

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***METARHIZIUM ANISOPLIAE*'DAN *MELOLONTHA MELOLONTHA* L.  
(COLEOPTERA: SCARABAEIDAE)'YA KARŞI MİKROBİYAL PESTİSİT  
GELİŞTİRİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hülya UZUNOĞLU**

**HAZİRAN 2020**

**TRABZON**



**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***METARHIZIUM ANISOPLIAE*'DAN *MELOLONTHA MELOLONTHA* L. (COLEOPTERA:  
SCARABAEIDAE)'YA KARŞI MİKROBİYAL PESTİSİT GELİŞTİRİLMESİ**

**Hülya UZUNOĞLU**

**ORCID : 0000 -0002 -2692 -3423**

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

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 11 / 05 /2020**

**Tezin Savunma Tarihi : 17 / 06 /2020**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. İsmail DEMİR  
ORCID : 0000 -0001 -6227 -0039**

**Trabzon 2020**

## ÖNSÖZ

"*Metarhizium anisopliae*'dan *Melolontha melolontha* L.(Coleoptera: Scarabidae)'ya Karşı Mikrobiyal Pestisit Geliştirilmesi" adlı bu Yüksek Lisans Tezi kapsamında, bir çok ülkede yayılış gösteren ve önemli bir zararlı olan *Melolontha melolontha* ve bu zararlının mikrobiyal mücadelesi üzerinde araştırmalar yapılmıştır.

Tez süresi boyunca danışmanlığımı üstlenerek, çalışmalarımın planlanması ve sonuçlandırılması hususunda ve desteğini esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. İsmail DEMİR'e, laboratuvarında maddi manevi imkanlarını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ'a ve KTÜ Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji grubu hocalarıma, çalışma sürecimde yardımını esirgemeyen hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ardahan ESKİ'ye, beraber çalıştığım laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim süresince çalışmalarına proje desteği veren KTÜ-BAP birimine teşekkür ediyorum.

Eğitimime başladığım ilk günden beri maddi ve manevi her koşulda yanımda olan, varlıkları ile bana güç veren sevgili aile üyelerim Ayşe, Ali Rıza, Metin UZUNOĞLU'na ve desteğini her zaman hissettiren yol arkadaşım sevgili Fatih KOLAYLI'ya tüm desteklerinden dolayı teşekkürü borç bilirim.

Hülya UZUNOĞLU

Trabzon 2020

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “*Metarhizium anisopliae*'dan *Melolontha melolontha* L. (Coleoptera: Scarabaeidae)'ya Karşı Mikrobiyal Pestisit Geliştirilmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. İsmail DEMİR'in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda 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. 17/06/2020

Hülya UZUNOĞLU

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	VII
SUMMARY .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	IX
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ .....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Tarım Zararlıları .....	2
1.3. Biyolojik Mücadele .....	4
1.4. Mikrobiyal Mücadele .....	6
1.5. <i>Melolontha melolontha</i> L.(Coleoptera:Scarabaeidae).....	8
1.5.1 Biyolojisi .....	8
1.5.2. Yaşam Döngüsü.....	8
1.5.3. Yayılışı ve Zarar Şekli.....	10
1.5.4. Mücadelesi.....	11
1.6. Entomopatojenik Funguslar (EPF) .....	12
1.6.1. <i>Metarhizium</i> .....	13
1.6.1.1. <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	13
1.6.1.2. Tarihçesi .....	14
1.6.1.3. Mikrobiyal Mücadelede Kullanımı .....	14
1.6.1.4. Hedef Dışı Organizmalara Etkisi.....	16
1.6.1.5. Etki Mekanizması .....	17
1.7. Formülasyon .....	18
1.8. Çalışmanın Amacı .....	21
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	22
2.1. Çalışmada Kullanılan Fungusun Seçimi.....	22

2.2.	<i>Metarhizium anisopliae</i> 'nin Büyütülmesi .....	22
2.3.	Başlangıç Kültürünün Hazırlanması.....	23
2.3.	Katı Hal Fermentasyonu.....	23
2.4.	Yağ Formülasyonunun Hazırlanması .....	24
2.5.	Deneylerde Kullanılacak Böceklerin Temin Edilmesi .....	25
2.6.	<i>Melolontha melolontha</i> için Saksı Deneyleri .....	25
2.7.	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> için Laboratuvar Deneyleri .....	26
2.7.	<i>Tenebrio molitor</i> için Laboratuvar Deneyleri.....	27
2.8.	İstatiksel Analiz .....	28
3.	BULGULAR .....	29
3.1.	Yağ Formülasyonu .....	29
3.2.	<i>Melolontha melolontha</i> Saksı Denemeleri .....	30
3.3.	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Laboratuvar Denemeleri .....	34
3.4.	<i>Tenebrio molitor</i> Laboratuvar Denemeleri.....	36
4.	TARTIŞMA.....	37
5.	SONUÇLAR.....	41
6.	ÖNERİLER .....	42
7.	KAYNAKLAR.....	43
	ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans Tezi

## ÖZET

*METARHIZIUM ANISOPLIAE*'DAN *MELOLONTHA MELOLONTHA* L.  
(COLEOPTERA: SCARABAEIDAE)'YA KARŞI MİKROBİYAL PESTİSİT  
GELİŞTİRİLMESİ

Hülya UZUNOĞLU

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. İsmail DEMİR  
2020, 49 Sayfa

*Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae) önemli tarımsal zararlı böceklerden biridir. Larvalar bitkilerin köklerinde zarar oluşturarak bitkinin kurumasına yol açar. Bu çalışmada; zararlının mücadelesinde kullanılmak üzere yağ bazlı mikoinsektisit geliştirildi. Çalışmada yerel bir izolat olan, *Metarhizium anisopliae* KTU-2 suşu kullanıldı. Sporlar bifazik kültür sisteminde büyütüldükten sonra yağ fazlı formülasyon hazırlandı. Hazırlanan formülasyon Triton X-100, Sodyum karbonat ve silikon içermektedir. Formülasyonun etkinlik denemeleri *Melolontha melolontha* üzerinde saksı denemeleri yaparak test edildi. Sonuçta en düşük dozda bile ( $10^5$  spor/ml) %80 mortaliteye sebep olduğu görüldü. Ayrıca Abbott formülü kullanılarak ortalama ölümcül konsantrasyon ( $LC_{50}$ ) değeri hesaplandı ve bu sonuçlara göre; *Melolontha melolontha* için  $LC_{50}$  değeri  $9,29 \times 10^3$  spor/ml olarak belirlendi. Bulgularımız *Metarhizium anisopliae* KTU-2'nin yağ bazlı formülasyonunun, *Melolontha melolontha* ile mücadelede kullanabilecek etkili bir entomopatojen olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Entomopatojenik fungus, *Metarhizium anisopliae*, *Melolontha melolontha*

Master Thesis

**SUMMARY**

DEVELOPMENT OF MICROBIAL PESTICIDES AGAINST *MELOLONTHA*  
*MELOLONTHA* L. (COLEOPTERA: SCARABAEIDAE) FROM *METARHIZIUM*  
*ANISOPLIAE*

Hülya UZUNOĞLU

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Graduate Program  
Supervisor: Prof. Dr. İsmail DEMİR  
2020, 49 Pages

*Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae) is one of the serious agricultural pests. Larvae cause damage to the roots of the plants, causing the plant to dry. In this study; oil-based mycoinsecticide has been developed to be used in the fight against pests, *Metarhizium anisopliae* KTU-2 strain, a local isolate, was used for mycoinsecticide development. After the spores were grown in the biphasic culture system, an oil phase formulation was prepared. The prepared formulation contains Triton X-100, Sodium carbonate and silicon. Efficacy trials of the formulation were tested by pot experiments on *Melolontha melolontha*. As a result, it was observed that even at the lowest dose ( $10^5$  spores / ml) it caused 80% mortality. In addition, the average lethal concentration ( $LC_{50}$ ) value was calculated using the Abott formula and determined as  $9.29 \times 10^3$  spores / ml for *Melolontha melolontha*. Our findings indicated that oil-based formulation of *Metarhizium anisopliae* KTU-2 can be used for management of *M. melolontha*.

**Key Words:** Entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae*, *Melolontha melolontha*



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1. Böceklerin bitki üzerinde zarar oluşturduğu kısımlar.....	4
Şekil 2. <i>Melolontha melolontha</i> ergini ve larvası.....	8
Şekil 3. <i>Melolontha melolontha</i> 'nın yaşam döngüsü.....	10
Şekil 4. Böcek kütikulasındaki fungal enfeksiyon basamakları.....	18
Şekil 5. Fungusun katı substrat üzerinde büyütülmesi.....	24
Şekil 6. Formülasyonun <i>Melolontha melolontha</i> üzerinde test edilmesi.....	26
Şekil 7. Formülasyonun <i>Leptinotarsa decemlineata</i> üzerinde test edilmesi.....	27
Şekil 8. Formülasyonun <i>Tenebrio molitor</i> üzerinde test edilmesi.....	27
Şekil 9. Hazırlanan yağ formülasyonu.....	29
Şekil 10. <i>Melolontha melolontha</i> larvalarına farklı konsantrasyonlarda yağ formülasyonu uygulanmasının 15. gün sonunda ölüm oranları.....	31
Şekil 11. Preperatın uygulanması sonucunda çilek fidelerinin hasar durumu.....	32
Şekil 12. Preperatın $1 \times 10^7$ , $1 \times 10^8$ ve $1 \times 10^9$ spor/ml konsantrasyon uygulamasında çilek fidelerinin durumu.....	33
Şekil 13. Saksı denemesi sonucunda mikozlanan larvalar .....	34
Şekil 14. Preperatın <i>Leptinotarsa decemlineata</i> larvaları üzerindeki etkisi.....	35
Şekil 15. Preperatın <i>Leptinotarsa decemlineata</i> erginleri üzerindeki etkisi.....	36

## TABLÖLAR DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1. <i>Metarhizium anisopliae</i> kaynaklı ticari ürünler.....	15
Tablo 2. Coleoptera takımına karşı kullanılan formülasyon çalışmaları.....	21
Tablo 3. <i>Melolontha melolontha</i> için letal konsantrasyon değerleri.....	30
Tablo 4. <i>Leptinotarsa decemlineata</i> için letal konsantrasyon değerleri.....	34

## KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

cm	: Santimetre
mm	:Milimetre
m <sup>2</sup>	: Metrekare
ml	:Mililitre
M.Ö.	:Milattan Önce
M.S.	: Milattan Sonra
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDA	:Patates Dekstroz Agar
SDA	:Sabouraud Dekstroz Agar
°C	: Santigrat Derece
UV	: Ultraviyole
UV-A	: Ultraviyole A
UV-B	: Ultrviyole B

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Giriş

Bitkiler, canlıların yaşamının devamlılığının sağlanmasında çok önemli bir etkiye sahiptir. Besin maddesi olarak kullanılmasının yanı sıra sanayi için ham madde, giyinme, sağlıklı bir yaşam alanının oluşması ve ekolojik dengenin korunması açısından hayati ve ekonomik etkileri vardır. Bitkilerin büyümesi sırasında biyotik ve abiyotik faktörler büyüme etkilemektedir. Abiyotik faktörler; yağış, sıcaklık, rüzgar, toprak yapısı, besin elementlerini içermektedir. Biyotik faktörler ise zararlı böcekler, yabancı otlar ve rekabet faktörlerini içerir. Zararlı böcekler özellikle tarım ürünlerinde zarar oluşturarak üretimdeki verimin azalmasına hatta bitkinin tamamen kurumasına yol açabilir.

Zararlılarla mücadelede kimyasal insektisitler yaygın olarak kullanılmaktadır. İnsektisitlerin yaygın kullanımı böceklerin adaptasyon göstererek bu insektisitlere direnç kazanmalarına sebep olmuştur. Kazanılan direnç daha fazla insektisit kullanımına yol açmaktadır. Bu da hedef olmayan türler üzerinde negatif etki ve çevresel kirlenme gibi ciddi ekolojik problemler ortaya çıkarmaktadır (Çakır ve Yamanel, 2005; Kence, 1988). Tüm bu sebeplerden çevreye ve doğadaki diğer canlılara zarar vermeyecek bir yöntem olan biyolojik mücadele ortaya çıkmıştır.

Biyolojik mücadele, bir zararlı organizmanın popülasyon yoğunluğunu veya etkisini zarar eşiğinin altına indirmek ve daha zararsız hale getirmek için başka organizmaların kullanılmasıdır (Eilenberg vd., 2001). Mikrobiyal mücadele ise biyolojik mücadele etmenleri olarak bakteri, fungus, protozoa, virüs ve nematod gibi mikroorganizmaların kullanılmasıdır (Eilenberg vd., 2001; Lacey ve Goettel., 1995; Demirbağ, 2008).

Böceklerle mücadelede mikrobiyal etmenlerin kullanımı 1800'li yıllarda fungusların kullanımıyla başlamıştır. Entomopatojenik fungusların böcekler tarafından yenilmeden kutikula üzerinden enfeksiyonu direk olarak başlatmaları, zararlılarla mücadelede fungusların kullanımı açısından büyük avantaj sağlamaktadır. Genel olarak, birçok böcek takımı fungal hastalıklara karşı duyarlıdır ve entomopatojenik funguslar zararlı böceklerle karşı mikrobiyal mücadele etmeni olarak iyi bir potansiyele sahiptir (Roberts, 1989).

