. Invertebr. Path.*
- Hunter, D. M., Milner, R. J. ve Spurgin, P.A., 2001. Aerial treatment of the Australian plague locust, *Chortiocetes terminifera* (Orthoptera: Acrididae), with *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in Australia. *Bull Entomol Res* 91,93-99.
- Ihara, F., Yaginuma, K., Kobayashi, N., Mishiro, K. ve Sato, T., 2001. Screening of Entomopathogenic Fungi against the Brown-Winged Green Bug, *Plautia stali* Scott (Hemiptera: Pentatomidae), *Appl. Entomol. Zool.*, 36, 4, 495-500.
- Inglesfield, C., 1989. Pyrethroids and terrestrial non-target organisms. *Pesticid. Sci.* 27, 387-428.

- Kaya, H. K. ve Stock, S. P., 1997. Techniques in Insect Nematology, In “Manuel of Techniques in Insect Pathology” (Lacey, L. A., Ed.), 281-324, Academic Press, London.
- Khan, H. K., Jayaraj, S. ve Gopalan, M., 1993. Muscardine Fungi for the Biological Control of Agroforestry Termite *Odontotermes obesus* (Rambur), Insect Sci. Appl., 14, 529-535.
- Kleyla, P.C. ve Dodson, G., 1978. Calling behavior and spatial distribution of two species of mole crickets in the field. Ann. Entomol. Soc. Am. 71,4, 602-604.
- Klingen, I., Eilenberg, J. ve Meadow, R., 2002. Impact of Farming Systems, Field Margins and Bait Insect on the Findings of Insect Pathogenic Fungi in Soil, Agric. Ecosys. Environ., 91, 191-198.
- Klingen, I., Meadow, R., and Aandal, T., 2002, Mortality of *Delia floralis*, *Galleria mellonella* and *Mamestra brassicae* with insect pathogenic hyphomycetous fungi, J. Appl. Ent., 126, 231-237.
- Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P.C. ve Winn, W.C., 1992. *Mycology. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Company, 791-861.
- Ko Stumpf, N. ve Nauen, R., 2001. Cross-Resistance, Inheritance and Biochemistry of Mitochondrial Electron Transport Inhibitör-Acaricide Resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Journal Economy Entomology, 94,6,1577-1583. Kongresi. 3-7 Ocak 2005.
- Lacey, L. A., Fransen, J. J. ve Carruthers, R., 1996. Global Distribution of Naturally Occurring Fungi of *Bemisia*, Their Biologies and Use as Biological Control Agents, In “*Bemisia*, 1995: Taxonomy, Biology, Damage and Management” (Gerling, D. ve Mayer, R., Eds.), 9, 401-433, Intercept, Andover.
- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K. ve Vail, P., 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future?, Biol. Control, 21, 230-248.
- Lacey, L. A. ve Goettel, M. S., 1995. Current Developments in Microbial Control of Insect Pests And Prospects for The Early 21st Century, Entomophaga, 40, 3-27.
- Lampkin, N.H., 1994. Organic Farming: Sustainable Agriculture in Pactice, The Economics of Organic Farming: An International Perspective, Ed:N.H. Lampkin and S. Padel, Guilford. Farming Press Books, Wharfedale Road, Ipswich IP1 4 LG, UK.
- Latge, J.P. ve Papierok, B., 1988. Aphid pathogens. In: *Aphids, Their Biology, Natural Enemies and Control*. Vol. 2b. A.K. Minks and P. Harrewijn, (eds.). Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 323-335.
- Lipa, J. J., 1975. An Outline of Insect Pathology, Warsaw, Poland.

- Liu, J., Pionar, G. O. ve Berry, R. E., 2000. Control of Insect Pests with Entomopathogenic Nematodes: The Impact of Molecular Biology and Phylogenetic Reconstruction, Ann. Rev. Entomol., 45, 287-306.
- Lomer, C. J., Bateman, R. P., Johnson, D. L., Langewald, J. ve Thomas, M., 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. Ann Rev Entomol 46,667–702.
- Long, D.W., Groden, E. ve Drummond, F.A., 2000. Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill . Agricultural and Forest Entomology, 2,11-17.
- Lozano-Gutierrez, J. ve Espana-Luna, M.P., 2008. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina:Hyphomycetes) Against the White Grub *Lanifera cyclades* (Lepidoptera: Pyralidae) Under Field and Greenhouse Conditions, Florida Entomologist, 91,4.
- Maddox, J. V., 1987. Protozoan Diseases, In “Epizootiology of Insect Diseases” (Fuxa, J. R. ve Tanada, Y., Eds.), 417-452, Wiley, New York.
- Martinez, K. ve Barcelo, D., 2001. Determination of antifouling pesticides and their degradation products in marine sediments by means of ultrasonic extraction and HPLC-APLC-MS. Fresenius, J. Anal. Chem. 370, 940-945.
- McCoy, C. W., Samson, R. A. ve Boucias, D. G., 1988. Entomogenous Fungi, In “Handbook of Natural Pesticides, Vol 5: Microbial Insecticides, Part A: Entomogenous Protozoa and Fungi”, (Ignoffo, C. M. ve Mandava, N. B., Eds.), 151-236, CRC Press , Boca Raton, FL.
- Miller, R. J. ve Prior, C., 1994. Susceptibility of Australian Plague Locust, *Chortoicetes terminifera* and Wingless Grasshopper, *Phaulacridium vittatum*, to the Fungi *Metarhizium ssp.*, Biol. Control., 4, 132-137.
- Miller, R. J., 1997. Prospects for Biopesticides for Aphid Control, Entomophaga, 42, 227-239.
- Morse, A.P., 1920. Manual of The Orthoptera of New England, Including The Locusts, Grasshopper, Crickets, and Their Allies. Proc. Boston Soc.Nat.Hist, 35, 197-556 s.
- Nguyen, K. B. ve Smart, G.C., 1991a. Pathogenicity of *Steinernema scapterisci* to selected invertebrates. J. Nematol. 23,1, 7-11.
- Nguyen, K. B. ve Smart, G. C., 1991b. Mode of entry and sites of development of *Steinernema scapterisci* in mole crickets. J. Nematol. 23,2, 267-268.
- Nickerson, J.C., Snyder, D.E. ve Oliver, C.C., 1979. Acoustical burrows constructed by mole crickets. Ann. Entomol. Soc. Am. 72,3, 438-440.
- Oğurlu, İ., 2000. Biyolojik Mücadele, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın No: 8, Isparta.
- Otte, D. ve Alexander, R.D., 1983. The Australian Cricket (Orthoptera: Gryllidae) Monograph 22 of The Academy of Natural Sciences of Philadelphia.

- Paparatti, B. ve Speranza, S., 1999. Biological Control of Chestnut Weevil (*Curculio elephas* Gyll.; Coleoptera, Curculionidae) with the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. (Deuteromycotina, Hyphomycetes), Acta Horticulture, II. International symposium on chestnut, Bordeaux, 494, 459–464.
- Paparatti, B. ve Speranza, S., 2005. Biological Control of Hazelnut Weevil (*Curculio nucum* L., Coleoptera, Curculionidae) Using the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. (Deuteromycotina, Hyphomycetes). Acta Horticulture, VIth International symposium on hazelnut, Tarragona-Reus, 686, 407–412.
- Parker, W. E. ve Howard, J. J., 2001, The biology and management of wireworms (*Agriotes* spp.) on potato with particular reference to the U.K., Agricultural and Forest Entomology, 3, 85-98.
- Parkman, J.P. ve Smart, Jr. G.C., 1996. Entomopathogenic nematodes, a case study: introduction of *Steinernema scapterisci* in Florida, Biocon. Sci. Tech, 6, 413-419.
- Pekrul, S. ve Grula, E.A., 1979. Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. J. Invertebr. Path. 34, 238-247.
- Peter, G., 1984. Plant Pests and Their Control, Fenemore, London.
- Peters, A., 1996. The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations. Biocon. Sci. Tech. 6, 389-402.
- Pliz, C., Wegensteiner, R., ve Keller, S., 2007, Selection of entomopathogenic fungi for the control of the western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera*, J. Appl. Entomol., 131,6, 426-431.
- Poinar, G. O., 1978. Identification of the Groups of Insect Pathogens, Plenum Press, New York.
- Poinar, G. O., 1979. Nematodes for Biological Control of Insects, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Racke, K. D., 2000. Pesticides for turfgrass pest management: uses and environmental issues, pp. 45-64. In J.M. Clark and M.P. Kenna (eds.), Fate and Management of Turfgrass Chemicals. American Chemical Society, Washington, DC.
- Rehner, S. A. ve Buckley, E., 2005. A *Beauveria* Phylogeny Inferred from Nuclear ITS and EF1- α Sequences: Evidence for Cryptic Diversification and Links to *Cordyceps* Teleomorphs, Mycologia, 97, 84-98.
- Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G. H., Luangsa-ard, J.J., Devotto, L. ve Humber, R.A., 2011. Phylogeny and Systematics of the Anamorphic, Entomopathogenic Genus *Beauveria*, Mycologia, 103,5, 1055-1073.