Tarım, ülkemiz için çok önemli bir geçim kaynağıdır. Ülkemizde fındık, turunçgil, pamuk, tahıl üretim ve ihracat açısından önemli gruplardır. Ülkemizde 2017 yılı verilerine

göre 439.097 hektar alanda fındık üretimi yapıldı ve 675.000 ton ürün elde edildi (URL-1). Bu bilgiler fındığın Karadeniz Bölgesi için önemini vurgulamaktadır. Fındıktaki ürün kayıpları üreticileri çok yakından etkilemektedir. Fındıkta ürün kaybına sebep olan böcekler; *Obera linearis* L. (Coleoptera: Cerambycidae), *Curculio nucum* L. (Coleoptera: Curculioninae), *Agelastica alni* L. (Coleoptera: Chrysomelidae), *Palomena prasina* L. (Heteroptera: Pentatomidae) ve *Melolontha melolontha* L. (Coleoptera: Scarabaeidae) 'dır. Bu böceklerin çoğu yapraklarda ve sürgünlerde hasara sebep olur. Fakat, *Melolontha melolontha* L. fındık ağaçlarının kökünde zarar oluşturur ve oluşturduğu zarar ağaçların tamamen kurummasına kadar ilerleyebilir.

*Melolontha melolontha* L., fındık, çilek, meşe, kayın, kızılğaç, kiraz, erik gibi bir çok bitkide zarar oluşturmaktadır. Larvalar, bitkilerin köklerini yiyerek kurumalarına sebep olurken, erginler bitkinin yapraklarını yiyerek zarar oluşturur. Bitki üzerinde en çok hasarı kök bölgesinde oluşturur ve oluşturduğu zarar bitkinin tamamen kurummasına kadar ilerleyebilir. Oluşturduğu bu zarar göz önüne alındığında mücadelesi, ürün verimi açısından oldukça önemlidir. Zarar verdiği bitkiler ve dünyadaki yayılışına bakıldığında bir çok kıtada yayılış gösteren bir zararlıdır. *Melolontha melolontha* ile mücadelede ilk olarak kültürel ve kimyasal yöntemler kullanılmıştır. Kültürel önlem olarak, erginler yumurtalarını otlar üzerine bıraktığı için ot temizliğine özen gösterilmelidir. Fakat bu önlem zararlı popülasyonunu azaltmak için yeterli değildir. Zararlıının zarar şekli ve biyolojik unsurlar (ağız yapısı, yaşam döngüsünün çoğunu toprak altında geçirmesi vb.) dikkate alındığında biyolojik kontrol ajanı olarak entomopatojenik fungusların kullanımı avantaj sağlamaktadır.

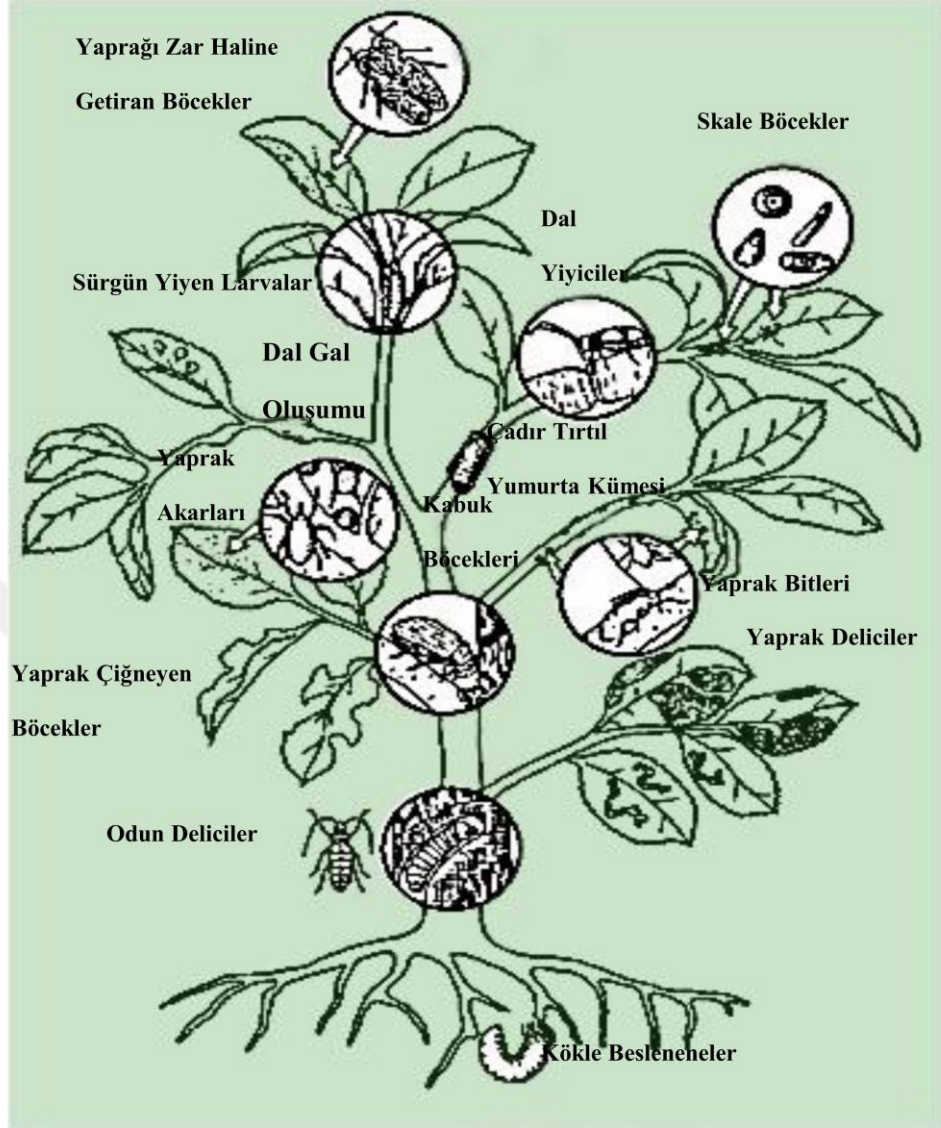
## 1.2. Tarım Zararlıları

Ülkemizin konumu ve iklimi sebebiyle tarım ülkemizde oldukça gelişmiştir. Ülkemizin her bölgesinde farklı ürünler yetiştirilmekte ve bu ürünler halkın geçim kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, tarım ürünlerinde ürün kaybına sebep olan, biyotik ve abiyotik faktörlerin etkisinin en düşük seviyede tutulması oldukça önemlidir. Bu biyotik faktörlerden biri olan böcekler, bitkilerin farklı bölgelerinde zarar oluşturmaktadır. Tarımda zarar oluşturan böceklerden bazıları köklerde hasara sebep olarak bitkinin tamamen kurummasına sebep olurken, bazı böceklerde yapraklarda ya da dallarda hasara sebep olur (Şekil 1). Tarım ve hayvancılık devlet tarafından da teşvik sağlanan önemli bir

kaynaktır. Ülkemizde fındık, buğday, antep fıstığı, üzüm, kayısı, zeytin gibi bir çok ürün ihracatı yapılan ürünler arasındadır. Bu ürünler, o bölgede yaşayan halk için önemli bir geçim kaynağı haline gelmiştir. Tarım Bakanlığının 2018 yılı verilerine göre; fındık ve fındık ürünleri ihracatı 5.356,76 ton ile yaklaşık 40.000.000 \$ kazanç sağlayarak ihracatı yapılan ürünler arasında 4. sırada yer almaktadır (URL-2). Ülkemizde, Karadeniz bölgesi fındık üretiminin büyük çoğunluğunu karşılamaktadır. Bu yüzden bölge halkı için fındık çok önemli bir geçim kaynağı haline gelmiştir.

Tarım alanlarındaki verimi arttırmak için zararlılarla mücadele yöntemi olarak pestisitler çok uzun yıllardır kullanılmaktadır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) pestisitleri; "insan veya hayvanlarda oluşabilecek hastalıkları taşıyıcı; gıdaların, tarımsal ürünlerin, hayvan yemlerinin, üretimi, işlenmesi, depolanması sırasında, bu aşamaları olumsuz etkileyecek her türlü zararlının önlenmesi amacıyla kullanılan maddelerdir" diye tanımlamaktadır. Tarımda pestisitlerin kullanımı sadece kullanılan bölgeyi değil, rüzgar ve yağmur gibi hava koşullarıyla diğer bölgelere taşınmakta, hava, su ve toprak kirliliğine yol açmaktadır. Ayrıca pestisitler hedef dışı organizmalar üzerinde de toksisite gösterebilir. Pestisitlerin ekosistem yapısında ve türlerin sayısındaki etkisi, insan üzerinde toksisite oluşturması, çevre üzerindeki olumsuz etkisi ve böceklerin bağışıklık kazanması gibi dezavantajları göz önüne alındığında biyolojik mücadelenin önemi ortaya çıkmaktadır.

Dünyada zararlıların neden olduğu ürün kaybı yaklaşık %35 olarak bilinmektedir. Bu kaybın yaklaşık %14'ü böcek ve akarlardan, %11'inin bitki patojenlerinden, %9'unun yabani otlardan, %1'inin ise kuşlardan kaynaklandığı belirtilmektedir.



Şekil 1. Böceklerin bitki üzerinde zarar oluşturduğu kısımlar (URL-3)

### 1.3. Biyolojik Mücadele

"Biyolojik mücadele" terimini ilk olarak Hary SMITH böcek popülasyonlarının doğal veya çeşitli uygulamalar kullanılarak kontrol altına alınması olarak tanımlamıştır. Biyolojik mücadele; zararlı böcek popülasyonlarını dolayısıyla böceklerin zararlarını azaltmak için canlı organizmalardan (mikroorganizmalar, predatörler, parazitoid böcekler, omurgasızlar, omurgalılar, feromonlar, böcek büyüme düzenleyicileri, bitkisel maddeler ve genetik kontroller) faydalanılarak yapılan ekonomik, güvenilir ve başarılı bir yöntem olarak tanımlanır (Demirbağ, 2008).

Türkiye'de biyolojik mücadele ilk olarak 1912 yılında *Icerya purchasi* (Hemiptera: Margarodidae) ile mücadele etmek için *Rodolia cardinalis* (Coleoptera: Coccinellidae) kullanılmasıyla başlamıştır. Aynı yıllarda *Eriosoma lanigerum* (Hemiptera: Pemphigidae)'a karşı *Aphelinus mali* (Hymenoptera: Aphelinida) kullanılmıştır. Daha sonra Almanya'dan İzmir'e *Bracon herbetor* (Hymenoptera: Braconidae) getirilmiş ve *Ephestia cautella* (Lepidoptera: Pyralidae)'ya karşı kullanılmıştır. Biyolojik mücadelenin önem kazanmasıyla birlikte 1965 yılında Antalya'da "Biyolojik Mücadele İstasyonu" kurulmuştur. Bu istasyonda yapılan ilk çalışmalardan biri turunçgil bahçelerinde kullanılmak üzere ABD'den *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae) ve *Leptomastix dactylopii* (Hymenoptera: Encyrtidae) getirilmiş ve üretimi yapılarak zararlının görüldüğü bölgelerde biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılmıştır. Daha sonra 1987 yılında Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü bünyesinde "Biyolojik Mücadele" bölümleri açılmıştır. Biyolojik mücadele desteklemesinin ilk olarak başladığı 2010 yılından sonra, 2011 ve 2012 yıllarında destekleme bütçesi artmış ve daha geniş alanı kapsayacak şekilde geliştirilmiştir. Domates güvesi (*Tuta absoluta*) 2010 yılında ülkemizde çok önemli bir zararlı haline gelmeye başlamış ve biyolojik mücadelesinde kullanılmak üzere özel sektöre kitlesel faydalı böcek üretimi yapılması için destek verilmiştir. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın 2012 yılında yaptığı beş yıllık stratejik planında ilk kez biyolojik mücadele yer bulmuş ve 2023 hedefi olarak zirai mücadele faaliyetlerinin %25'i biyolojik mücadele olarak yapılması hedeflenmiştir. Ülkemizde orman ekosistemlerini korumak amacıyla Orman Bölge Müdürlükleri bünyesinde "Biyolojik Mücadele Laboratuvarları" kurulmuş ve bu laboratuvarlarda üretim ve araştırma çalışmaları yapılmaktadır.

Günümüzde zararlı böceklerin oluşturduğu zararı doğal ekosisteme zarar vermeden en aza indirmek amacıyla kullanılan biyolojik mücadele materyalleri; parazitoid, predatör, feromon, bitkisel insektisitler ve mikroorganizmalardır.

Parazitoid ve Predatörler: Parazit, bir canlıya bağlı olarak yaşamını devam ettiren ve üzerinde yaşadığı konukçunun gelişimini engelleyen organizmalardır. Parazit konağın ölümüne yol açarsa parazitoid olarak adlandırılır. Bu doğal düşmanlar hareketli organizma (kuş, karınca vb. gibi) olduğunda ise predatör adını alır. Biyolojik mücadelede predatör ve parazitoidler ülkeler arası nakil ve büyük ölçekli üretilmesiyle sağlanabilir. Türkiye'de predatör ve parazitoid nakli ilk olarak 1910 yılında *Icerya purchasi* Mask. (Hom.:Margarodidae)'ye karşı *Rodolia cordinalis* getirilmesiyle başlanmıştır. Daha sonra



*Parabemisia myricae* K. (Hemiptera: Aleyrodidae)'ye karşı predatör olarak *Eretmocerus debachi* kullanılmıştır. Günümüzde bu iki zararlının mücadelesinde predatörlerin kullanımını devam ettirmektedir.

**Feromonlar:** Feromonlar, böcekler tarafından salgılanıp başka bir böcekte özel reaksiyonların gelişmesine sebep olan bileşiklerdir. Ayrıca feromonlar böceklerin yakalanmasının yanı sıra eşey, iz, toplanma ve alarm olarak bir çok farklı görevleri yerine getirirler.

**Bitkisel İnsektisitler:** Bitkilerden çeşitli yöntemler kullanılarak elde edilen ve insektisit özelliği gösteren bileşiklerdir. Sentetik pestisitlere göre daha ekonomiktir. Pyrethrin, rotenone, nicotine, ryania, sabadilla gibi bir çok bitkisel insektisit bulunur.

**Mikroorganizmalar:** Zararlı böceklerle mücadelede funguslar, virüsler, nematodlar, bakteriler kullanılması "Mikrobiyal Mücadele" olarak adlandırılır.

#### **1.4. Mikrobiyal Mücadele**

Entomopatojen virüsler, nematodlar, bakteriler ve funguslar önemli biyolojik mücadele etmenleridir. Bu etmenlerinin hepsi patojenik olup, konağın ölümüne sebep olurlar ve bunların çoğu belirli böcek cinslerine veya familyalarına özgüdür. Mikrobiyal insektisitlerin avantajı; hedef zararlının popülasyon yoğunluğunu kontrol altına almasının yanı sıra, kullanımının çevre ve diğer canlılar açısından güvenli olmasıdır.

Virüslerin mikrobiyal mücadele etmeni olarak kullanılmasının en büyük avantajları dar konak spektrumuna sahip olması ve insan sağlığı üzerinde olumsuz etkisinin olmamasıdır. Virüsler böceklerin larva ve pupa döneminde enfeksiyon oluşturmaktadır. Böcek virüslerinin Lepidoptera, Coleoptera, Orthoptera ve Diptera takımlarındaki zararlılardan izole edilmeleri mikrobiyal mücadele için virüsleri önemli kılmaktadır (Demirbağ, 2008). *Entomopoxvirinae*, *Baculoviridae*, *İridoviridae*, *Reoviridae* böceklerde enfeksiyon oluşturan familyalardır. Virüslerin dezavantajı ise; sindirim yoluyla enfeksiyon oluşturdıkları için böcek tarafından yenilmesi gerekmektedir. Bu da mücadele edilecek böceklerde sınırlandırma oluşturmaktadır.

Böceklerde enfeksiyon oluşturan bakteriler *Bacillaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Entorobacteriaceae*, *Streptococcaceae* ve *Micrococcaceae* familyalarına ait türlerdir. Bu familyalardan *Bacillaceae* familyasına ait *Bacillus thuringiensis* Berliner türü yüksek

insektisidal aktivite göstermektedir. *Bacillus thuringiensis* Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera takımı üzerinde etkilidir.

Mikrobiyal mücadelede kullanılan nematodlar *Heterorhabditidae*, *Mermithidae*, *Neotylenchidae*, *Allantonematidae*, *Rhabditidae*, *Sternernematidae* familyalarıdır. Nematodlar konaklarını kısa sürede enfekte edebilirler. Fakat sıcaklık, kuraklık ve UV gibi çevresel koşullardan etkilenirler.

Funguslar diğer mikrobiyal mücadele yöntemlerine göre daha geniş konak spektrumuna sahiptir ve diğer etmenlere göre uygulanabilirlikleri daha kolaydır.

Genel bir değerlendirmede mikrobiyal mücadelenin avantajları oldukça fazladır. Bu avantajlar kısaca aşağıdaki gibi sıralanabilir:

1. Zararlı organizmaya özgüdür.
2. Böceklerde direnç oluşumu gözlenmemiştir.
3. Uzun süreli kalıcılık ve koruma sağlar.
4. Hasat öncesi uygulama aralığına ihtiyaç duymaz.
5. Çevre kirliliği oluşturmaz.
6. Formüle edilmiş uygulamalar ile raf ömrü uzatılabilir.
7. Uygulama için özel ekipmanlara ihtiyaç duymaz.
8. Genetik modifikasyonlara uygundur.

Bu avantajların yanı sıra mikrobiyal mücadele bazı dezavantajlara da sahiptir;

1. Spesifik olması daha az böcek üzerinde etkili olmasını sağlar.
2. Formüle edilmezse raf ömrü kısadır.
3. UV ve diğer çevresel etkenlere karşı duyarlıdır.
4. Erken evrelerde öldürücü etkiye sahip olması için uygulama zamanının çok iyi hesaplanması gerekmektedir.
5. Kimyasal pestisitlere göre daha yavaş ölüm görülür.
6. Üretim maliyeti yüksek olabilir.

## 1.5. *Melolontha melolontha* L.(Coleoptera:Scarabaeidae)

### 1.5.1. Biyolojisi

*Melolontha melolontha* erginleri kızılımsı kahverengi, 25-30 mm boyundadır (Şekil 2). Toraks parlak siyah ve üzerinde sarı-gri sık tüylerle kaplıdır. Elitranın üzerinde birbirine paralel uzanıp birleşen çizgi çıkıntılar vardır. Elitra abdomeni tamamen örtmez. Son üç karın halkası açıkta kalır. Dişilerin anteni küçük; erkeklerinki ise büyük ve yelpaze şeklindedir. Nisan- Mayıs aylarında görülür ve akşamları aktif olarak uçarlar. Ergin böcekler meyve bahçelerinde, ormanlarda ağaçların yapraklarıyla beslenir. Dişiler, 10-15 gün beslendikten sonra yumurtlamak için yeterli olgunluğa ulaştığında tarla ya da çayırılık bölgelerde toprağın 15-25 cm derinliğine yumurtalarını toplu olarak bırakır. Yumurtaların boyutu 2×3 mm'dir. Yumurtalar, 4-6 hafta sonra açılır. Yumurtaların gelişimi için uygun sıcaklık 18°C'dir. Larvalar büyük, beyaz, kavisli yapı, güçlü çene ve uzun,tüylü, iyi gelişmiş bacaklara sahiptir. Larvaların gelişimi 3-4 yıl sürer. Larvalar soğuk havalarda ilk görüldüğü dönemlerde toprağın derinliklerine iner ve havaların ısınmasıyla toprak yüzeyine yaklaşarak orada bulunan köklerle beslenir. Larvaların gelişimi 3 evrede gerçekleşir. Larvalar ilk sonbaharda 10-20 mm, ikinci sonbaharda 30-35 mm ve üçüncü yılın ilkbaharında ulaşabileceği en fazla büyüklük olan 40-46 mm'ye ulaşır.



Şekil 2. *Melolontha melolontha* ergini ve larvası (URL-4)

### 1.5.2. Yaşam Döngüsü

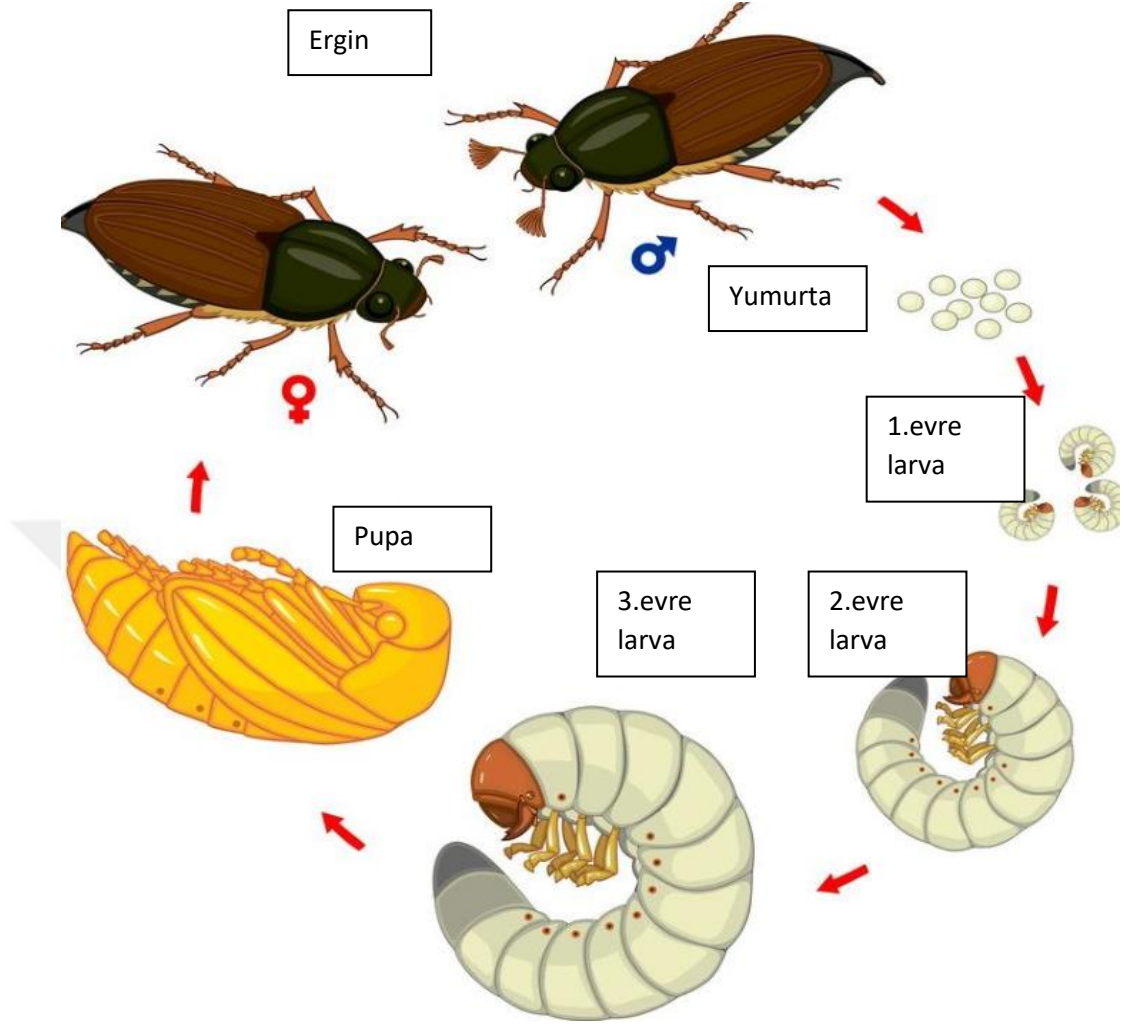
*Melolontha melolontha* yaşam döngüsünü 4 yılda tamamlamaktadır (Şekil 3).

1.yıl: *Melolontha melolontha* erginleri, Nisan-Mayıs aylarında ilk uçuşlarını ormanlık alanlara doğru yapar ve 2-3 hafta beslendikten sonra yumurtlama olgunluğuna ulaşan dişiler ikinci uçuşlarını otlak alanlara doğru gerçekleştirir. Dişiler yumurtaları toprağa bırakır. Toprak sıcaklığına bağlı olarak yumurtaların açılma süresi değişir. Ancak, genel olarak 6 hafta sonra yumurtalar açılır ve 1. evre larvalar toprakta gelişir. Ağustos-Eylül aylarında 2. evreye geçen larvalar toprağın derinliklerine doğru inmeye başlar.

2.yıl: Nisan ayında toprak yüzeyine doğru çıkan larvalar bitkilerin kökleriyle beslenmeye devam eder ve Haziran ayında 3. evreye geçiş yapar. Bitkilerde en çok zarar oluşturan dönem bu evredir. Kış aylarını 3. evrede geçirir.

3.yıl: Nisan ayında 3. evre larvalar zarar oluşturmaya devam eder. Ancak, 2. yılda oluşturduğu zararla kıyasla 3. yılında daha az zarar oluşturur. Haziran ayında pupa evresine geçer. Pupada 2 ay kaldıktan sonra Ağustos ayında ergin hale gelir. Erginler toprak altında kalmaya devam eder.

4.yıl: Toprak sıcaklığı 10-11°C'yi bulduğunda erginler toprağı terk eder. İklim koşullarına bağlı olarak böceğin biyolojisi etkilenebilir. Uçuş sırasında yağmurlu ve soğuk havalarda böceğin ömrünü kısaltabilir. Ayrıca 1. evre larvalar aşırı sıcaktan ve kuraklıktan olumsuz etkilenir.



Şekil 3. *Melolontha melolontha*'nın yaşam döngüsü (URL-5)

### 1.5.3. Yayılışı ve Zarar Şekli

Önemli bir tarım zararlısı olan *Melolontha melolontha*; Türkiye, Almanya, Polonya, Avusturya, İsveç gibi bir çok ülkede yayılış göstermektedir. Ülkemizde de Antalya, Artvin, Bolu, Eskişehir, Erzincan, Giresun, İstanbul, Isparta, Ordu, Sakarya, Sinop ve Trabzon'da zarar oluşturmaktadır.

Fındık başta olmak üzere meşe, çınar, akçağaç, gürgen, kayın, söğüt, kavak, huş ağacı gibi orman ağaçlarında ve çilek, kırmızı pancar, patates, marul, ahududu, erik, kiraz, kestane gibi ağaçlarda zarar oluşturmaktadır. Yetişkinleri sadece yapraklarda zarar oluşturur. Fakat larvalar ağaçların kökleriyle beslenerek ciddi zarar oluşturur. Özellikle 2. ve 3. evre larvalar en yüksek zararın olduğu dönemdir.