- Roy, H. E., Steinkraus, D. C., Eilenberg, J., Hajek, A. E. ve Pell, J. K., 2006. Bizarre Interactions and Endgames: Entomopathogenic Fungi and Their Arthropod Hosts, Annu. Rev. Entomol., 51, 331-57.
- Saenz-De-Cabezón Irigaray, F.J., Marco-Mancebon, V. ve Perez-Moreno, I., 2003. The Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* and its Compatibility With Triflumuron: Effects on the Twospotted Spider Mite *Tetranychus urticae*, Biological Control, 26, 168–173.
- Schroers, H. J., 2001. A monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. Studies in Mycology 46. CBS Utrecht, 1–214.
- Sevim, A., Demir, I., Tanyeli, E. ve Demirbag, Z., 2010. Screening of Entomopathogenic Fungi against the European Spruce Bark Beetle, *Dendroctonus micans* (Coleoptera: Scolytidae), Biocont. Sci. Technol., 20, 3-11.
- Sevim, A., 2010. Doğu Karadeniz Bölgesi'nden Entomopatojenik Fungusların İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Virulanslarının Belirlenmesi, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Shah, P. A. ve Pell, J. K., 2003. Entomopathogenic Fungi as Biological Control Agents, Appl. Microbiol. Biotechnol., 61, 413-423.
- Short, D. E. ve Koehler, P. G., 1979. A sampling technique for mole crickets and other pests in turfgrass and pasture. Fla. Entomol. 62,3, 282-283.
- Smart, G.C. Jr., 1995. Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects. J. Nematol. 27,4S, 529-534.
- Smilanick, J. M., Zalom, F.G ve Ehler, L. E., 1996. Effect of methamidophos residue on the pentatomid egg parasitoids *Trisolcus basalis* and *T. utahensis* (Hymenoptera: Scelionidae). Biological Control 6, 193-201.
- Smits, P. H., 1996. Biological control of insect pests in turfgrass. Pesticide Sci. 47,4, 385-388.
- St. Leger, R.J. 1990. The integument as a barrier to microbial infections, In A. Retnakaran and K. Binnington (eds.), The physiology of insect epidermis. Inkata Press Pty, Ltd, North Clayton, Victoria, Australia., 284-306.
- St. Leger, R. J. ve Roberts, D. W., 1997. Engineering Improved Mycoinsecticides, Trends Biotechnol., 15, 83-85.
- Strasser, H., Vey, A. ve Tariq, M. B., 2000. Are There any Risks in Using Entomopathogenic Fungi for Pest Control, with Particular Reference to the Bioactive Metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? Biocont. Sci. Technol., 10, 717-735.

- Stumpf, N. ve Nauen, R., 2001. Cross-Resistance, Inheritance and Biochemistry of Mitochondrial Electron Transport Inhibitor-Acaricide Resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Journal Economy Entomology, 94,6,1577-1583.
- Sutton, J.C., Li, D.W., Peng, G., Yu, H., Zhang, P. ve Valdebenito-Sanhueza, R.M., 1997. *Gliocladium roseum* a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. Plant Dis. 81, 316-328.
- Şeniz, V., Eser, B., Daşgan, Y., Akbudak, N., İlbi, H., Sürmeli, N. ve Başay, S. 2005. Sebze Üretiminde Gelişme ve Hedefler, Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik.
- Thompson, S. R., 2003. Biological Control and Behavioral Studies of Mole Crickets (Orthoptera: Gryllotalphidae) with the Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, Yüksek Lisans Tezi, North Carolina State University, Graduate Faculty, Carolina.
- Toledo, A.V., Virla, E., Humber R.A., Paradell, S.L. ve Lastra, C.C.L., 2006. First record of *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) as an entomopathogenic fungus of *Oncometopia tucumana* and *Sonesimia grossa* (Hemiptera: Cicadellidae) in Argentina, Journal of Invertebrate Pathology, 92,7-10.
- Tucker, D. L., Beresford, C. H., Sigler, L. ve Rogers K., 2004. Disseminated *Beauveria bassiana* infection in a patient with acute lymphoblastic leukemia. J Clin Microbiol; 42, 5412-5414.
- Ulagaraj, S. M., 1976. Sound production in mole crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae: *Scapteriscus*). Ann. Entomol. Soc. Am. 69,2, 299-306.
- URL-1, http://www.agroatlas.ru/content/pests/Gryllotalpa_africana/Gryllotalpa_africana.jpg 23.05.2012.
- URL-2, <http://www.sipweb.org/fungi/humber.pdf> Recent Phylogenetically Based Reclassifications of Fungal Pathogens of Invertebrates, 24 Şubat 2009.
- Ünal, G., 1998. Zirai Mücadele İlaçları Toksikolojisi ve Çevre, Ankara Zirai Mücadele Enstitüsü Seminer Notları, Ankara.
- Van den Bosch, R., Messenger, P.S. ve Gutierrez, A.P., 1982. An Introduction to Biological Control. Plenum Press, New York.
- Vanninen, I. ve Husberg, G. B., 1989. Occurrence of Entomopathogenic Fungi and Entomoparasitic Nematodes in Cultivated Soils in Finland, Entomologica Fennica, 53, 65-71.
- Vega, F. E., Dowd, P. F. ve Bartelt, R. J., 1995. Dissemination of Microbial Agents Using an Autoinoculating device and Several Insect Species as Vectors, Biol. Control, 5, 545-552.
- Villani, M.G., Allee, L.L., Diaz, A. ve Robbins, P.S., 1999. Adaptive strategies of edaphic arthropods. Ann. Rev. Entomol. 44, 233-256.

- Villani, M.G., Allee, L.L., Preston-Wilsey, L., Consolie, N. Y. ve Brandenburg, R.L. 2002. Use of radiography and tunnel castings for observing mole cricket (Orthoptera: Gryllotalpidae) behavior in soil. Am. Entomol. 48,1, 42-50.
- Walker, T. J. ve Ngo, D., 1982. Mole crickets and pasture grasses: damage by *Scapteriscus vicinus*, but not by *S. acletus* (Orthoptera: Gryllotalpidae). Fla. Entomol. 65,1, 105-110.
- Wang, C. S. St. ve Leger, R. J., 2007. A scorpion neurotoxin increases the potency of a fungal insecticide. Nat. Biotechnol. 25, 1455-1456.
- Weeden, C. R., Shelton, A. M., ve Hoffman, M. P., 2007. Biological Control: A Guide to Natural Enemies in North America. Available from URL:<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol>.
- Weiss, B. ve Dickerson, L., 1918. European Mole Cricket, *Gryllotalpa gryllotalpa* L., An Introduced Insect Pest, Journal New York Entomological Society.
- Weiser, J., 1969. An Atlas of Insect Diseases, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague.
- Wiles, J. A. ve Jepson, P.C., 1994. Substrate-mediated toxicity of deltamethrin residues to beneficial invertebrates: Estimation of toxicity factors to aid risk assesment. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 27, 348-391.
- Willmer, P.G. 1986. Microclimatic effects on insects at the plant surface, pp. 65-80. *In* B. Juniper and R. Southwood (eds.), *Insects and the plant surface*. Edward Arnold, London.
- Wilson, M. J. ve Gaugler, R., 2000. Terrestrial Mollusca Pests, In "Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests" (Lacey, L. A. ve Kaya, H. K., Eds.), 787-804, Kluwer Academic, Dordrecht.
- Woods, S. A. ve Elkinton, J. S., 1987. Biomodal Patterns of Mortality from Nuclear Polyhedrosis Virus in Gypsy Moth (*Lymantria dispar*) Populations, J. Invertebr. Pathol., 50, 151-157.
- Xia, Y., Hertl, P. T. ve Brandenburg , R. L., 2000. Surface and subsurface application of *Beauveria bassiana* for controlling mole crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae) in golf courses. J. Agric. Urban Entomol. 17,4, 177-189.
- Yıldırım, E., 2000. Tarımsal Zararlılarla Mücadele ve Kullanılan Yöntemler. Atatürk Üniv. Zir. Fakültesi Yayınları No: 219, Ziraat Fak. Ofset Tesisleri, 344 s.
- Yıldız, M., Gürkan, M. O., Turgut, C., Kaya, Ü. ve Ünal, G., 2005. Tarımsal savaşımında kullanılan pestisitlerin yol açtığı çevre sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongresi. Ankara.

- Zayed, A., 2003. Pathogenicity of Two *Beauveria bassiana* Indigenous Isolates Towards the Greater Wax Moth *Galleria mellonella* L. Larvae in Egypt, Efflatounia, 3,10-14.
- Zchenxian, Y., 1988. The effect of pesticides on *Trichogramma japonicum*. Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases., 1143-1147.
- Zimmermann, G., 1993. The Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* and its Potential as a Biocontrol Agent, Pestic. Sci., 37, 375-379.
- Zimmermann, G., 2007a. Review on Safety of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*, Biocont. Sci. Technol., 17, 553-596.
- Zimmermann, G., 2007b. Review on Safety of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*, Biocont. Sci. Technol., 17, 879-920.

8. EKLER

Ek 1. *Beauveria bassiana* Gg-1'in ITS1-5.8S-ITS2 Gen Bölgesinin Baz Sırası

TTTAACTCCCTAACCCTTCTGTGCAACCTACCATATCGTTGCTTCGGCGGACTC
GCCCCAGCCCGGACGCGGACTGGACCAGCGGCCCGCCGGGGACCTCAAACCTCT
TGTATTCCAGCATCTTCTGAATACGCCGCAAGGCAAAACAAATGAATCAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC
GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC
ATTGCGCCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCC
TCGACCTCCCCTGGGGGAGGTTCGGCGTTGGGGACCGGCAGCACACCGCCGGCC
CTGAAATGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCTGCGTAGTAATACAGCTC
GCACCGGAACCCCGACGCGGCCACGCCGTAACACCCAACTTCTGAACGTTG
ACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATA

Ek 2. *Clonostachys* sp. Gg-2'nin ITS1-5.8S-ITS2 Gen Bölgesinin Baz Sırası

TTCCAACCCATGTGTACATACTACTGTTGCTTCGGCGGGATTGCCCCGGGCGC
CTCGTGTGCCCGGATCAGGCGCCCGCCTAGGAACTTAATTCTTGTTTTATTT
TGGAATCTTCTGAGTAGTTTTTACAAATAAATAAAAACTTTCAACAACGGATCT
CTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTA
TTCTGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCATTTCAACCCTCATGCCCCTAGGGCG
TGGTGTGGGGATCGGCCAAAGCCCGCGAGGGACGGCCGGCCCTAAATCTAG
TGGCGGACCCGTCGTGGCCTCCTCTGCGAAGTAGTGATATTCCGCATCGGAGA
GCGACGAGCCCCTGCCGTTAAACCCCAACTTTCCAAGGTTGACCTCAGATCA
GGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATA

Ek 3. *Clonostachys* sp. Gg-3'ün ITS1-5.8S-ITS2 Gen Bölgesinin Baz Sırası

TTAACTCCCAACCCATGTGAACATACTACTGTTGCTTCGGCGGGATTGCCCCG
GGCGCCTCGTGTGCCCGGATCAGGCGCCCGCCTAGGAACTTAATTCTTGT
TATTTTGAATCTTCTGAGTAGTTTTTACAAATAAATAAAAACTTTCAACAACG
GATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATG
TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCG
CAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCATTTCAACCCTCATGCCCTA
GGGCGTGGTGTGGGGATCGGCCAAAGCCCGCGAGGGACGGCCGGCCCTAA
ATCTAGTGGCGGACCCGTCGTGGCCTCCTCTGCGAAGTAGTGATATTCCGCATC
GGAGAGCGACGAGCCCCTGCCGTTAAACCCCAACTTTCCAAGGTTGACCTCA
GATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATA

Ek 4. *Clonostachys* sp. Gg-4'ün ITS1-5.8S-ITS2 Gen Bölgesinin Baz Sırası

TTCCCAAACCCATGTGAACATACCTATTGTTGCTTCGGCGGGATTGCCCCGGGC
 GCCTCGTGTGCCCCGGATCAGGCGCCCGCCTAGGAACTTTAACTCTTGTTTTAT
 TTTGAATCTTCTGAGTAGTTTTTACAAATAAATAAAAACTTTCAACAACGGATC
 TCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAA
 TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGT
 ATTCTGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCATTTCAACCCTCATGCCCTAGGGC
 GTGGTGTGGGGATCGGCCAAAGCCCGCGAGGGACGGCCGGCCCCTAAATCTA
 GTGGCGGACCCGTCGTGGCCTCCTCTGCGAAGTAGTGATATTCCGCATCGGAG
 AGCGACGAGCCCCTGCCGTTAAACCCCAACTTTCCAAGGTTGACCTCAGATC
 AGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT

Ek 5. *Clonostachys* sp. Gg-5'in ITS1-5.8S-ITS2 Gen Bölgesinin Baz Sırası

TCCCAAACCCATGTGAACATACCTACTGTTGCTTCGGCGGGATTGCCCCGGGC
 GCCTCGTGTGCCCCGGATCAGGCGCCCGCCTAGGAACTTAATTCTTGTTTTAT
 TTTGGAATCTTCTGAGTAGTTTTTACAAATAAATAAAAACTTTCAACAACGGAT
 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA
 ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAG
 TATTCTGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCATTTCAACCCTCATGCCCTAGGG
 CGTGGTGTGGGGATCGGCCAAAGCCCGCGAGGGACGGCCGGCCCCTAAATCT
 AGTGGCGGACCCGTCGTGGCCTCCTCTGCGAAGTAGTGATATTCCGCATCGGA
 GAGCGACGAGCCCCTGCCGTTAAACCCCAACTTTCCAAGGTTGACCTCAGAT
 CAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATA

Ek 6. *Clonostachys* sp. Gg-6'nın ITS1-5.8S-ITS2 Gen Bölgesinin Baz Sırası

CCGAATCCTATGTGAACATGCCTACTGCGGGTTCGGCGGTATTGCCGTGGCCG
 CCGCGTGTGCGCGGATCATGCGCCCGCCTAGGAACTTAATTCTTGTTTTATTT
 TGGAATCTTCTGAGTAGTTTTTACAAATAAATAAAAACTTTCAACAACGGATCT
 CTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
 TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTA
 TTCTGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCATTTCAACCCTCATGCCCTAGGGCG
 TGGTGTGGGGATCGGCCAAAGCCCGCGAGGGACGGCCGGCCCCTAAATCTAG
 TGGCGGACCCGTCGTGGCCTCCTCTGCGAAGTAGTGATATTCCGCATCGGAGA
 GCGACGAGCCCCTGCCGTTAAACCCCAACTTTCCAAGGTTGACCTCAGATCA
 GGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATAA

Ek 7. *Metarhizium anisopliae* Gg-7'nin ITS1-5.8S-ITS2 Gen Bölgesinin Baz Sırası

TCCTACCCCTGTGAATTATACCTTTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCC
 GCCGGGGACCCAAACCTTCTGAATTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAA
 AAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAA
 GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC
 GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCG
 AGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGGCGA
 GGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGC
 CCTCCTCTGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACT
 GCCGTA AACCCCAACTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCC
 GCTGAACTTAAAGCATATA

Ek 8. *Clonostachys* sp. Gg-8'in ITS1-5.8S-ITS2 Gen Bölgesinin Baz Sırası

ACTCCCAACCCATGTGAACATACCTACTGTTGCTTCGGCGGGATTGCCCGGG
 CGCCTCGTGTGCCCGGATCAGGCGCCCGCCTAGGAACTTAATTCTTGTTTTA
 TTTTGAATCTTCTGAGTAGTTTTTACAAATAAATAAAAACCTTTCAACAACGGA
 TCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG
 AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCA
 GTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCATTTCAACCCTCATGCCCTAGG
 GCGTGGTGTGGGGATCGGCCAAAGCCCGCGAGGGACGGCCGGCCCTAAAT
 CTAGTGGCGGACCCGTCGTGGCCTCCTCTGCGAAGTAGTGATATCCGCATCG
 GAGAGCGACGAGCCCTGCCGTTAAACCCCAACTTTCCAAGGTTGACCTCAG
 ATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAAGCATATA

Ek 9. *Clonostachys* sp. Gg-9'un ITS1-5.8S-ITS2 Gen Bölgesinin Baz Sırası

TTCACTCCAAACCCATGTGAACATACCTATCGTTGCTTCGGCGGGATCGCCCCG
 GGCGCCTTGCGTGCCCGGATCCAGGCACCCGCCGGGGACCTTAACTCTTGT
 TTTATTTAGAATCTTCTGAGTAGTTTTTACAAATAAATAAAAACCTTTCAACAAC
 GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAAAAGTAAT
 GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCG
 CCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCATTTCAACCCTCATACCCCT
 AGGGTGTGGTGTGGGGATCGGCCAAGGCCCGCAAGGGACGGCCGGCCCTA
 AATCTAGTGGCGGACCCGTCGTGGCCTCCTCTGCGAAGTAGTAATATCCGCAT
 CGGAGAAGCGACGAGCCCTGCCGTTAAACCCCAACTTTCTAAGGTTGACCT
 CAGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAAGCATAT

Ek 10. *Myriodontium keratinophilum* Gg-10'un ITS1-5.8S-ITS2 Gen Bölgesinin Baz Sırası

GCCAGCGGGAACCCCGCTAAAGGCCCCACACTTGTCTACCAAACCTACGTTGCC
TCGGCGGGACCGTCCCCTAGGGGACCGCCGGGGGGGACTTACCTCCCCCCTGG
TCAGCGCCCGCCGGAGGACAAATAACCAAACCTTTGTAACAGTGAGTTGTCTG
AGCGATTATATAAATGAATCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCG
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCAT
GCCTGTCCGAGCGTCATTGCAACCCTCAAGCACGGCTTGTGTTATGGGCCCTCG
TCCCGCTATTTTAGTGACGTGCCCGAAATGCAGTGATCGCCGCCGCGACTCC
GGCGCCCGAGCGAATGGGAATTTAACCACCGCTCAGTGGGCCCGCCGGTGGC
TTCGGTCTCAAACCACAATTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACC
CGCTGAACCTTAAGCATATA

Ek 11. *Myriodontium keratinophilum* Gg-11'in ITS1-5.8S-ITS2 Gen Bölgesinin Baz Sırası

AATTTACCCCGCCTAAGGTCCCACACTTGTCTACCAAACCTACGTTGCCTCGGCG
GGACCGTCCCCTAGGGGACCGCCGGGGGGGACTTACCTCCCCCCTGGTCAGCG
CCCGCCGGAGGACAAATAACCAAACCTTTGTAACAGTGAGTTGTCTGAGCGAT
TATATAAATGAATCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCA
TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTC
CGAGCGTCATTGCAACCCTCAAGCACGGCTTGTGTTATGGGCCCTCGTCCCGCT
ATTTTAGTGACGTGCCCGAAATGCAGTGATCGCCGCCGCGACTCCGGCGCCC
GAGCGAATGGGAATTTAACCACCGCTCAGTGGGCCCGCCGGTGGTTTTCGGTC
TCAAACCACAATTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA
ACTTAAGCATATAATC

Ek 12. *Metarhizium anisopliae* Gg-12'nin ITS1-5.8S-ITS2 Gen Bölgesinin Baz Sırası

CACCTCCCTACCCCTGTGATTATACTCTTTAATTGTTGCTTCGGCGGTA CTTCGC
GCCCCCGGGGACCCAAACCTTCTGAATTTTAAATAAGTATCTTCTGAGTGGTT
AAAAAAAAAATGATTCAAACTTTACCCACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGA
TGAAAACGCATCGAAATGCTATAAGTAATGTGAATTGCATAATTCAGTGAAT
CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTG
TTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGG
CGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGT
GGCCCTCCTCTGCGCATTATTAACAACTCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCC
ACTGCCGTAACCCCAACTTTTTATAGTTGACCTCAAATAAGGTAGGACT
ACCCGCTGAACCTTAAGCATATTTT

Ek 13. *Clonostachys* sp. Gg-13'ün ITS1-5.8S-ITS2 Gen Bölgesinin Baz Sırası

TTTCAACTCCCAAACCCATGTGAACATACCTACTGTTGCTTCGGCGGGATTGCC
 CCGGGCGCCTCGTGTGCCCGGATCAGGCGCCCGCCTAGGAAACTTAATTCTT
 GTTTTATTTTGAATCTTCTGAGTAGTTTTTACAAATAAATAAAAACTTTCAAC
 AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
 AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGC
 CCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCATTTCAACCCTCATGCC
 CCTAGGGCGTGGTGTGGGGATCGGCCAAAGCCCGCGAGGGACGGCCGGCCC
 CTAAATCTAGTGGCGGACCCGTCGTGGCCTCCTCTGCGAAGTAGTGATATTCCG
 CATCGGAGAGCGACGAGCCCCTGCCGTTAAACCCCCAACTTTCCAAGGTTGAC
 CTCAGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATA

Ek 14. *Metarhizium anisopliae* Gg-14'ün ITS1-5.8S-ITS2 Gen Bölgesinin Baz Sırası

TCCACTCCTAACCCTGTGATTATACCTTTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCG
 CGCCCGCCGGGGACCCAAACCTTCTGAATTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGT
 TAAAAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG
 ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA
 ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCC
 TGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATC
 GCGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCC
 GTGGCCCTCCTCTGCGCAGTAGTAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGT
 CCACTGCCGTAAAACCCCCCACTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGAC
 TACCCGCTGAACTTAAGCATATTA

Ek 15. *Clonostachys* sp. Gg-15'in ITS1-5.8S-ITS2 Gen Bölgesinin Baz Sırası

TAAACTCCCAAACCCATGTGAACATACCTATCGTTGCTTCGGCGGGATCGCCCC
 GGGCGCCTTGTGTGCCCGGATCCAGGCACCCGCCGGGGACCTTATATCTTG
 TTTTATTTAGAATCTTCTGAGTAGTTTTTACAAATAAATAAAAACTTTCAACAA
 CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAAAAGTAA
 TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC
 GCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCATTTCAACCCTCATACCCC
 TAGGGTGTGGTGTGGGGATCGGCCAAGGCCCGCAAGGGACGGCCGGCCCCTA
 AATCTAGTGGCGGACCCGTCGTGGCCTCCTCTGCGAAGTAGTAATATTCCGCAT
 CGGAGAAGCGACGAGCCCCTGCCGTTAAACCCCCAACTTTCTAAGGTTGACCT
 CAGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATA

Ek 16. *Beauveria bassiana* Gg-1'in 18S EF1- α Gen Bölgesinin Baz Sırası

TTATCGGGGTGCGTTTACGCTGACGCCTTCGACCTCGACGAGCAATAAATACT
 GACCACCAGACAGCCACGTTCGATTCCGGCAAGTCTACCACCGTAAGTTTTTTC

AACGGTCGAGTGGCTTTTGGAGCTCTCGAACCAGCAATCTTCCGCCTCGCCGGTA
 CCTGAGAGCAAAGAGCTAACTCATGTATACAGACTGGTCACTTGATCTACCAG
 TGCGGTGGTATTGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGCATAGT
 ATCCAACCTCTTTTCTACTGTCAAATGGACCTTGATCGCTTGCTGCGCAATTTTTT
 TTTCGTGCTATCGCGCTGGCCACCAGCACTCACTACCCCTCCTCGCTGCGGCAA
 AAATTTTCAGTGCCTTATCAATTCAGTGGGGCCAGTGAGAGTACCCCGCCACCT
 TGTCGCAAGCTTTCCCCTCATCTATTAGGTGCAAGCAGCAGAAGAAGAGATAT
 CGCGTGCCTCAGCCAACAGATCGCTAACCTACCGTCTACAGGAAGCCGCTGA
 ACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTATGCCTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCG
 AGCGTGAGCGTGGTATCACCATTGATATCGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCC
 AAGTACCACGTCACCGTCATTGATGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCATCAAGAAC
 ATGATTACTGGTACTTCCCAGGCCGATTGCGCTATTCTCATCATCGCCGCCGGT
 ACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGACCCGTGAGCACGC
 TCTGCTCGCCTTACCCTCGGTGTCAAGCAGCTCATTGTTGCCATCAACAAGAT
 GGACACCACCAAGTGGTCCGAGGCCCGTTACCAGGAAATCATCAAGGAGACTT
 CCAGCTTCATCAAGAAGTTGGCTACAACCCCAAGGCTGTTGCTTTCGTCCCAT
 CTCCGGTTCAACGGCGACAACATGCTTGAGCCCTCCAGCAACTGTCCCTGGTA
 CAGGGTTGGGGAGAAGGAGACTAAGGCTGGCAAGTCTACTGGCAAGACCCTT
 CTCGAGGCCATCGACGCCATTGAGCCCCCAAGCGTCCTAACCGACAAGCCTC
 TCCGT

Ek 17. *Metarhizium anisopliae* Gg-7'nin 18S EF1- α Gen Bölgesinin Baz Sırası

TATTCGGTGTCGACTGCACCTTTTCGAATCCTGTATAAGCTGTTATACTGACTT
 GGTTGTCGTAGGGGTATGTTTCGGAGCCTACACTCTTCGCCGTAACGAGTTTGT
 GATAACTGACTGGTCCTCACAGCCACGTCGACTCCGGCAAGTCTACCACCCT
 GGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTT
 CGAGAAGGTAAGCCAAACCCTCCGATTAATGATCTGCTATTGTTTGGCGATG
 AACATTATTGGGTTTCCCCTGCTGCTGCGCCATTACCCCTCACTGTGACACGA
 AAATTTTCGCGGGGCCTTATCTTGGACTTTGGTGGGGCACCGTACCCCGCCAGC
 TGTCGAGGGTGTCTCTGTGTGTCTTGGCTGTTGAAACCACAACATTGTCGTTGC
 TTTCAGAGGAAAAACAAGAACTAATTTGGATCGCTGTATAGGAAGCCGCTG
 AACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCATGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCC
 GAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCC
 CAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTCGACTTGCGAAACTGACCGCATA
 TTTTCTCCCAAATTGAAATGCTAATGCCCTCCACAGACGCTCCCGGTCACCG
 TGACTTTATCAAGAACATGATCACTGGTACTTCCCAGGCTGACTGCGCTATTCT
 CATTATCGCTGCCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCC
 AGACCCGTGAGCACGCTCTGCTCGCCTACACCCTGGGTGTCAAGCAGCTCATT
 GTCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCCGAGGCCCGTTACCAGGA
 AATCATCAGGAGACTTCCAACCTTCATCAAGAAAGGTCGGCTACAACCCCAAGT
 CCGTCGCCTTCGTCCCATCTCCGGTTCCACGGTGACACATGCTTCAGCCTCC
 ACAACTGCCCTGGTTACACAAGGGTTGGGAGAAGGAGACCAAGGCTGGCAA
 GTCCACCGGCAAGACCCTCCTCGAGGCCATTGACGCTATTGAGCCCCCAAGC
 GTCCACCGACAAGCCCCCTCCGT

Ek 18. *Metarhizium anisopliae* Gg-12'nin 18S EF1- α Gen Bölgesinin Baz Sırası

CTGGGTAGGTCGTCTGCCTCCATTTTCGAGCCCTGGAGAAGCTGTTGTAAGTACTGACT
 TGCTTGTTCGTAGGGGTATGTTTCGGAGCCTACACTCTTCGCCGTCTCGAGTTTG
 TGATAACTGACTGGTCCTCACAGCCACGTCGACTCCGGCAAGTCTACCACCAC
 TGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGT
 TCGAGAAGGTAAGCCAAACCACTCCGATTAATGATCTGCTATTGTTTGGCGAT
 GAACATTATTGGGTTTCCCGCTGCCTGTCGGCCATTACCCCTCACTGTGACACG
 AAAATTTTCGCGGGGCCTTATCTTGGACTTTGGTGGGGCACCGTACCCCGCCAG
 CTGTCGAGGGTGTCTCTGTGTGTCTTGGCTGTTGAAACCACAACATTGTTCGTTG
 CTTTCAGAGGAAAAACAAGAACTAATTTGGATCGCTGTATAGGAAGCCGCT
 GAACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCATGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGC
 CGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTC
 CCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTCGACTTGCGCAAACCTGACCCGCATA
 CTTTTCTCCCAAATTGAAATGCTAATGCCCTCCACAGACGCTCCCGGTACC
 GTGACTTTATCAAGAACATGATCACTGGTACTTCCCAGGCTGACTGCGCTATTC
 TCATTATCGCTGCCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCC
 AGACCCGTGAGCACGCTCTGCTCGCCTACACCCTGGGTGTCAAGCAGCTCATT
 GTCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCCGAGGCCCGTTACCAGGA
 AATCATCAAGGAGACTTCCAACCTCATCAAGAAAGGTCGGCTACACCCCAAGT
 CCGTCGCCTTCGTCCCATCTCCGGTTTCACGGTGACACATGCTTCAGCTCCAC
 AACTGCCCTGGTACAAGGGTTGGGAGAAGGAGACCAAGGCTGGCAAGTCCAC
 CGGCAAGACCCTCCTCGAGGCCATTGACGCTATTGAGCCCCCAAGCGTCCCA
 CCGACAAGCCCCTCC

Ek 19. *Metarhizium anisopliae* Gg-14'ün 18S EF1- α Gen Bölgesinin Baz Sırası

CGTATTCGTATGTCGCCTGCCTCATTTCGAATCCTGTACAAGCTGTTATACTGA
 CTTGCTTGTTCGTAGGGGTATGTTTCGGAGCCTACACTCTTCGCCGTCTCGAGTT
 TGTGATAACTGACTGGTCCTCACAGCCACGTCGACTCCGGCAAGTCTACCACC
 ACTGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAA
 GTTCGAGAAGGTAAGCCAAACCACTCCGATTAATGATCTGCTATTGTTTGGCG
 ATGAACATTATTGGGTTTCCCGCTGCCTGTCGGCCATTACCCCTCACTGTGACA
 CGAAAATTTTCGCGGGGCCTTATCTTGGACTTTGGTGGGGCACCGTACCCCGCC
 AGCTGTCGAGGGTGTCTCTGTGTGTCTTGGCTGTTGAAACCACAACATTGTTCGT
 TGCTTTCAGAGGAAAAACAAGAACTAATTTGGATCGCTGTATAGGAAGCCG
 CTGAACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCATGGGTTCTTGACAAGCTCAAG
 GCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGAC
 TCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTCGACTTGCGCAAACCTGACCGCA
 TACTTTTCTCCCAAATTGAAATGCTAATGCCCTCCACAGACGCTCCCGGTCA
 CCGTGACTTTATCAAGAACATGATCACTGGTACTTCCCAGGCTGACTGCGCTAT
 TCTCATTATCGCTGCCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGG
 CCAGACCCGTGAGCACGCTCTGCTCGCCTACACCCTGGGTGTCAAGCAGCTCA
 TTGTCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCCGAGGCCCGTTACCAG
 GAAATCATCAAAGAGGACTTCCAACCTCATCAAGAAAGGTCGGCTACAACCC
 AAGTCCGTGCCTTCGTCCCATCTCCGGTTTCACGTGACAACATGCTTCAGC

CTCCACCAACTGCCCCTGGTACAAGGGTTGGGAGAAGGAGACCAAGGCTGGC
AAGTCCACCGGCAAGACCCCTCCTCGAGGCCATTGACGCTATTGAGCCCCCAA
GCGTCCCACCGACAAGCCCCTC

Ek 20. *Beauveria bassiana* Gg-1'in 18S RPB1 Gen Bölgesinin Baz Sırası

CCTGGTTTCTCAAGAAAGTGGAAAAGGTTTTGGAGATTGTCTGCCACAACCTGC
AGCAAAGTGTGGCCGATGAAGTTGGTCTTCCCTTTACTCCATGAAGCTTTGGA
GCTTGCTGGATGCTAACGTGCATTATCAGAGCGATCCCGAATTCGTCACAGCT
ATTCATACTCGCGATCCGAAACTCCGATTCAAGCGCGTTTGGGCCGTATGCAA
GAAGAAGCGCAAATGCGAGAATGAGGAGCGGCAAGACAAGAATAAAGACGA
AGAGTTCGCTCCAGGTGTCAAGAACGTCGTTCTCGAAGGACATGGCGGATGTG
GCAATATGCAGCCGCAGGTGAGACAGGCCGCGCTGCAACTCAAAGCTGCCTTC
GAGGTTACTTCGGAAGAGGGTCCCAAGAGGAAAGAGACGGTTAATATCAGCG
CCGAGATGGCGCATGGTATCCTTCGCCGCATCTCTGAGCGCGATCTGCACAAT
ATTGGTCTTAACTCAGACTATGCTCGTCCCGAGTGGATGATCATCACTGTCCTG
CCTGTACCCCTCCTCCCGTGGCTCCTAGTATTTCCATGGATGGTACTGGTACT
GGCACGAGAAACGAGGATGATCTGACCTACAAGCTTGGTGACATTATCCGCGC
CAACGGTAATGTCAAGCAGGCCATTTCGTGAAGGATCACCGCAACACATCGCGC
GTGATTTGAGAGCTTGCT

Ek 21. *Metarhizium anisopliae* Gg-7'nin 18S RPB1 Gen Bölgesinin Baz Sırası

CCGGTGTACATCCGGTGTCTTAGGAAGGTCAAAAAGATTTTGGAGATTGTCTG
CCACAACCTGCAGCAAGGTGTTGGCCGATACTGTTGGTCTATCCTGACTCTCCGT
AGGCTTTTTGTGAACTTCTTGGTTGCTAACACAAAATTTCTCTCTCAGAGCGA
TCCCGAGTTTGTACCGCAATCAACACGCGAGATGCTAAACTACGCTTCAATC
GTGTCTGGGCAGTCTGCAAGAAGAAGCGGAGATGTGAAAACGAAGATCGTAA
CGAGAAGAACGACGATGAGTTTGCTCCTGGCATGAAGCCAGTCGCACACAACC
ATGGTGGTTGCGGAAACGTGCAGCCGCAGGTCCGACAGGCGGCTTTGCAGCTC
AAGGCTGCGTTCGATGTAGCGCAAGAGGACGGCCCCAAGAGGCGAGAGACGG
TGCCGATCACGCCAGAGATGGCTCACGGTATTCTGAGAAGAATCTCGGAGGAG
GATCTTCGGCACATGGGCCTCAACTCGGATTATGCTCGCCCAGAGTGGATGAT
TCTCACTGTGCTCCCTGTCCCCCGCCCCCTGTTTCGTCCCAGCATTTCATGGAT
GGTACTGGCACCGGCATGCGAAATGAAGACGATTTGACCTACAAGCTTGGTGA
TATTATCCGCGCCAACGGCAATGTGAAGCAGGCTATCCGCGAAGGATCACCCC
AGCACATTGCGCGCGATTGAGGAGTTGGCTGCAAGT

Ek 22. *Metarhizium anisopliae* Gg-12'nin 18S RPB1 Gen Bölgesinin Baz Sırası

TCCGGCGATTTGTCGTTGTCCATGTATGTTGCCACATGGTACTGCAGCAACTCC
TCAAATCGCGCGCAATGTGCTGGGGTGATCCTTCGCGGATAGCCTGCTTCAC
ATTGCCGTTGGCGCGGATAATATCACCAAGCTTGTAGGTCAAATCGTCTTCATT
TCGCATGCCGGTGCCAGTACCATCCATGGAAATGCTGGGACGAACAGGGGGCGC

GGGGGACAGGGAGCACAGTGAGAATCATCCACTCTGGGGCGAGCATAATCCGA
 GTTGAGGCCCATGTGCCGAAGATCCTCCTCCGAGATTCTTCTCAGAATACCGTG
 AGCCATCTCTGGCGTGATCGGCACCGTCTCTCGCCTCTTGGGGCCGTCTCTTG
 CGCTACATCGAACGCAGCCTTGAGCTGCAAAGCCGCCTGTCGGACCTGCGGCT
 GCACGTTTCCGCAACCACCATGGTTGTGTGCGACTGGCTTCATGCCAGGAGCA
 AACTCATCGTCGTTCTTCTCGTTACGATCTTCGTTTTACATCTCCGCTTCTTCT
 TGCAGACTGCCAGACACGATTGAAGCGTAGTTTAGCATCTCGCGTGTTGATT
 GCGGTGACAAACTCGGGATCGCTCTGAGAGAGAAATTTTTGTGTTAGCAACCA
 AGAAGTTCACAAAAGCCTACGGAGAGTCAGGATAGACCAACAGTATCGGCC
 AACACCTTGCTGCAGTTGTGGCAGACAATCTCCAAAATCTTTTTGACCTTCTTA
 ATGAAACCGGAATGTAACAACGGGCTTGGCCAACCTCGATGTGTCCAAAGTGCC
 CCGGGACACTCAA

Ek 23. *Metarhizium anisopliae* Gg-14'ün 18S RPB1 Gen Bölgesinin Baz Sırası

TCCGGCGATTGTCGTTGTCCATGTATGTTGCCACATGGTACTGCAGCAACTCCT
 CAAAATCGCGCGCAATGTGCTGGGGTGATCCTTCGCGGATAGCCTGCTTCA
 TTGCCGTTGGCGCGGATAATATCACCAAGCTTGTAGGTCAAATCGTCTTCATTT
 CGCATGCCGGTGCCAGTACCATCCATGGAAATGCTGGGACGAACAGGGGGCG
 GGGGGACAGGGAGCACAGTGAGAATCATCCACTCTGGGGCGAGCATAATCCGA
 GTTGAGGCCCATGTGCCGAAGATCCTCCTCCGAGATTCTTCTCAGAATACCGTG
 AGCCATCTCTGGCGTGATCGGCACCGTCTCTCGCCTCTTGGGGCCGTCTCTTG
 CGCTACATCGAACGCAGCCTTGAGCTGCAAAGCCGCCTGTCGGACCTGCGGCT
 GCACGTTTCCGCAACCACCATGGTTGTGTGCGACTGGCTTCATGCCAGGAGCA
 AACTCATCGTCGTTCTTCTCGTTACGATCTTCGTTTTACATCTCCGCTTCTTCT
 TGCAGACTGCCAGACACGATTGAAGCGTAGTTTAGCATCTCGCGTGTTGATT
 GCGGTGACAAACTCGGGATCGCTCTGAGAGAGAAATTTTTGTGTTAGCAACCA
 AGAAGTTCACAAAAGCCTACGGAGAGTCAGGATAGACCAACAGTATCGGCC
 AACACCTTGCTGCAGTTGTGGCAGACAATCTCCAAAATCTCTCTGACCTTATCT
 AAGACACCTTAATGAAACCGGGATGGTACACGGGCTTGGCCAACCTCGATGTGT
 CCAAATG

Ek 24. *Beauveria bassiana* Gg-1'in 18S Bloc Gen Bölgesinin Baz Sırası

TCGCAGGCGCACCCACTTTTACATTCCGCGCTTCTTCCAGCCGACCCCTCCGGG
 CCTTCCCGGCAACGACGACGGCGGCCATGGGCTCCTTTGTCGCTTTCAGCAT
 GATGGGTCTCTTTCCCAACCCGGGGCAAGACGTCTACCTCATCACGCCGCCCTT
 TTTCCCCAGCGTGACCGTCAAGCACCCCGTCACCGGAAAGACGGCCAAGATTC
 GCAACGTCAACTTTGACGCCGCGTACAAGAATATTTATATCCAGAGCGCGACG
 CTCAACGGCAAGCCCTACACAAAGAACTGGATTGACCACTCATTCTTTACCGA
 GGGCAAGGAACCTCGTTCTCACGCTGGGGAAGAATGAGAGTAACTGGGGGACC
 GCGGTGGGCGATTTGCCTCCAAGCCTGGGTGCGTACTCGGGCTTTAATCAGAC
 TACTCCAAGAGGTGGTCCGGCTCCAGGAAGTGACAGCTATATTCAACCGGCT
 TTGTAATATGGTTTTCCGGCTTTGGTAATTATTTATAAATACATTTGATACC
 ATCTACTTATAAAGCTTCTCTTTCTGTGTGAGTTAACTGTCAACTATTTGACC