#### 1.5.4. Mücadelesi

Mücadelesinde kültürel önlemler, kimyasal kullanımı, mikrobiyal mücadele gibi bir çok yöntem kullanılmaktadır. Ülkemizde en yaygın olarak kullanılan mücadele çeşidi ise kimyasal mücadeledir. İlaçlamaya karar verilirken toprak 25 cm derinlikte kazılır ve 1 m<sup>2</sup> alanda larva sayımı yapılır. 1 m<sup>2</sup> alandaki larva sayısı 3'den fazla olduğunda kimyasal mücadelenin yapılmasına karar verilir. Kimyasal mücadelesi ilkbaharda toprak sıcaklığı 9-10°C'ye ulaştığında ve larvalar 2. evredeyken yapılmalıdır. İlaçlama yapıldıktan sonra toprak işlenerek toprağın altına inmesi sağlanmaktadır. Ayrıca zararlının doğal düşmanları incelenmiş fakat ülkemizde doğal düşmanlarına ait bilgi bulunmamaktadır. Zararlı ile mücadelede kültürel önlemler olarak ise, zifin çiçeği ve fındık bahçelerinde hayvan gübrelerinin bekletilmemesi gerektiği görülmüştür. Zifin çiçeği olan bölgelerde zifin çiçeği üzerinde toplandığı ve zarar miktarının azaldığı görülmüştür.

Entomopatojenik nematodlar: *M. melolontha*'nın larvalarına karşı 2001 yılında *Heterorhabditis bacteriophora*, *H.megidis*, *H.marelatus*, *Steinernema arenaria*, *S.feltiae*, *S.glaseri* türleri üzerinde çalışmaları yapılmış ve en etkili türün %60 ölüm oranıyla *Steinernema glaseri* olduğu görülmüştür (Berner ve Schnetter, 2001). Daha sonra ülkemizde yapılan çalışmada; *Heterorhabditis bacteriophora* ve *Steinernema feltiae* topraktan izole edilmiş ve *Melolontha melolontha* üzerinde saksı denemeleri yapılarak 3.evre larvalarda %100 ölüm görülmüştür (Erbaş vd.,2014).

Entomopatojenik virüsler: İlk olarak bulunan viral patojeni *Melolontha melolontha* *Entomopoxvirus(MmEPV)* olarak tanımlandı (Sezen ve Demirbağ, 2007a). Bu çalışmada farklı konsantrasyonların insektisidal aktivitesi incelenmiş ve 7,5×10<sup>6</sup> sferoid/ml kullanıldığında %96,3, 1,5×10<sup>4</sup> sferoid/ml konsantrasyonda %80, 1×10<sup>2</sup> sferoid/ml konsantrasyonda ise %36,6 ölüm oranı gözlemlenmiştir.

Entomopatojenik bakteriler: *Melolontha melolontha* popülasyonlarından bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiş ve izolatlar *Pseudomonas* sp., *Bacillus thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. weihenstephanensis*, *Enterobacter* sp. ve *Acinetobacter* sp. olarak tanımlanmıştır. Bu izolatların insektisidal aktivitesi incelendiğinde en yüksek öldürücü etki %80 oranla *Bacillus thuringiensis*'te görülmüştür. *B. sphaericus*'un insektisidal aktivitesi ise, %60 olarak görülmüştür (Sezen vd., 2007b).

Entomopatojenik funguslar: Zararlı ile mücadelede kullanılan ilk fungus 1924 yılında *Beauveria brongniartii* olmuştur (Benker ve Leuprecht 2004). Zararlı ile mücadelede kullanılan çeşitli entomopatojenik fungus izolatları mevcuttur. Fakat bu çalışmalar incelendiğinde yüksek insekitisidal aktiviteye sahip izolatlar oldukça sınırlıdır. Ayrıca ülkemizde ve dünyada bu zararlı ile mücadelede kullanılan etkin bir biyopreperat bilgisine rastlanılmamıştır.

### 1.6. Entomopatojenik Funguslar (EPF)

Entomopatojenik funguslar böcek popülasyonlarının kontrol altına alınmasında önemli rol oynar. Entomopatojenik funguslara ait ilk kayıt M.S. 900'lü yıllarda Japonya'da ipek böceklerinde gözlemlenmiş ve 1834 yılında Augustino Bassi tarafından hastalığa sebep olduğu kanıtlanmıştır (Steinhaus, 1956; Lord, 2007).

Entomopatojenik funguslar sınıflandırılırken ilk olarak morfolojik özellikleri ve yaşam döngüleri göz önüne alınır. Daha sonra DNA analizleri yapılarak detaylı çalışmalar yapılır. Böceklerde enfeksiyona neden olduğu bilinen 700 ile 1000 arasında entomopatojenik fungus bulunmaktadır (Goettel, 2010). Entomopatojenik özellik gösteren funguslar Zygomycota ve Ascomycota'ya aittir. Bunların yaklaşık %80' i *Metarhizium* ve *Beauveria* cinslerine aittir (Faria ve Wraight, 2007).

Entomopatojenik fungusların mikrobiyal mücadele etmeni olarak kullanılmasının avantajları ve dezavantajları vardır. Yüksek konak seçiciliği olması, memeliler üzerinde toksisite oluşturmaması, uzun süre kalıcılık sağlaması, biyoteknolojik çalışmalar için geliştirilmeye uygun olması avantajları arasında yer almaktadır. Ayrıca, alan uygulamalarında enfekte olmuş böceklerin diğer sağlıklı böceklere bulaştırarak enfeksiyona sebep olması da büyük avantaj sağlamaktadır. Bunların yanı sıra etkisini göstermesi kimyasal kullanımına göre uzun sürmesi, sporların çoğalıp enfeksiyon oluşturmak için neme ihtiyaç duyması ve saklanma koşullarının zorluğu dezavantajları arasındadır.

Entomopatojenik funguslar mikrobiyal mücadelede kullanılırken etkinliğinin artması ve hayatta kalma şansının artması için neme ihtiyaç duyar. Funguslarda formülasyon kullanılmasının en büyük avantajı; fungus, çoğalmak ve enfeksiyon oluşturmak için neme ihtiyaç duyar. Neme ihtiyaç duyması, kurak bölgelerdeki zararlılar için kısıtlayıcı olmuştur. Fakat formülasyon kullanımı ile fungusun bu kısıtlayıcılığı ortadan kaldırılmış

ve kurak bölgelerdeki zararlı böceklerde de enfeksiyon oluşturduğu görülmüştür (Neethling ve Dent, 1998).

Fungusların kullanımında bir diğer önemli faktör de Ultraviyole (UV) ışınlarıdır. Yapılan çalışmalar sonucunda UV-B (280-320 nm) ve UV-A'nın (320-400 nm) *Metarhizium anisopliae*'nin gelişiminde olumsuz etkisinin bulunduğu görülmüştür (Zimmermann 1982; Ignoffo ve Garcia 1992; Moore vd., 1993, 1996; Hunt vd., 1994; Fargues vd., 1996; Alves vd., 1998; Shah vd., 1998; Braga vd., 2001a,b,c; Rangel vd., 2004). *Metarhizium*'un türleri arasında UV-B için direnç farklılıkları görülmüştür. En dayaklı tür *Metarhizium flavovirid*, daha sonra *Metarhizium anisopliae* olduğu görülmüştür (Braga vd., 2001b,c; Fargues vd., 1996). UV toleransının sağlanmasında önemli faktörlerden biri de fungus sporlarının büyütüldüğü substratlardır. Besin olarak PDA ve pirinç kullanılan *Metarhizium anisopliae* sporları kıyaslanmış ve PDA kullanılan sporların daha hassas, pirinç kullanılan sporların ise daha dayanıklı olduğu görülmüştür (Rangel vd., 2004).

### 1.6.1. *Metarhizium*

*Metarhizium* dünya çapında bir çok zararlı böceğe karşı kullanılan Ascomycota sınıfına ait fungusdur (Goettel vd., 2005). Yaklaşık 64,000 türün bulunduğu bu sınıf en geniş sınıftır (Kirk vd., 2008). *Metarhizium* cinsine ait funguslar, tarımda zarar oluşturan bir çok zararlı böceğe karşı biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılmış ve yapılan çalışmalar sonucunda etkili bir entomopatojen grubu olduğu görülmüştür. Böcek konakçı aralıkları türlere göre değişiklik göstermektedir. Örneğin; *Metarhizium robertsii* geniş bir konak aralığına sahipken bu aralık *Metarhizium acridum* için Orthoptera grubu ile sınırlıdır.

#### 1.6.1.1. *Metarhizium anisopliae*

*Metarhizium anisopliae* zararlı böceklerle karşı kullanılan etkili entomopatojenik funguslardan biridir. Bu tür Coleoptera, Orthoptera, Diptera, Lepidoptera ve Hemiptera gruplarına ait 200'den fazla böcekte enfeksiyon oluşturduğu görülmüştür. Bu konukçularının çoğu Coleoptera'ya ait Curculionidae, Elateridae ve Scarabaeidae



familyalarına aittir. *Metarhizium anisoplae*; Asya, Avrupa, Kuzey Amerika, Güney Amerika ve Avusturalya gibi dünyada bir çok kıtada geniş yayılış göstermektedir.

### 1.6.1.2. Tarihçesi

*Metarhizium anisopliae* ilk olarak *Entomophthora anisopliae* olarak adlandırıldı ve 1879'da Elie Metchnikoff tarafından *Anisoplia austriaca* (Herbst)'e (Coleoptera: Scarabaeidae) karşı mikrobiyal mücadele etmeni olarak kullanıldı. Daha sonra 1883'te *Metarhizium anisopliae* olarak isimlendirilmiştir. Elie Metchnikoff tarafından 1880 ve 1890 yılları arasında çeşitli böcekler üzerinde biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılmıştır. Daha sonra 1926 ve 1929 yılları arasında *Bombyx mori* ve *Ostrinia nubilalis* üzerinde patojen olduğu görülmüştür (Steinhaus, 1949). Ayrıca 1965 yılında *Scotinophara lurida*, *Aeneolamia flavilatera*, *Agriotes obscurus* ve *A. sputator*, *Cleonus punctiventris*, *Popillia japonica*, *Alissonotum impressicolle*, *Agrotis segetum* and *Euxoa* spp. üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Müller-Kogler 1695). Daha sonra yapılan bazı çalışmalar sonucunda *Metarhizium brunneum*'a ait bazı suşların *Metarhizium anisopliae* türüne ait olduğu görülmüştür (Bischoff vd., 2009). Böceklerde enfeksiyon oluşturması kolayca tespit edilebilir. Enfekte olmuş konak yoğun olarak yeşil muskardin hastalığına sebep olan yeşil konidialarla kaplanır.

### 1.6.1.3. Mikrobiyal Mücadelede Kullanımı

*Metarhizium anisoplae* geniş konak aralığına sahip bir entomopatojendir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar sonucunda; 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, 2007). Günümüzde *Metarhizium anisoplae* kaynaklı, bir çok zararlı böcek grubunda etkili olan ticari ürünler geliştirilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. *Metarhizium anisopliae* kaynaklı ticari ürünler

Ticari isim	Şirket	Ülke
BioBlast	EcoScience	ABD
Bio-Cane Granules	Becker-Underwood	Avusturalya
Bio-Catch-M	Stanes	Hindistan
Bio-Green Granules	Becker-Underwood	Avusturalya
Bio-Magic	Stanes	Hindistan
BioPath	EcoScience	ABD
Cobican	Probioagro	Venezuela
Gran Met-P	Kwizda/Agrifutur	Avusturya/ İtalya
Green Guard SC	Becker-Underwood	Avusturya
Green Guard ULV	Becker-Underwood	Avusturya
Green Muscle	CABI Bioscience/NPP	İngiltere/ Fransa
Metaquino	-	Brezilya
Metarhizium Schweizer	Lbu	İsviçre
Metathripol	ICIPE	Kenya
Muchwatox (proposed)	ICIPE	Kenya
Pacer	SOM Phytopharma	Hindistan
Taenure Granular Bioinsecticide	Novozymes Biologicals	ABD
TAE-001 Technical Bioinsecticide	Novozymes Biologicals	ABD
Tick-Ex EC	Novozymes Biologicals	ABD
Tick-Ex G	Novozymes Biologicals	ABD

(Butt vd. 2001; Wraight vd. 2001; Copping 2004; Kabaluk ve Gazdik 2005).

*Metarhizium anisopliae*'nin biyolojik mücadele etmeni olarak etkin bir şekilde kullanılması için çeşitli formülasyon çeşitlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Formülasyon kullanılmasının amacı; entomopatojenin depolama, üretim ve kullanımı sırasında stabilitesini sağlamak, hedef organizmaya en uygun ve kolayca ulaşmasını sağlamak, kullanılan organizmanın çevresel koşullardan etkilenmemesini sağlayarak kalıcılığını arttırmak ve organizmanın aktivitesini arttırarak hedeflenen böcek ile etkileşiminin artmasını sağlamaktır.

*Metarhizium* için en uygun formülasyon çeşitleri yağ formülasyonu, granül formülasyonu ve toz formülasyondur. Yağ formülasyonu hidrofobik yüzeylerde daha iyi yapışma ve UV'den koruma sağlar. Ayrıca nemin düşük olduğu yerlerde minimum nem de fungusun çoğalmasını sağlar. Granül formülasyonunda fungus, katı substratı besin olarak kullanır ve kısa sürede çoğalır.