TGTGAGTATTACTCTATCAGTGGAGGACAAGAGTGAGAGCCAGTACAAAGACG
 ATGGAAAGTGC GGTTGGACACTGCAATGTAATGCCAATGACTTTGGCGCGTT
 GGTTTCTGTGGGCAAGGCCGCGGTACCGCTTGCACTCCCCGAAGTGGCCGAGC
 CGCGCTCCACGCATTCCGCACCAGTGTCTGTTGAGTTGGGCGAAACTGATGCC
 CTCTTATGAACAGAGACATGTTGCTGCTTCCAAGGCTTGATCCTTGCGCCGCTC
 GCAATGAATCTCGCCTGAAGATCCTCCAGCAGATCCTGTCGGGAGGCGAGCAG
 CGCAGCATATCGGGCATGACTGAGTTGTGCGAACGCGCACGCTTCGGTCGTTT
 CAAGCCAATTGTCCCTTTTGACAAAGGTCGCACCGGGCTTAATCTGTGCAGTTG
 CTCTGGCTGCGACCGGCACG

Ek 25. *Beauveria bassiana* Gg-1'in 18S RPB2a Gen Bölgesinin Baz Sırası

GCCCACTACTTGCNANTCTTCCGCGGTATCATGCGCCGAATGCACTCAGAGCTC
 GCCAATTACCTGCGACGCTGCGTCGAGGGTAACCGCCACTTCAATCTAGCTGT
 CGGTGTTAAGCCTGGCACGCTTTCAAACGGCCTCAAGTACTCTCTTGCTACTGG
 TAATTGGGGTGACCAGAAAAAGCTATGAGCTCAACTGCTGGTGTGTCCCAGG
 TTTTGAACCGATATACTTTTGCCTCAACACTATCCCACCTTCGACGTACCAATA
 CACCCATTGGCAGAGATGGCAAACCTGGCAAACCTCGTCAGCTTCATAATACT
 CATTGGGGTCTTGTCTGCCCTGCTGAGACACCTGAAGGCCAGGCTTGCGGTCTT
 GTCAAGAATCTGTCTCTCATGTGCTACGTCAGCGTCGGCTCCCCAGCCGAGCC
 GCTCATTGACTTCATGATCAACAGGGGTATGGAGGTCATTGAGGAGTACGAAC
 CACTCAGATACCCACACGCTACCAAGATTTTTGTCAACGGGACCTGGGTTGGA
 GTTCACCAGGACCCCAAGCACCTTGCTGACCAGGTATTCGACACCCGCCGCAA
 GTCCTACCTGCAGTATGAGGTGTCTCTTGTCAGAGAAATCCGTGACCAGGAAT
 TCAAGATCTTCTCTGATGCTGGCCGAGTCATGCGGCCTGTTTTACTGTGCAA
 GTAAAAATGACCCGGAGACTGGCCTTGAAAAGGGACAGCTCGGTCTCACCAA
 GGATTTAGTCAACAGACTGGCGCAAGAGCAAGCCGACCCGCCAGATGATCCA
 GAAATGAAGACGGGTTGGGAGGGCTTGATCAAAGCTGGCGCTGTCGAGTATCT
 AGACGCTGAAGAAGAGGAGACGTCAATGATTTGCATGACCCCGGAGGATCTG
 GAGCTTTATAGACTTCAGAAAGCGGGTGTAGCTGTCGACGACGACCATGGCGA
 TGATCTGAACAAGCGCCTGAGACTAAAACCAACCAACTACACACATGTACAC
 TCACTGTGAAATTCACCCG

Ek 26. *Metarhizium anisopliae* Gg-7'nin 18S RPB2a Gen Bölgesinin Baz Sırası

TCCCTTTTTGGCTAAGCTCTTCCGCGGCATCATTTCGCAGAATGAATACGGAATT
 GTCCAATTATTTGCGAAGATGCGTTGAAGGTAACCGTCATTTCAACTTGGCAGT
 TGGTATCAAGCCTGGAACACTTTCCAACGGTTTGAATATTCCCTTGCCACTGG
 CAACTGGGGAGATCAGAAGAAGGCCATGAGTTCGACTGCCGGCGTGTCCCAA
 GTGTTAAATAGGTATACTTTTGTCTCGACGCTCTCTCACTTGCGACGAACCAAC
 ACACCGATTGGTAGAGATGGTAAGCTCGCTAAACCGCGTCAGCTGCACAACAC
 AACTGGGGCTTGGTCTGTCCTGCCGAGACGCCAGAAGGTCAGGCTTGCGGCC
 TGGTCAAGAACCTGTCATTGATGTGTTATGTCAGTGTGGGTTACCCGGCCGAGC
 CATTGATTGAATTCATGATCAACCGTGGCATGGAAGTGGTAGAAGAGTACGAG
 CCGCTGAGATATCCCATGCCACCAAGATCTTTGTCAATGGTGTGTTGGGTTGGT
 GTACACCAAGATCCTAAGCACCTGGTCAGTCAAGTCTTGATACTAGACGAAA
 GTCGTATCTGCAGTACGAGGTGTCTCTCGTCCGAGAAATCAGGGATCAAGAGT

TCAAGATTTTCTCCGACGCTGGCCGAGTTATGAGACCAGTGTTTACTGTGCAGC
 AAGAGGATGATCCCGAGACTGGCATTGAAAAAGGCCATCTCGTTTTGACCAA
 GAGTTGGTTAACAAGCTTGCTAAAGAACAAGCTGAACCACCCGAAGACCCAA
 GCGAGAAAATTGGCTGGGAAGGACTGATTCGTGCCGGCGCCGTCGAGTACCTT
 GATGCCGAAGAAGAAGAGACATCAATGATCTGCATGACGCCAGAAGATTCTTG
 AGCTGTATCGTCTGCAAAAAGCCGGTGTGCTCTTGATGACGATATTGGAGAT
 GACCTGAACAAGCGTCTCAAGACCAAGACCAACCTCACAACGCACATGTATAC
 GCATTGTGAAATTCATCCCAGTATGATTCTTGGTATTTGCGCTAGTATTATTC
 GTTCCCCGATCACAATCAGGTAAGCAGCCTTTGCCAAGAATTGTCTCATGCTGT
 ACTGACAGTCTTGTTTAGTCACCTTC

Ek 27. *Metarhizium anisopliae* Gg-12'nin 18S RPB2a Gen Bölgesinin Baz Sırası

TAAGCCTCTTCCGCGGCATCATTTCGCAGAATGAATACGGAATTGTCCAATTATT
 TGCGAAGATGCGTTGAAGGTAACCGTCATTTCAACTTGGCAGTTGGTATCAAG
 CCTGGAACACTTTCCAACGGTTTGAAATATTCCCTTGCCACTGGCAACTGGGGA
 GATCAGAAGAAGGCCATGAGTTCGACTGCCGGCGTGTCCAAGTGTTAAATAG
 GTATACTTTTGCTTCGACGCTCTCTCACTTGCAGCAACCAACACACCGATTGG
 TAGAGATGGTAAGCTCGCTAAACCGCGTCAGCTGCACAACACACACTGGGGCT
 TGGTCTGTCTGCCGAGACGCCAGAAGGTCAGGCTTGCGGCCTGGTCAAGAAC
 CTGTCAATTGATGTGTTATGTCAGTGTGGGTTACCGGCCGAGCCATTGATTGAA
 TTCATGATCAACCGTGGCATGGAAGTGGTAGAAGAGTACGAGCCGCTGAGATA
 TCCCCATGCCACCAAGATCTTTGTCAATGGTGTTTGGGTTGGTGTACACCAAGA
 TCCTAAGCACCTGGTCAAGTCTTGGATACTAGACGAAAGTCGTATCTGC
 AGTACGAGGTGTCTCTCGTCCGAGAAATCAGGGATCAAGAGTTCAAGATTTTC
 TCCGACGCTGGCCGAGTTATGAGACCAGTGTTTACTGTGCAGCAAGAGGATGA
 TCCCGAGACTGGCATTGAAAAAGGCCATCTCGTTTTGACCAAAGAGTTGGTTT
 AACAAGCTTGCTAAAGAACAAGCTGAACCACCCGAAGACCCAAGCGAGAAAA
 TTGGCTGGGGAAGGACTTGATTCGTGCCGGCGCCGTCGAGTACCTTTGATGCC
 GAAGAAGAAGAGACATCATTGATCTGCATGACGCCCGAAGATCTTTGAGCTGT
 ATCGTCTGCAGAAAGCCGGTTGTTGCTCTTGGATGACGATTATTGGAGATGAC
 CTTGACCAAGCCGTCTCAAGACCAAGACCAACCCTCCACAACGCACATGTATA
 CGCATTGTGAAATTCATCCCAGTATGATTCTTGGTATTTGCGCTAGTATTATTC
 CGTCCCCGATCACAATCAGGTAAGCAGCCTTTGCCAAGAATTGTCTCATGCTGT
 TACTGACAGTCTTGTTAGTCAACCCTCGGA

Ek 28. *Metarhizium anisopliae* Gg-14'ün 18S RPB2a Gen Bölgesinin Baz Sırası

TTTTGGCTAGCTCTTCCGCGGCATCATTTCGCAGAATGAATACGGAATTGTCCAA
 TTATTTGCGAAGATGCGTTGAAGGTAACCGTCATTTCAACTTGGCAGTTGGTAT
 CAAGCCTGGAACACTTTCCAACGGTTTGAAATATTCCCTTGCCACTGGCAACTG
 GGGAGATCAGAAGAAGGCCATGAGTTCGACTGCCGGCGTGTCCAAGTGTTAA
 ATAGGTATACTTTTGCTTCGACGCTCTCTCACTTGCAGCAACCAACACACCGA
 TTGGTAGAGATGGTAAGCTCGCTAAACCGCGTCAGCTGCACAACACACACTGG
 GGCTTGGTCTGTCTGCCGAGACGCCAGAAGGTCAGGCTTGCGGCCTGGTCAA