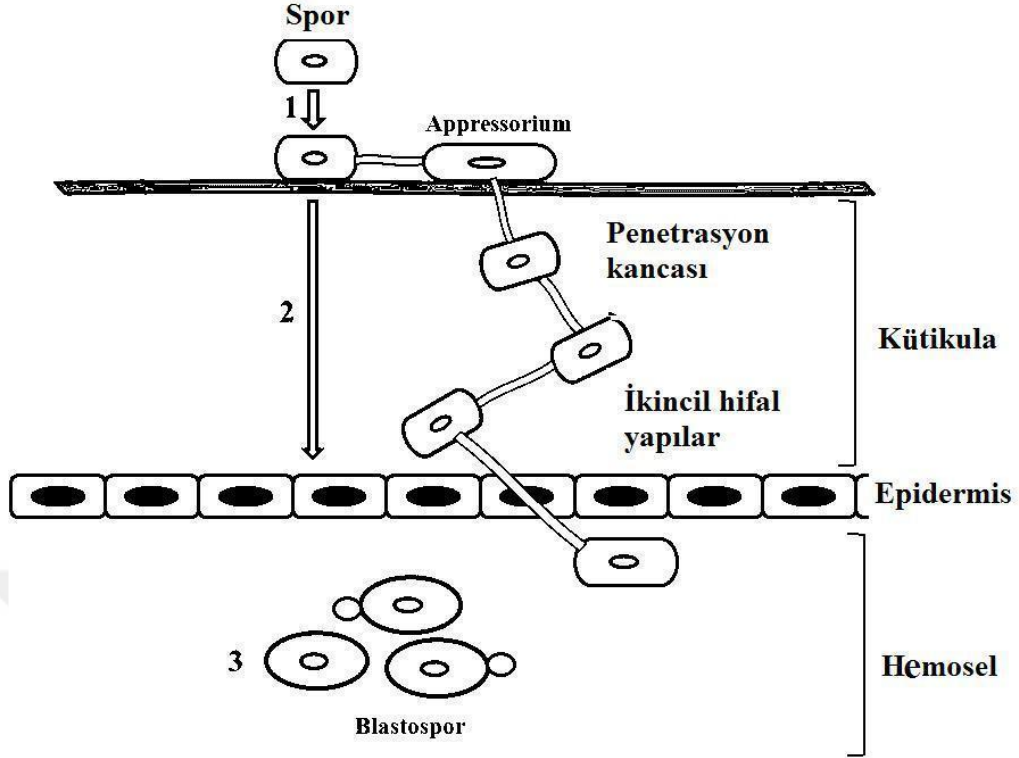
#### 1.6.1.4. Hedef Dışı Organizmalara Etkisi

Mikrobiyal mücadele etmeni olarak kullanılan *Metarhizium anisopliae*'nin hedef olmayan diğer canlılar ve bitkiler üzerindeki etkisinin incelenmesi için bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar kapsamında *Metarhizium anisopliae*'nin hedef organizma dışında etkinliğinin olmadığı görülmüştür. Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda *Metarhizium anisopliae*'nin bitkilerin köklerinde veya yapraklarında fitotoksik bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. *Metarhizium anisopliae*'nin topraktaki mikroorganizmalar üzerindeki etkisini izlemek amacıyla *Folsomia fimetaria*, *Hypogastrura assimilis* ve *Proisotoma minuta* üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar kapsamında  $1 \times 10^8$  spor/ml ve  $1 \times 10^7$  spor/ml konsantrasyonlarla ergin mikroorganizmalar muamele edilmiştir. Sonuçta kontrolde %17 ölüm görülmesine karşılık deney grubunda %45 ölüm görülmüştür (Dromph ve Vestergaard 2002). *Apis mellifera* üzerinde alan denemeleri yapılmış ve yetişkin arılarda olumsuz etkisi gözlenmemiştir (Kanga vd. 2003). *Bombus terrestris* üzerinde yapılan alan ve laboratuvar denemeleri sonucunda arılara yapılan direk uygulamaların enfeksiyon oluşturduğu görülmüştür. Fakat yapılan çalışmada toprağa yapılan uygulamaların arılar için risk oluşturmadığı görülmüştür (Hokkanen vd. 2003). *Lumbricus terrestris* üzerinde granül formülasyonu denenmiş ve olumsuz etki gözlenmemiştir (Hozzank vd. 2003). *Hippodamia convergens*, *Acheta domesticus* ve *Oncopeltus fasciatus* ile ilgili yapılan çalışmalarda ise; *Hippodamia convergens* ve *Acheta domesticu* üzerinde yüksek öldürücü etkisi olduğu, *Oncopeltus fasciatus* üzerinde ise düşük ölüm etkisi gözlenmiştir (Ginsberg vd. 2002). *Metarhizium anisopliae*'nin kurbağalar üzerindeki etkisine *Rana pipiens* üzerinde bakılmış ve toksik bir etkisi olmadığı gözlenmiştir (Donovan-Peluso vd. 1980). Farelerde yapılan ilk toksisite çalışmalarında, *Metarhizium anisopliae*'nin herhangi bir alerjik reaksiyona sebep olmadığı gözlenmiştir (Shaddock vd., 1982; El-Kadi vd., 1983).

*Metarhizium anisopliae*'nin insanlarda bazı alerjenik kayıtları da bulunmaktadır. İlk olarak *Metarhizium anisopliae*'nin dermal hiperalerjiye sebep olduğu kayıtlara geçmiştir (Goettel vd. 2001). Daha sonra, Brezilya'da şeker kamışı zararlılarının biyolojik kontrolünde *Metarhizium anisopliae*'nin yaygın olarak kullanımı sonucunda astım semptomları görülen birkaç kişi tespit edilmiştir (Barbieri vd., 2005). Ancak *Metarhizium anisopliae*'nin mikoinsektisit üretiminde çalışan imalat personelleri, saha çalışanları ve araştırmacılar üzerinde alerjik bir etki görülmemiştir (Copping, 2004).

#### 1.6.1.5. Etki Mekanizması

Entomopatojenik fungusların temel özelliği, diğer patojenlerin aksine, konakçı tarafından ağız içine alınmadan kütikül içine nüfuz ederek enfeksiyon oluşturmalarıdır. Bu nedenle tarım zararlıları veya hastalık vektörleri olan böceklerle mücadele etmek için büyük bir potansiyele sahiptir. Genel olarak fungusların enfeksiyonunda ilk adım spor böcek kütiküline tutunmasıyla başlar. Bu tutunma sırasında Mad1, Mad2, Hyd1, Hyd2, Hyd3 gibi proteinler etkilidir. Mad1 proteini böcek kütikülasına yapışmadan sorumluyken Mad2 proteini ise; bitkiye yapışmadan sorumludur. Mad1'in bozulması durumunda çimlenme gecikir. Mad2'nin bozulması durumunda ise enfeksiyon etkilenmez fakat bitki yüzeylerine yapışma bloklanır. Daha sonra appressorium yapısı oluşarak kütikülaya ulaşmayı kolaylaştırır, bu tabakayı aşmak için çeşitli parçalayıcı kitinaz ve protezlar salgılar. Bu aşamada kütikül kalınlığı ile böcek direnci arasında bir ilişki yoktur. Kütikül tabakası aşıldıktan sonra patojen hemosele ulaşır. Hemosele ulaştıktan sonra hem böcek savunmasının üstesinden gelmek hem de hemosele içindeki yüksek osmotik basıncı tolere edebilmek için osmosensör (Mos1) salgılanır. Hemosele ulaşan fungal yapılar blastosporlar halini alır ve böceğin ölümü gerçekleşir (Şekil 4).



Şekil 4. Böcek kütikulasındaki fungal enfeksiyon basamakları. 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 kütikulası ve epidermisi geçer. 3. Fungusun hemosele girmesinden sonra blastospor oluşumu başlar ve fungus konağı istila eder (Castrillo vd., 2005).

### 1.7. Formülasyon

Formülasyon, biyopreparatların insektisidal aktivitesini kaybetmeden uygun yöntemler yardımıyla insektisit olarak üretilme işlemidir. Formülasyonların geliştirilmesi mikroorganizmaların arazi koşullarında kullanımı açısından önemli faydalar sağlamaktadır. Uygun formülasyon yöntemleri kullanıldığında biyopreparatların daha uzun depolama stabilitesi, etkinlik artışı ve uygulama sonrasında çevresel atık oluşturmaması sağladığı görülmüştür. Biyopreparatların depolama, etkinlik ve uygulama kolaylığı sağlaması tüketiciler tarafından biyolojik mücadelenin benimsenmesine katkı sağlayacaktır. Entomopatojenlerin genel olarak maruz kaldığı olumsuz çevre koşulları arasında ultraviyole (UV) ışık enerjisi, aşırı veya yetersiz nem, yağmur veya rüzgâr gibi hava koşullarıyla taşınma bulunur. Bu çevre koşullarına maruz kalan entomopatojenler

aktivitesini kaybetmektedir. Kullanılan formülasyon çeşidiyle birlikte bu faktörleri en az seviyede tutmak hedeflenmektedir.

Formülasyon kullanılmasının amaçları;

1. Üretim ve depolama süreçlerinde stabiliteyi sağlamak
2. Ürünün taşınma ve uygulanma kolaylığı sağlaması
3. Ürünü çevresel faktörlerden koruyarak kararlılığını arttırmak.

Bir biyopreperatin aktivitesi, enfeksiyonu başlatmak için kullanılan etmenin miktarına ve hedef zararlıyı öldürmek için geçen süreye bağlıdır. Bu aktivite patojenin enfeksiyon oluşturma şekline, konağın biyolojisine ve kütikül yapısına göre her entomopatojende farklılık gösterebilmektedir. Formülasyonlar, hedef zararlı üzerinde enfektivite oluşturmak için kullanılan mikroorganizmanın patojenitesini korumayı hedef almıştır ve bunun için çeşitli şartlar sağlayarak hedef zararlıya ulaşma oranını arttırmaktadır. Bu şartlar funguslar için nem veya nematodlar için hareketi kolaylaştıracak bileşenler olabilmektedir.

Entomopatojenlerin depolama stabilitesini korunması, formülasyonun aktivitesinin korunması için gereklidir. Formülasyon işlem ve bileşenlerinin entomopatojenin yaşayabilirliğinin mümkün olan en uzun süre korunması beklenmektedir. Mikrobiyal etmenlerin biyopestisit olarak daha uzun süre depolanması, hücresel zararın stabilize edilmesi ve metabolik süreçlerin yavaşlatılmasıyla mümkün olmaktadır (Hynes ve Boyetchko, 2006). Bazı bileşenler granüllerden nem kaybı oranını etkiler ve böylece organizmanın hayatta kalma süreci de etkilenmiş olur (Lyn vd., 2010). Ayrıca kullanılan formülasyon türü de ürünün depolama stabilitesini etkiler. Hidrofobik fungal conidia, bitkisel yağlarda oda sıcaklığında saklandığında aylarca yaşayabilir, bu da diğer formülasyonlara kıyaslandığında daha uzun sürelerdir (Kim vd., 2011).

Formülasyonların üç temel bileşeni vardır; aktif, taşıyıcı ve yardımcı bileşenler'dir (Ash, 2010; Burges, 1998). Aktif bileşen entomopatojenin enfeksiyon oluşturan kısmı (funguslar için conidia, bakteriyel spor gibi) içerir. Taşıyıcılar genellikle entomopatojenin aktif bileşenini seyreltmek için işlev gören bileşenlerdir. Yardımcı bileşenler ise depolama, uygulama, etkinlik gibi aşamalarında yer alan maddeleri içermektedir.

Funguslardan *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria* ve *Lecanicillium* cinsleri insektisidal aktivitesi yüksek entomopatojenler olarak bilinir. Dünyanın bir çok yerinde bu gruplara ait çeşitli tarla, orman, sera zararlılarına karşı kullanılmak üzere ticari ürünler geliştirildiği bilinmektedir.

Entomopatojenik funguslar için başlangıç materyali katı yada sıvı kültürler olarak değişebilir. Bazı yöntemlerde ise; önce sıvı kültürde büyütülen sporlar daha sonra konidial üretimi arttırmak için katı substrata aktarıldığı iki fazlı yöntem kullanılır. İki fazlı yöntemin bir çok avantajı vardır. Sporların öncelikle sıvı kültürde büyütülmesi sporların homojen olarak büyümesini sağlar. Ayrıca ilk olarak sıvı kültür kullanılması inkübasyon süresini kısaltır.

Formülasyonlar hazırlanırken dikkat edilmesi gereken çeşitli parametreler vardır. Bunlar:

1. Sıcaklık: Sıcaklığın verim üstünde doğrudan etkisi vardır. Bu nedenle çalışılacak sıcaklık, fungus için optimum sıcaklık veya buna yakın sıcaklık seçilmelidir.

2. Nem İçeriği: Katı substrat fermentasyonlarında nem içeriği sürekli takip edilmeli ve sporları etkilememesi için optimum düzeyde ayarlanmalıdır.

3. PH: Entomopatojenik funguslar pH'a tolerans gösterebilirler ve bu yüzden geniş pH aralığında büyüebilirler. Bu yüzden katı substratlar kullanılırken pH göz ardı edilir. Sıvı substratlar kullanılırken ise pH takibi yapılabilir. Ayrıca düşük pH kullanımı istenmeyen bakteriyel büyümeyi engelleyerek kontaminasyonu engelleyebilir (Bartlett ve Jaronski, 1988).

4. Kontaminasyon: Tüm üretim süreci boyunca kontaminasyon takibi dikkatlice yapılmalıdır. Her aşamada kontaminasyon kontrolü yapmak için örnekler alınması, sonraki aşamaya güvenli bir şekilde geçilmesini sağlamaktadır.

Formülasyonlar kuru (granül, ıslanabilir toz vb.) ve süspansiyonlar (su bazlı ve yağ bazlı) olarak gruplara ayrılır.

Granül Formülasyonu: 5-10 mm<sup>3</sup> boyutundadır. Organizmalara substrat olan pirinç, mısır, buğday gibi bitkisel ürünler içerir. Bu substratın seçimi su emilimine, kütle yoğunluğuna ve parçalanma hızına bağlıdır.

Islanabilir Toz Formülasyonlar: Su içinde dağıldıktan sonra süspansiyon olarak uygulanabilen toz formülasyonlardır. Islanabilir tozların çoğu; % 50-80 toz, % 15-45 dolgu maddesi, % 1-10 dağıtıcı ve ağırlıkça % 3-5 yüzey aktif madde içerir. Ayrıca depolama ve hazırlanma aşamasında tozun yapısının bozulmaması için silis de ilave edilir.

Su Bazlı Süspansiyonlar: Genellikle kullanılmadan önce su ile seyreltilerek kullanılır.

Yağ Bazlı Süspansiyonlar: Genellikle bitkisel yağlar kullanılır. Yağ kullanılması fungusların nem ihtiyacını karşılamaktadır.

Aşağıda verilmekte olan Tablo 2'de *Metarhizium anisopliae* kullanılarak, farklı ülkelerde yapılan Coleoptera takımına ait olan formülasyon çalışmaları listelenmektedir.

Tablo 2: Coleoptera takımına karşı kullanılan formülasyon çalışmaları

Ülke	Formülasyon Türü
Almanya	Granül Formülasyonu
Meksika	Yağ Formülasyonu
Amerika Birleşik Devletleri	Yağ Formülasyonu Granül Formülasyonu
Kolombiya	Islanabilir Toz Formülasyon
İsviçre	Granül Formülasyonu
Hindistan	Islanabilir Toz Formülasyon

(Faria ve Wraight, 2007).

### 1.8. Çalışmanın Amacı

*Melolontha melolontha* geniş yayılış gösteren önemli tarım zararlılarından biridir. Yaşam döngüsünün büyük bir kısmını toprak altında geçirmesi dikkate alındığında entomopatojenik fungusun bu zararlı için önemli mikrobiyal mücadele etmeni olabileceği görülmüştür. Çeşitli yöntemler kullanılmasına ve uygulamalar yapılmasına rağmen, böcek bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de en önemli tarım ve orman zararlılarından birisi olmaya devam etmektedir. Zararlıyla mücadele etmek üzere, dünyanın farklı laboratuvar ve araştırma merkezlerinde çeşitli biyopreperatlar geliştirilmesine rağmen, bu çalışmalar günümüze kadar ülkemizde yeterince ilgi görmemiştir. Bu eksikliği gidermek amacıyla daha önce Karadeniz Teknik Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda yapılan doktora tez çalışmasında seçimi gerçekleştirilmiş yerel *Metarhizium anisoplia* suşundan, bu tez kapsamında *Melolontha melolontha*'ya karşı yerel bir mikoinsektisit geliştirilmesi ve insektisidin etkinlik denemelerinin yapılması amaçlanmıştır.



## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Çalışmada Kullanılan Fungusun Seçimi

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan fungus Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunan entomopatojen kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. *Metarhizium anisopliae* türüne ait suş, topraktan elde edilmiş, KTU-2 olarak adlandırılmış ve morfolojik ve moleküler tanımlamaları ayrıntılı bir şekilde yapılmıştır (Sevim, 2010)

*Metarhizium anisopliae* KTU-2 izolatının fungal biyopreperata dönüştürülmesi için gerekli ön çalışmalar ayrıntılı bir şekilde Sönmez (2016) tarafından gerçekleştirilmiştir. Yapılan morfolojik ve moleküler çalışmaların ardından KTU-2 suşunun kararlı ve yüksek öldürücü etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

### 2.2. *Metarhizium anisopliae*'nin Büyütülmesi

Laboratuvar stoklarında bulunan *M. anisopliae* KTU-2 izolatı için stok kültürden canlandırma yapıldı. Bu işlem için Sabouroad Dekstroz Agar (SDA) hazırlandı ve içerisine %1 maya ekstratı ilave edildi. Hazırlanan besiyeri 121°C'de 20 dakika steril edildi. Otoklavlanan besiyeri steril petri kaplarına döküldü ve oda sıcaklığında soğuması beklendi. Petri kaplarında hazır hale gelen besiyeriye, stok halde bulunan *M. anisopliae* KTU-2 izolatı inoküle edildi ve 14 gün boyunca 28°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucu oluşan kolonilerden fungal sporlar hasat edildi. Bunun için SDA besiyeri üzerinde büyütülen sporlara 5 ml %0,1'lik Tween 80 ve 5 ml steril saf su ilave edildi. Cam baget yardımıyla petriden kazınarak hasat edilen sporlar steril tülbent yardımıyla süzülerek falkonlara alındı. Vorteksle homojen hale gelmesi sağlandıktan sonra Thoma lamı yardımıyla spor sayımı yapıldı. Başlangıç kültürü için  $1 \times 10^7$  spor/ml olacak şekilde hazırlandı.

### 2.3. Başlangıç Kültürünün Hazırlanması

Başlangıç kültürü için hazırlanan sıvı besiyeri Ramle vd. (2009) referans alınarak hazırlanmıştır. Sıvı besiyeri; %0,02 kloromfenikol, %0,25 maya ekstrat, %1 pepton ve %2 dekstroz içerir. Hazırlanan besiyeri 121°C'de 20 dakika steril edildi. Daha sonra steril besiyeri üzerine hazırlanan spor süspansiyondan 3 ml inokule edildi. 4 gün boyunca 28°C'de 120 rpm'de inkübasyona bırakıldı.

### 2.3. Katı Hal Fermentasyonu

Katı hal fermentasyonu için ilk aşama katı substratın seçilmesi ve hazırlanmasıdır. Tez kapsamında katı substrat olarak pirinç kullanıldı ve pirinçlerin hazırlanması Loera-Corral vd (2016) referans alınarak hazırlandı. İlk aşama olarak pirinçler beher içine alınıp saf su ile 1 dakika boyunca karıştırıldı ve suyu süzülde. Bu işlem 3 defa tekrar edildi. Pirinçler yıkandıktan sonra saf su içinde 30 dakika boyunca bekletildi ve 20 dakika boyunca fazla suyun uzaklaşması için beklenildi. Daha sonra otoklavlanabilir poşetlere 100'er gram olacak şekilde dağıtıldı ve her poşete inokulum yapabilmek için iki adet falkon karşılıklı yerleştirildikten sonra poşetin ağız kısmı da otoklavlanabilir bant ile kapatılarak 121°C'de 20 dakika otoklav edildi. Otoklavnan pirinçler 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Soğuyan pirinçlere  $1 \times 10^7$  spor/ml konsantrasyonda olan başlangıç kültüründen 5 ml olacak şekilde her poşete ilave edildi. Poşetler 28°C'de 15 gün büyümeye bırakıldı ve pirinçler her gün alt üst edilerek homojen büyümenin olması sağlandı (Şekil 5).



Şekil 5. Fungusun katı substrat üzerinde büyütülmesi

İnkübasyon sonunda pirinçler %0,1 Tween 80 içeren steril behere alınıp fungal sporların substrattan ayrılması için 30 dakika boyunca 170 rpm'de kuru hava sallayıcıda bekletildi. Pirinç ve Tween 80'den oluşan karışım elekten geçirildi ve pirinçler uzaklaştırıldı. Kalan sıvı kısımdan sporları hasat etmek için falkona alınıp 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı döküldü. Karışım bitene bu işlem tekrar edildi ve elde edilen sporlar bir sonraki aşama olan yağ formülasyonu için hazır hale getirilmiş oldu.

#### 2.4. Yağ Formülasyonunun Hazırlanması

Tween 80 yardımıyla pirinçlerden ayrılan sporların sayımı Thoma lamı ile yapıldıktan sonra  $1 \times 10^{10}$  spor/ml konsantrasyonda olacak şekilde cam şişelerde stok konsantrasyon hazırlandı. Yağ formülasyonu hazırlanırken Ummudi ve Vadlamani (2014) referans alındı. Şişelere 5 ml spor koyuldu ve daha sonra %1 yağ, %1 Triton X-100, %1  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , %0,5 silikon ve %96.5 su ilave edildi. Karışımın homojen hale gelmesi için 60 dakika boyunca 1000 rpm'de manyetik karıştırıcıda karıştırıldı .

## 2.5. Deneylerde Kullanılacak Böceklerin Temin Edilmesi

Çalışmada kullanılan *Melolontha melolontha* larvaları Trabzon'un Yomra ilçesindeki fındık bahçelerinde bulunan ağaçların ve fındıkların köklerinin kazılmasıyla toplandı. Larvalar, bir miktar besin ve toprak ile yeterince havalandırma açıklığı bulunan kutularda laboratuvara getirildi. Birkaç gün laboratuvarda beslenen larvalardan sağlıklı olanları deneylerde kullanıldı.

*Leptinotarsa decemlineata* larva ve erginleri Trabzon Çukurçayır ve Pelitli beldelerindeki patates ve patlıcan bahçelerinden toplandı. Böcekler, yeterince besin ve havalandırma açıklığı bulunan kutularda laboratuvara getirildi. Sağlıklı böcekler deneylerde kullanıldı.

*Tenebrio molitor* larvaları ise Karadeniz Teknik Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına ait olan böcek kültürlerinden temin edildi.

## 2.6. *Melolontha melolontha* için Saksı Deneyleri

Saksı deneyleri için çilek (*Fragaria vesca*) fideleri kullanıldı. Deney için kullanılan çilek fideleri yaklaşık 10-15 gün öncesinden temin edildi ve laboratuvar ortamında büyümesi sağlandı. Çilek fideleri hazır hale geldiğinde, stok olarak hazırlanan  $1 \times 10^{10}$  spor/ml konsantrasyondaki yağ formülasyonundan saf su ile seyreltme yapılarak  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  spor/ml konsantrasyon olarak 5 farklı konsantrasyon elde edildi. Daha sonra çilek fidelerinin bulunduğu toprağa 5 ml yağ formülasyonundan uygulandı. Arazi çalışmasında toplanan *Melolontha melolontha* larvaları saksılara bırakıldı ve üzerleri bir miktar toprakla kapatıldı ve deney 5 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi (Şekil 6). Kontrol grubuna sadece su verildi. Saksılar ve fidelerin yaprakları her gün düzenli olarak nemlendirildi ve 15 gün boyunca deney devam etti.



Şekil 6. Formülasyonun *Melolontha melolontha* üzerinde test edilmesi

### 2.7. *Leptinotarsa decemlineata* için Laboratuvar Deneyleri

Arazi çalışması ile toplanan larva ve erginler bir kaç gün laboratuvar ortamında beslendi ve sağlıklı olan böcekler deneylerde kullanıldı. Larva ve erginler için ayrı kurulan deney için aynı yöntem kullanıldı. Bu deneyler için, 105×145×90 mm ölçüsündeki kaplara 10'ar böcek olacak koyuldu ve üzerlerine  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$  ve  $1 \times 10^5$  spor/ml olarak hazırlanan 5 farklı konsantrasyondaki yağ formülasyonu spreyle 5 ml böceklere uygulandı. Kontrol grubunda ise su kullanıldı. Böceklere her gün besin olarak patates yaprağı verildi. 15 gün boyunca takip edildi ve ölüm oranları belirlendi (Şekil 7) . Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.



Şekil 7. Formülasyonun *Leptinotarsa decemlineata* üzerinde test edilmesi

### 2.7. *Tenebrio molitor* için Laboratuvar Deneyleri

Laboratuvar kültürü larvaları içinden sağlıklı olanlar seçilerek deneyde kullanıldı. Deney için 105×145×90 mm boyutundaki kaplara 10 larva koyuldu ve üzerlerine  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$  ve  $1 \times 10^5$  spor/ml olarak hazırlanan 5 farklı konsantrasyondaki yağ formülasyonu spreyle böceklere uygulandı ve besin olarak da her kaba un ilave edildi (Şekil 8). Kontrol grubuna ise su verildi. Deneyler 15 gün boyunca takip edilerek ölüm oranları belirlendi. Deney 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.



Şekil 8. Formülasyonun *Tenebrio molitor* üzerinde test edilmesi

## 2.8. İstatiksel Analiz

Yapılan böcek uygulamaları sonucunda elde edilen ölüm oranları Abott formülüne göre hesaplanmıştır. Her böcek için hesaplanan ölüm oranı, 15 günün sonunda ki verilere göre hesaplanmıştır.



### 3. BULGULAR

*Melolontha melolontha* ile m¼cadelede kullanılmak üzere biyopreperat üretmeye yönelik bu çalışmada, yağ form¼lasyonu başarılı bir şekilde üretildi ve *Melolontha melolontha* üzerinde etkisi araştırıldı. Ek olarak Coleoptera takımına ait iki farklı böcek üzerinde doz denemeleri yapıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda aşağıdaki veriler elde edildi.