GAACCTGTCATTGATGTGTTATGTCAGTGTGGGTTACACGGCCGAGCCATTGAT
 TGAATTCATGATCAACCGTGGCATGGAAGTGGTAGAAGAGTACGAGCCGCTGA
 GATATCCCCATGCCACCAAGATCTTTGTCAATGGTGTGGGTTGGTGTACACC
 AAGATCCTAAGCACCTGGTCAGTCAAGTCTTGGATACTAGACGAAAGTCGTAT
 CTGCAGTACGAGGTGTCTCTCGTCCGAGAAATCAGGGATCAAGAGTTCAAGAT
 TTTCTCCGACGCTGGCCGAGTTATGAGACCAGTGTTTACTGTGCAGCAAGAGG
 ATGATCCCGAGACTGGCATTGAAAAAGGCCATCTCGTTTTGACCAAAGAGTTG
 GTTAACAAGCTTGCTAAAGAACAAGCTGAACCACCCGAAGACCCAAGCGAGA
 AAATTGGCTGGGAAGGACTGATTCGTGCCGGCGCCGTCGAGTACCTTGATGCC
 GAAGAAGAAGAGACATCAATGATCTGCATGACGCCAGAAGATCTTGAGCTGT
 ATCGTCTGCAGAAAGCCGGTGTGCTCTTGATGACGATATTGGAGATGACCTG
 AACAAGCGTCTCAGGACCAAGACCAACCCACAACGCACATGTATACGCATTG
 TGAAATTCATCCAGTATGATTCTTGGTATTTGCGCTAGTATTATTCCGTTCCCC
 GATCACAATCAGGTAAGCAGCCTTTGCCAAGAATTGTCTCATGCTGTACTGAC
 AGTCTTGTTTAGTCAACCTCAAACCA

Ek 29. *Beauveria bassiana* Gg-1'in 18S RPB2b Gen Bölgesinin Baz Sırası

CGTCGTATGGACACTATGGCAAATATCCTGTACTACCCACAAAAGCCTTTGGC
 AACGACTAGATCCATGGAGTTCTTGAAGTTCCGAGAATTGCCTGCAGGTCAAA
 ACGCCATCGTCGCGATTGCTTGTATTCCGGTTATAATCAGGAGGATTCTGTGA
 TTATGAATCAAAGCAGTATCGATCGCGACTCTTCAGAAGTTTGTCTTTTCGTT
 CGTACTCTGATCAAGAGAAAAAGGTTCGGTTTGAACACTACACAGAGATATTCGAA
 AAGCCGTTCCACCAAAGCACCCCTGCGCATGAAACACGGTACTTACGACAAGCT
 CGATGAGGACGGTATTGTCGCTCCTGGCGTTCGTGTGTCTGGAGAAGACATTA
 TCATTGGCAAACTGCGCCAATTGACCCAGAGACGCAAGACTTGGGCGCGCGT
 ACAACTGCGCATCAGCGCCGTGATATCTCTACGCCTCTGCGTAGTACCGAAAA
 TGGTATTGTTGATCAAGTCATTGTGACTGTCAACGCCGACAACGTCAAATACGT
 CAAGGTCAGGGTTCGTACGACCAAGATACCCAGATCGGTGATAAGTTTGCTT
 CACGACACGGCCAAAAGGTACCATTGGTGTACATACCGACAGGAAGATAT
 GCCATTCACGAGAGAGGGGGTACCCAGATATCATTATCAACCCGCACGCCA
 TTCCCTCTCGAATGACAATTGCTCATCTGATCGAATGTCTTTTGAGCAAGGTTT
 CGACTTTAGAAGGTATGGAAGGCGATGCTACTCCATTTACCGACGTCACTGTC
 GATTCTGTCTCCGACTTGCTTCGCAAGCATGGCTATCAGTCCCGCGGGTTTGGAG
 ATCATGTACAACGGCCACACTGGTAAGAACTTCGTGCTCAGGTCTTCTTTCGG
 ACCGACCTATTACCAGCGTCTGCGTACATGGTTCGACGAAACAAAATCCAAC
 TCGTGCTCAG

Ek 30. *Metarhizium anisopliae* Gg-7'nin 18S RPB2b Gen Bölgesinin Baz Sırası

GCGCCCGTATGGACACCATGGCAAATATTCTCTATTATCCCCAGAAACCTCTGG
 CCACCACTCGATCCATGGAGTTTCTCAAGTTCCGTGAGCTGCCTGCTGGCCAAA
 ATGCCATCGTTGCTATTGCCTGCTACTCGGGTTATAACCAGGAGGATTCGGTCA
 TTATGAACCAGAGCAGTATCGACAGAGGCCTGTTCCGTAGTCTGTTCTTCCGTT
 CATACTCCGATCAAGAAAAGAAAGTTGGTTTGAACACTACCGGAAGTATTTGAG

AAACCATTCCATCAGAGTACTCTTCGTATGAAGCACGGAACATATGACAAACT
 TGACGATGATGGTATCGTTCGCACCCGGCGTGAGGGTATCCGGGGAGGACATCA
 TTATTGGCAAGACGGCGCCATTGATCAAGAGAGCCAAGACCTGGGAACCAG
 AACCAGCGTCCATCAAAGACGTGACATCTCCACACCGCTGAGAAGCACGGAG
 AATGGCATTGTGGACTCGGTTCATCTCACAGTCAATGCCGACAATGTCAAGTA
 CGTCAAGGTTTCGTGTCCGAACAACAAAAATCCCACAAATTGGCGACAAGTTTG
 CTTCTCGTCACGGTCAAAGGGGAACCATTGGCGTCACTTACCGACAGGAGGAC
 ATGCCATTTACACGGGAGGGTGTGACGCCAGACATCATTATCAACCCGCACGC
 CATTCCATCTCGAATGACAATTGCTCACTTGATCGAGTGTCTGTTGAGTAAGGT
 GTCGACATTGGAAGGTATGGAGGGTGTGATGCCACACCATTTACTGATGTGACGG
 TGGACTCTGTATCTGAACTGCTGCGCAAACACGGTTACCAGTCCAGAGGATTTT
 GAAATCATGTACAACGGCCATACCGGCAAGAAGCTGAGAGCACAGGTGTTTCT
 TTGGGCCTACATATTACCAGCGACTCCGTACATGGTTCGACAACAAAATTCCA
 ACTTGGCCCTA

Ek 31. *Metarhizium anisopliae* Gg-12'nin 18S RPB2b Gen Bölgesinin Baz Sırası

CGTGCCTGCTGCGTATGTATCGTGGAGGCATTCTCGATGCGTTCGGCAGCCCTA
 CTGGACACTTGTCTATCCATATAAGTTTCTCAAGTTCCGTGAGCTGCCTGCTGG
 CAAAATGCCATCGTTGCTATTGCCTGCTACTCGGGTTATAACCAGGAGGATTC
 CGTCATTATGAACCAGAGCAGTATCGACAGAGGCCTGTTCCGTAGTCTGTTCTT
 CCGTTCATACTCCGATCAAGAAAAGAAAGTTGGTTTGAACCTACACGGAAGTAT
 TTGAGAAACCATTCCATCAGAGTACTCTTCGTATGAAGCACGGAACATATGAC
 AAACTTGACGATGATGGTATCGTTCGCACCCGGCGTGAGGGTATCCGGGGAGGA
 CATCATTATTGGCAAGACGGCGCCATTGATCAAGAGAGCCAAGACCTGGGAA
 CCAGAACCAGCGTCCATCAAAGACGTGACATCTCCACACCGCTGAGAAGCACG
 GAGAATGGCATTGTGGACTCGGTTCATCTCACAGTCAATGCCGACAATGTCAA
 GTACGTCAAGGTTTCGTGTCCGAACAACAAAAATCCCACAAATTGGCGACAAGT
 TTGCTTCTCGTCACGGTCAAAGGGGAACCATTGGCGTCACTTACCGACATGAG
 GACATGCCATTTACACGGGAGGGTGTGACGCCAGACATCATTATCAACCCGCA
 CGCCATTCCATCTCGAATGACAATTGCTCACTTGATCGAGTGTCTGTTGAGTAA
 GGTGTGACATTGGAAGGTATGGAGGGTGTGATGCCACACCATTTACTGATGTGA
 CGGTGGACTCTGTATCTGAACTGCTGCGCAAACACGGTTACCAGTCCAGAGGA
 TTTGAAATCATGTACAACGGCCATACCGGCAAGAAGCTGAGAGCACAGGTGTC
 TTGGC

Ek 32. *Metarhizium anisopliae* Gg-14'ün 18S RPB2b Gen Bölgesinin Baz Sırası

TAAGATGTCGCTGGGGTGTAGTCGTGGTTCGCATTTCGTGATCGTTCGGCAGCGC
 CCTGGAACCTTGTCTATCCATATAGGTTTCTCATGTTCCGTGAGCTGCCTGCTGG
 CAAAATGCCATCGTTGCTATTGCCTGCTAGTTCGGGTATAACCAGGAGGATTC
 CGTCATTATGAACCAAGCAGTATCGACAGAGGCCTGTTCCGTATTCTGGTCTT
 CCGTTCATACTCCGATCAAGAAAAGAAAGTTGGTTTGAACCTACACGGAAGTAT
 TTGAAAAACCATTCCATAAGAGTACTCTTCGTATGAAGCACGGAACATATGAC
 AAACTTGACGATGATGGTATCGTTCGCACCCGGCGTGAGGGTATCCGGGGAGGA

CATCATTATTGGCAAGACGGCGCCCATTTGATCAAGAGAGCCAAGACCTGGGAA
 CCAGAACCAGCGTCCATCAAAGACGTGACATCTCCACACCGCTGAGAAGCACG
 GAGAATGGCATTGTGGACTCGGTCATCCTCACAGTCAATGCCGACAATGTCAA
 GTACGTCAAGGTTCTGTCCGAACAACAAAAATCCCACAAATTGGCGACAAGT
 TTGCTTCTCGTCACGGTCAAAGGGAACCATTGGCGTCACTTACCGACAGGAG
 GACATGCCATTTACACGGGAGGGTGCGACGCCAGACATCATTATCAACCCGCA
 CGCCATTCCATCTAGAATGACAATTGCTCACTTGATAGAGTGTATGTTGAGTAA
 GGTGTGACATTGGAAGGTATGGAGGGTGATGCCACACCATTTACTGATGTGA
 CGGTGGACCAGGTATCTGAACAGCTGCGCAAACACGGCTACCAGTCCAGAGG
 ATTACAAATCATGTACAACGGCCATACCGGCAAGAAGATGAGAGCACAGGTG
 TCTATGGCGTACCAATTCCATT

Ek 33. *Metarhizium anisopliae* Gg-7'nin 18S β -Tubulin Gen Bölgesinin Baz Sırası

CCTCGACGCGTTCCATGGTCGTGCCCTGATTTTGGTACCCCGCTGTATGAGGA
 GGCCACGTCCATATACGCACGCCAACGGATCATCAAGACGAGGCCAAAACGC
 GCTGCATCATAAATGAACATTGGCTGACAATTTATTTCTTTTGATCTTACA
 CAGGTTACCTTCAGACCGGTCAGTGCGTAAGTAAACAAATTCGCCGCTATTTT
 CGAATGAATTGTTACGGAGGTCGGGAGCTTACAATATTTTCGACAGGGTAACCA
 AATTGGTGCTGCTTTCTGGCAGACCATCTCTGGTGAACACGGCCTCGACAGCA
 ATGGTGTCTACAACGGTACCTCTGAGCTCCAGCTCGAGCGTATGAGCGTCTACT
 TCAATGAGGTAAGTTTGAATGAGCCGAATCCTAAGATGTTGAGGAACCATAGG
 TTGTTATCCATGGGGGAGATCAAAGACTGACGCGGGGACTCCCCTCAAAGGC
 CTCCGGTAACAAGTATGTTCCCTCGCGCCGTCCTTGTCGATCTTGAACCTGGCAC
 CATGGATGCCGTCCGTGCCGGTCCTTTTCGGTCAGCTTTTCCGTCCCGACAACCT
 CGTCTTTGGTCAGTCCGGTGCTGGCAACAACCTGGGCCAAGGGTCACTACACTG
 AAGGTGCTGAGCTTGTCGACAATGTCCTTGATGTTGTCCGTCGCGAGGCGGAA
 GGTTGTGACTGCCTCCAGGGCTTCCAGATCACCCACTCTCTCGGTGGTGGTACC
 GGTGCTGGTATGGGTACTCTGTTGATCTCCAAGATCCGTGAAGAGTTTCCCGAC
 CGAATGATGGCCACTTTCTCCGTCGTTCCCTCTCCCAAGGTTTCCGACACCGTT
 GTCGAGCCCTACAACGCAACCCTCTCCGTCCATCAGCTCGTTGAGA ACTCTGA
 CGAGACTTTCTGCAATCGACAATGAGGCTCTGTACGACATCTGCATGCGCACT
 CTTCAAGCTGTCTAACCTTTCGTACGGTGACCTGAAACTATCTCGTCTCTGCCG
 TCATGTCTGGCGTCACCACATGCTTGCGTTCCTCCCGGTCAGTTGAACTCTGATC
 TGCGTAAGCTGGCTGTCAACATGGTCCCCTTCCCTCGTCTGCACTTCTTCATGG
 TCGGCTTCGCCCCCTGACCAGCCGTGGTGCTCACTCTTTCCGCGCTGTCAGCG
 TACCTGAGCTCACCCAGCAGATGTTTCGACCCTAAGAACATGATGGCCGCTTCT
 GACTTCCGAAACGGCCGCTACCTGACCTGCTCTGCCATCTTGTAAGTCCCGTCA
 ATGATGTGCATACTATACGAGGTCATTATACTAATTTCCGTTCCAGCCGTGGCA
 AGGTTGCTATGAAGGAGGTTGAGGACCAGATGCGTAACGTGCAGAACA

Ek 34. *Metarhizium anisopliae* Gg-12'nin 18S β -Tubulin Gen Bölgesinin Baz Sırası

AAGGACTCTCCTCGACGCGTTCATGGTTCGTGCCCTGATTTTGGTACCCCGCT
 GTATGAGGAGGCCACGTCCATATACGCACGCCAACGGATCATCAAGACGAG
 GCAAAACGCGCTGCATCATCATAATGAACATTGGCTGACAATTTATTTCCTTTT
 GATCTTACACAGGTTACCTTCAGACCGGTCAGTGCGTAAGTAAACAAATTCG
 CCGCTATTTTCGAATGAATTGTTACGGAGGTCGGGAGCTTACAATATTTTCGACA
 GGGTAACCAAATTGGTGCTGCTTTCTGGCAGACCATCTCTGGTGAACACGGCC
 TCGACAGCAATGGTGTCTACAACGGTACCTCTGAGCTCCAGCTCGAGCGTATG
 AGCGTCTACTTCAATGAGGTAAGTTTGAATGAGCCGAATCCTAAGATGTTGAG
 GAACCATAGGTTGTTATCCATGGGGGAGATCAAAGACTGACGCGGGGACTCCC
 CTCAAAGGCCTCCGGTAACAAGTATGTTCCCTCGCGCCGTCCTTGTCGATCTTG
 AACCTGGCACCATGGATGCCGTCCGTGCCGGTCCTTTCGGTCAGCTTTTCCGTC
 CCGACAACCTTCGTCTTTGGTCAGTCCGGTGCTGGCAACAACCTGGGCCAAGGGT
 CACTACACTGAAGGTGCTGAGCTTGTGACAATGTCCTTGATGTTGTCCGTCGC
 GAGGCGGAAGGTTGTGACTGCCTCCAGGGCTTCCAGATCACCCACTCTCTCGG
 TGGTGGTACCGGTGCTGGTATGGGTACTCTGTTGATCTCCAAGATCCGTGAAG
 AGTTTCTCCGACCGAATGATGGCCACTTTCTCCGTCGTTCCCTCTCCCAAGGTT
 TCCGACACCGTTGTCGAGCCCCCTACAACGCAACCCTCTCCGTCATCAGCTCGT
 TGAGAACTCTGACGAGACTTTCTGCATCGACAATGAGGCTCTGTACGACATCT
 GCATGCGCACTCTCAAGCTGTCTAACCTTCGTACGGGACCTGAACTATCTTCG
 TNTCTGCCGTCATGTCTGGCGTCACCACATGCTTGCCTTTCCCGGTCAGTTGA
 ACTCTGATCTGCGTAAGCTGGCTGTCAACATGGTCCCCTTCCCTCGTCTGCACT
 TCTTCATGGTTCGGCTTCGCCCCCTGACCAGCCGTGGTGCTCACT

Ek 35. *Metarhizium anisopliae* Gg-14'ün 18S β -Tubulin Gen Bölgesinin Baz Sırası

CTCGACGCGTTCATGGTTCGTGCCCTGATTTTGGTACCCCGCTGTATGAGGAG
 GCCACGTCCATATACGCACGCCAACGGATCATCAAGACGAGGCAAAACGCG
 CTGCATCATCATAATGAACATTGGCTGACAATTTATTTCCTTTTGATCTTACAC
 AGGTTACCTTCAGACCGGTCAGTGCGTAAGTAAACAAATTCGCCGCTATTTTC
 GAATGAATTGTTACGGAGGTCGGGAGCTTACAATATTTTCGACAGGGTAACCAA
 ATTTGGTGCTGCTTTCTGGCAGACCATCTCTGGTGAACACGGCCTCGACAGCAAT
 GGTGTCTACAACGGTACCTCTGAGCTCCAGCTCGAGCGTATGAGCGTCTACTTC
 AATGAGGTAAGTTTGAATGAGCCGAATCCTAAGATGTTGAGGAACCATAGGTT
 GTTATCCATGGGGGAGATCAAAGACTGACGCGGGGACTCCCCTCAAAGGCCT
 CCGGTAACAAGTATGTTCCCTCGCGCCGTCCTTGTCGATCTTGAACCTGGCACCA
 TGATGCCGTCCGTGCCGGTCCTTTCGGTCAGCTTTTCCGTCCCGACAACCTTCG
 TCTTTGGTCAGTCCGGTGCTGGCAACAACCTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAA
 GGTGCTGAGCTTGTGACAATGTCCTTGATGTTGTCCGTGCGGAGGCGGAAGG
 TTGTGACTGCCTCCAGGGCTTCCAGATCACCCACTCTCTCGGTGGTGGTACCGG
 TGCTGGTATGGGTACTCTGTTGATCTCCAAGATCCGTGAAGAGTTTCCCGACCG
 AATGATGGCCACTTTCTCCGTCGTTCCCTCTCCCAAGGTTTCCGACACCGTTGT
 CGAGCCCTACAACGCAACCCTCTCCCGTCCATCAGCTCGTTGAGAACTCTGAC
 GAGACTTTCTGCATCGACATGAGGCTCTGTACGACATCTGCATGCGCACTCTCA
 AGCTGTCCTAACCTTCGTACGGNGACCTGAACTATCTCGTCTCTGCCGTCATG
 TCTGGCGTCACCACATGCTTGCCTTTCCCGGTCAGTTGAACTCTGATCTGCGT

AAGCTGGCTGTCAACATGGTCCCCTTCCCTCGTCTGCACTTCTTCATGGTCGGC
TTCGCCCCCCTGACCAGCCGTGGTGCTCACTCTTTCCGCGCTGTCAGCGTACCT
GAGCTCACCCAGCAGATGTTGACCCTAAGAACATGATGGCCGCTTCTGACTT
CCGAAACGGCCGCTACCTGACCTGCTCTGCCATCTTGTAAGTCCCGTCAATGAT
GTGCATACTATACGAGGTCATTATACTAATTTCCGTTCCAGCCGTGGCAAGGTT
GCTATGAAGGAGGTTGAGGACCAGATGCGTAACTGCAGAAC

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Düzce’de doğdu. İlkokulu Hamidiye İlkokulu’nda, Ortaokulu Kız Meslek Lisesi’nde ve liseyi Arsal Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 2004-2009 Eğitim-Öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2009 yılında bu bölümden Biyoloji Öğretmeni ünvanıyla mezun oldu. Mezun olduktan sonra Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.