#### 3.1. Yağ Form¼lasyonu

Yağ form¼lasyonunun hazırlanma aşamasında, öncelikle yapay besiyerinde büyüt¼len konidialar daha sonra bifazik kültür sistemde büyüt¼ld¼. Bifazik kültür sistemine göre büyüt¼len sporlar yağ form¼lasyonunda kullanılmak üzere hasat edildi. Yağ form¼lasyonunda kullanılan Triton X-100 iyonik olmayan yüzey aktif madde, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> stabilizatör, silikon ise köp¼k önleyici olarak kullanıldı. Tüm bu çalışmaların sonucunda yağ form¼lasyonu başarılı bir şekilde elde edildi (Şekil 9).



Şekil 9. Hazırlanan yağ form¼lasyonu



### 3.2. *Melolontha melolontha* Saksı Denemeleri

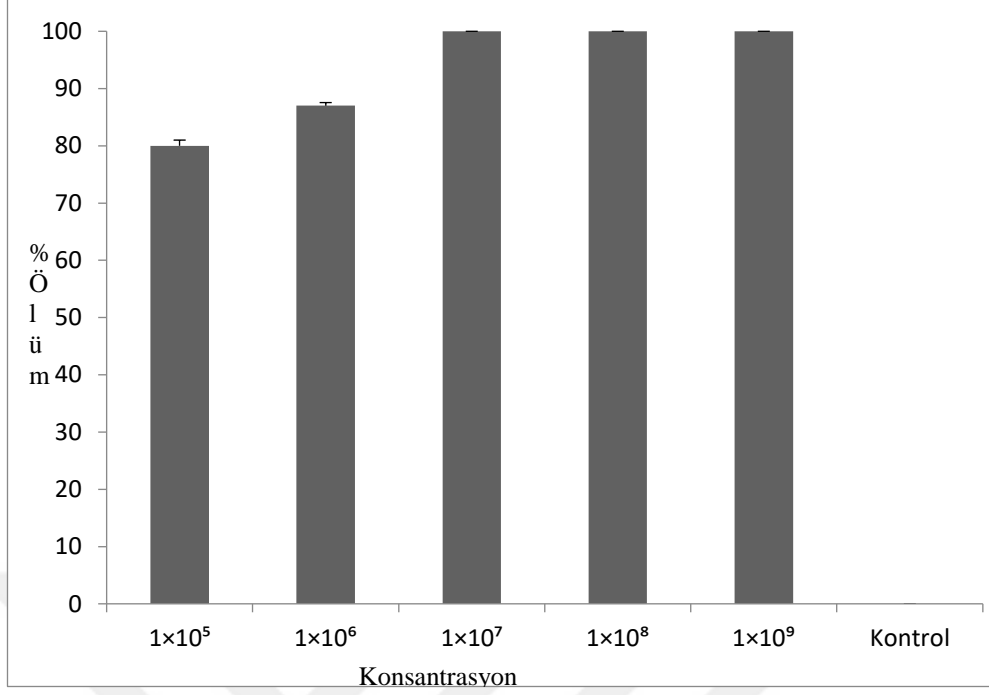
*Melolontha melolontha* ile yapılan saksı denemeleri başarılı bir şekilde gerçekleştirildi ve 15. günün sonunda böcekler üzerinde ölüm ve mikozlanma değerleri hesaplandı. Elde edilen bulgular doğrultusunda  $LC_{50}$  değeri hesaplandı ve  $9,29 \times 10^3$  olarak bulunmuştur (Tablo 3).

Tablo 3. *Melolontha melolontha* için letal konsantrasyon değerleri

	$LC_{50}$ (FL, %95)	Eğim $\pm$ SE	$LC_{95}$ (FL, %95)	df	$X^2$
Larva	$9,29 \times 10^3$ (ND– $8,8 \times 10^4$ )	$0,35 \pm 0,34$	$2,1 \times 10^6$	3	1,047

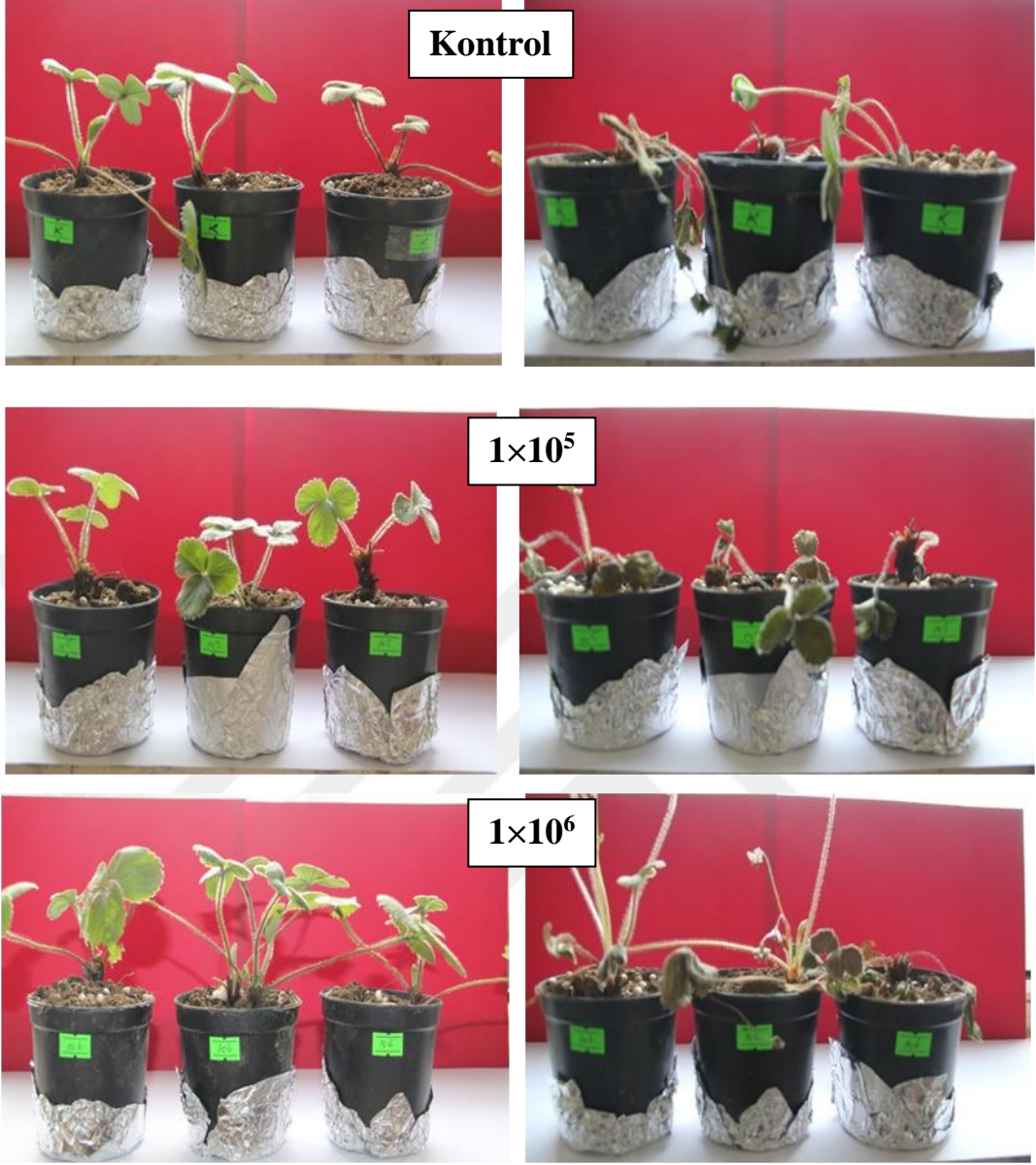
FL: güven aralığı, SE: Standard hata, df: serbestlik derecesi,  $X^2$ : Ki-kare

Yapılan saksı denemelerinin sonucunda  $1 \times 10^5$  konsantrasyonda %80,  $1 \times 10^6$  konsantrasyonda %87 ölüm gözlenirken,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  ve  $1 \times 10^9$  spor/ml konsantrasyonlarda %100 ölüm görüldü. Bu sonuçlar kıyaslandığında  $1 \times 10^5$  ve  $1 \times 10^6$  spor/ml doz arasında istatistiksel olarak fark olmadığını,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  spor/ml arasında da istatistiksel olarak bir fark olmadığını gösterir ( $p > 0,05$ ) olarak ifade edilir (Şekil 10).



Şekil 10. *Melolontha melolontha* larvalarına farklı konsantrasyonda yağ formülasyonu uygulamasının 15. gün sonunda ölüm oranları

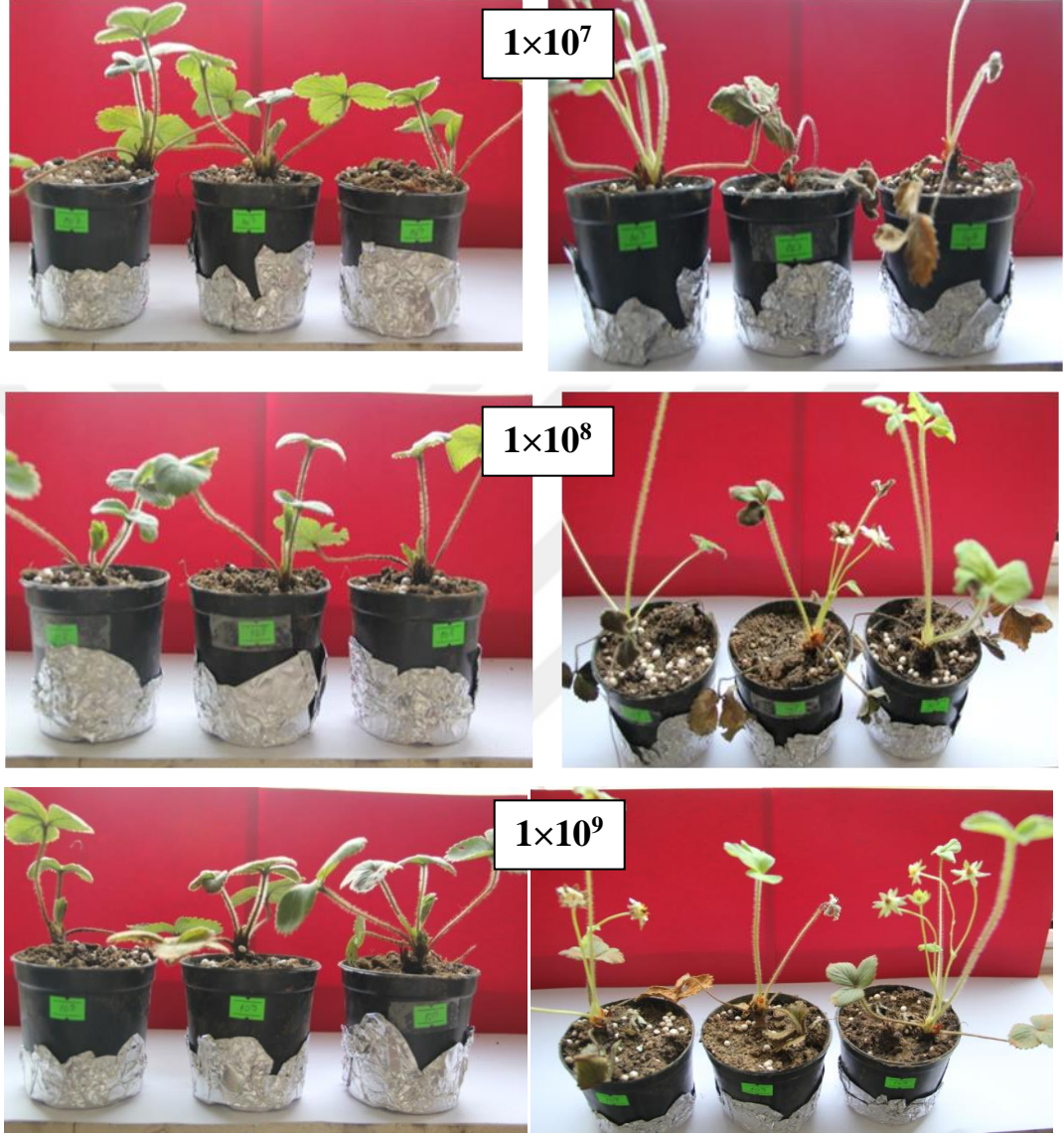
Yapılan çalışmalar sırasında kontrol grubundaki saksılarda bulunan çilek fideleri üzerinde değişim gözlemlendi. *Melolontha melolontha* larvaları çilek fidelerinin köklerinde hasar oluşturarak fidelerin kurummasına yol açtığı görüldü. Ayrıca  $1 \times 10^5$  ve  $1 \times 10^6$  spor/ml konsantrasyonların bulunduğu saksılarda da larvaların hasara yol açtığı görüldü. Bunların yanı sıra %100 ölüm görülen saksılardaki fidelerde oluşan hasar, kontrol grubuna kıyasla oldukça azdır. En düşük dozlar olan  $1 \times 10^5$  ve  $1 \times 10^6$  spor/ml konsantrasyon uygulanan fidelerde görülen ölüm oranı sırasıyla %80 ve %87 olarak görüldü. Çilek fidelerindeki hasar göz önüne alındığında ise yüksek ölüm oranı görülmesine rağmen fidelerde hasar meydana geldiği görülmektedir (Şekil 11). Ayrıca  $1 \times 10^5$  ve  $1 \times 10^6$  spor/ml konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı da hesaplamalar sonucunda ortaya çıkmıştır.



Şekil 11. Preperatın uygulanması sonucunda çilek fidelerinin durumu.  
1.günü (sol sütun) ve 15. günü (sağ sütun)

Yapılan çalışmalar sonucunda  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  ve  $1 \times 10^9$  spor/ml konsantrasyonların hepsinde %100 ölüm görüldü. Fakat fidelerin hasar durumu incelendiğinde  $1 \times 10^7$  spor/ml konsantrasyonda uygulanan formülasyon sonucunda fidelerde bir miktar kuruma olduğu görülmektedir. Buna rağmen  $1 \times 10^8$  ve  $1 \times 10^9$  spor/ml konsantrasyonda yapılan formülasyon uygulamasının sonucunda ise fidelerde hasar görülmemesinin yanı sıra çiçeklenme olduğu görüldü (Şekil 12).  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  ve  $1 \times 10^9$  spor/ml konsantrasyonda

uygulanan dozların istatistiksel analizlerinin sonucunda bu dozlar arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü.



Şekil 12. Preperatın  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  ve  $1 \times 10^9$  spor/ml konsantrasyon uygulamasında çilek fidelerinin durumu. A: 1.gün (sol sütun), B: 15. gün (sağ sütun)

Bu çalışma sonucunda mikozlanma değerleri hesaplandı ve her dozda %100 mikozlanma görüldü (Şekil 13 ).



Şekil 13. Saksı denemesi sonucunda mikozlanan larvalar

### 3.3. *Leptinotarsa decemlineata* Laboratuvar Denemeleri

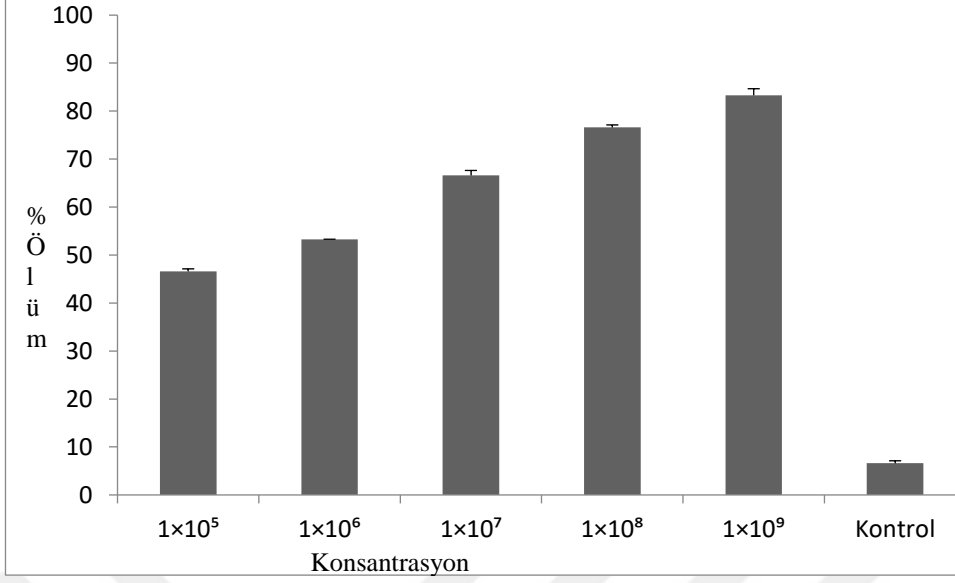
*Leptinotarsa decemlineata*'ya uygulanan patojenite testleri larva ve ergin olarak iki ayrı grupta uygulandı. Bu testlerin sonuçları 15. günün sonunda incelendi ve larvalar için  $LC_{50}$  değeri  $3,63 \times 10^5$  olarak hesaplanırken, erginler için  $4,30 \times 10^3$  olarak hesaplandı (Tablo 4).

Tablo 4. *Leptinotarsa decemlineata* için letal konsantrasyon değerleri

	$LC_{50}$ (FL, %95)	Eğim $\pm$ SE	$LC_{95}$ (FL, %95)	df	$X^2$
Larva	$3,63 \times 10^5$ (ND– $1,4 \times 10^5$ )	$0,3 \pm 0,07$	$2,3 \times 10^{11}$	3	0,436
Ergin	$4,30 \times 10^3$ ( $5,2 \times 10^4$ – $1,7 \times 10^5$ )	$0,3 \pm 0,08$	$7,1 \times 10^{10}$	3	0,089

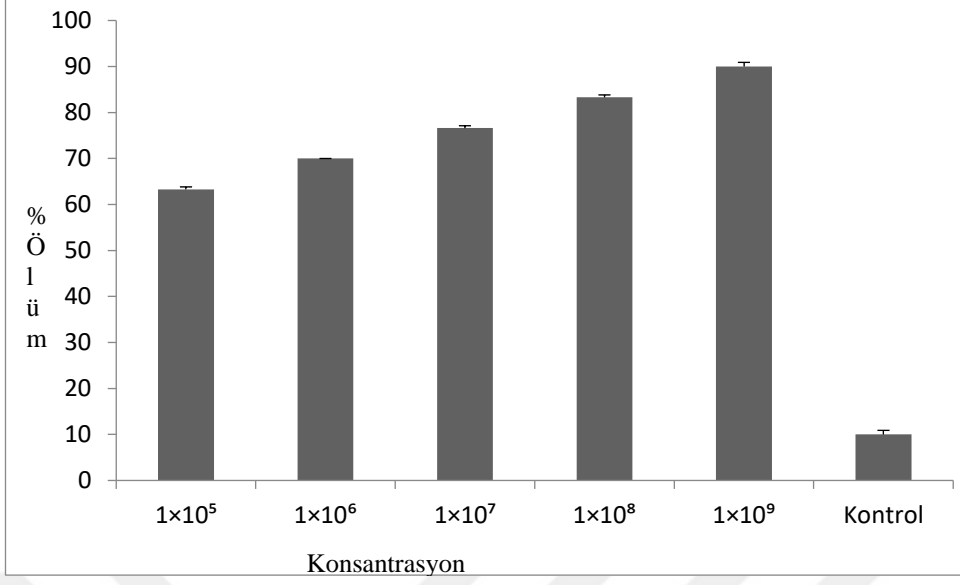
FL: güven aralığı, SE: Standard hata0, df: serbestlik derecesi,  $X^2$ : Ki-kare

Yapılan çalışmalar sonucunda larvalar ve erginler için ölüm değerleri hesaplandı. Hem larvalarda hem de erginlerde uygulanan her doz arasında anlamlı fark olduğu görüldü. Larvalar üzerinde yapılan tarama testlerinin sonucunda 15. günün sonunda %83,3 ölüm gözlemlendi (Şekil 14).



Şekil 14. Preperatın *Leptinotarsa decemlineata* larvaları üzerindeki etkisi

Erginler üzerinde yapılan tarama testleri sonucunda en yüksek konsantrasyon olan  $1 \times 10^9$  spor/ml kullanıldığında 15. günün sonunda %90 ölüm görüldü (Şekil 15). En düşük doz olarak kullanılan  $1 \times 10^5$  spor/ml'de ise %63 ölüm görüldü. Larva ve erginlerin tarama testleri kıyaslandığında erginlerde ölüm oranlarının daha yüksek olduğu görüldü. Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda kullanılan her dozun erginler üzerinde daha etkili olduğu görüldü. Kontrol grupları incelendiğinde ise, larvalarda %6,3 erginlerde ise %10 ölüm gözlenmiştir.



Şekil 15. Preperatın *Leptinotarsa decemlineata* erginleri üzerindeki etkisi

#### 3.4. *Tenebrio molitor* Laboratuvar Denemeleri

*Tenebrio molitor* larvaları için yapılan deneyin sonucunda ölüm gözlenmedi. Farklı dozlar uygulanmasına rağmen hiç bir dozda ölüm görülmedi. Kontrol grubunda da mortalite görülmedi ve 15. günün sonunda anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

#### 4. TARTIŞMA

*Metarhizium anisopliae* zararlılarla mücadelede oldukça yaygın kullanılan bir entomoptojenik fungustur. *M. anisopliae* suşuna ait, farklı zararlılar üzerinde etkili olan pek çok ticari preparatlar bulunmaktadır (Faria ve Wraight, 2007). Tez kapsamında kullanılan KTU-2 suşu *M.anisopliae*'e ait olup yerel bir izolattır. Yerel izolatların kullanımı yabancı izolatların kullanımı ile kıyaslandığında, zararlı böcekler ile ekolojik uyuma sahip olmalarından dolayı hedef dışı organizmalarda olumsuz etkisinin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Gulsar vd., 2004; Takatsuka, 2007). Biyopestisit üretiminde kullanılan suşun in-vitro ortamda kararlılığı önemli etkenlerden biridir. Entomopatojenik fungusların yapay besiyeri ortamında pasajlanması sonucunda virülans kaybı yaşadıkları düşünülmektedir (Butt vd.,2006). Tez kapsamında kullanılan suşun, ardışık pasajlama deneyleri yapılmış ve ardışık pasajlamanın sonucunda virülansında azalma olmadığı görülmüştür. Ayrıca arazi şartları düşünülerek yapılan 3 farklı sıcaklık denemelerinin sonucunda tüm sıcaklıklarda en yüksek aktiviteyi gösterdiği görülmüştür. *Pr1* geni aktif olduğunda fungal sporun böcek kutikulasına penetrasyonun başlangıç aşamasında önemli rol oynar (Cherrie-Lee ve Bidochka, 2005). Tez kapsamında kullanılan KTU-2 suşunun *Pr1* gen bölgesi için çalışmalar yapılmış ve bu gen bölgesinin mevcut olduğu görülmüştür. Tüm bu çalışmalar sonucunda KTU-2 suşundan etkin bir mikoinsektisit geliştirileceği sonucuna varılmıştır. Mikoinsektisit geliştirme aşamasında üç temel basamak vardır; seri üretim, formülasyon ve uygulama. Formülasyon basamağında substrat seçilirken sporların eşit olarak dağılmasına imkan sağlaması ve daha sonra sporlar üzerinde kalıntı oluşturmaması gerekmektedir (Bateman, 1995). Bu sebeplerden formülasyonun geliştirilmesi aşamasında bifazik sistemin kullanılması ve katı substrat olarak pirinç seçilmesine karar verilmiştir. Yağ formülasyonları; böcek kutikulasına yapışmada avantaj sağlaması, düşük hacimli uygulamalarda bile etkili olması, UV'ye karşı dayanıklılık sağlaması, raf ömrünün uzun olması ve daha iyi yayılabilirlik katsayısına sahip olmaları gibi bir çok avantaj sağlamaktadır (Prior vd., 1988; Hajek, 1993; Stathers vd., 1993; Bateman, 1995; Moore vd., 1995). Bu avantajlar göz önüne alındığında katı substratta büyütülen pirinçler hasat edilip yağ formülasyonu hazırlandı ve hazırlanan yağ formülasyonunun başarılı olduğu yapılan çalışmalar sonucunda görülmüştür.



*M. melolontha* üzerinde yapılan çalışmalar incelendiğinde etkili bir formülasyon çalışması olduğuna dair literatür bilgisi bulunamamıştır. Fakat entomopatojenik funguslardan çeşitli izolatlar ve çalışmalar mevcuttur. Tartanus vd. (2016) yaptığı çalışmada çilek fideleri üzerinde alan denemesi yapmıştır. İlk olarak Eylül 2014 de uygulama yapılmış ve *Metarhizium anisopliae* için insektisidal aktiviteyi %47,6 olarak elde etmişlerdir. Daha sonra Haziran 2015'te tekrar uygulama yapılmış ve uygulamanın sonucunda %81 insektisidal aktivite elde etmişlerdir. Tez kapsamında kullanılan *Metarhizium anisopliae* KTU-2 suşundan elde edilen insektisidal aktiviteye bakıldığında,  $1 \times 10^5$  spor/ml konsantrasyon uygulandı ve 15 günün sonunda %80 insektisidal aktivite elde edildi. Niemczyk vd (2018) Polonya'da üç farklı bölgede entomopatojenik fungusların yaygınlığı ve *M.melolontha* üzerindeki etkisini araştırmak için yaptıkları çalışmada; toprakta %80 oranında fungus bulunduğu, bunların *Beauveria* cinsine ait olduğu sonucu elde edildi. Tespit edilen fungusların %41'i ise *Beauveria brongniartii* olduğu görüldü. İzole edilen fungusların, *M. melolontha* larvaları üzerindeki insektisidal aktivitesi ise sadece %1,3 olarak tespit edilmiştir. Bu insektisidal aktivitenin sebebi olarak; larvaların 2. ve 3. evre larva olması ve alanda toprağın pH'sının, *Beauveria brongniartii*'nin insektisidal aktivitenin azalmasına sebep olması ile açıklamışlardır. Dolci vd (2006) yaptığı çalışmada *Beauveria brongniartii*'ye ait farklı suşlar kullanarak alan denemeleri yapmıştır. Bu çalışma sırasında kullanılan suşlar toprağa uygulanarak etkisi incelenmiştir. En etkili suşun popülasyon yoğunluğunda %57,5 azalmaya sebep olduğu görülmüştür. Aynı zamanda iki yıl boyunca suşların toprakta kalıcılığı test edilmiş ve 10-100 kat arasında değişen azalma oranlarına sahip oldukları görülmüştür. Fatu vd (2018) yaptığı çalışmada *Beauveria brongniartii* ve *Metarhizium* sp.'a ait 3 farklı suş kullanarak insektisidal aktivitesini *M. melolontha*, *Amphimallon solstitiale* ve *Anoxia villosa* üzerinde test etmiştir. Bu deneyde  $1 \times 10^7$  spor/ml konsantrasyon kullanılmış ve böcekler 100 ml'lik spor süspansiyonuna daldırılarak deney kurulmuştur. Deney 60 gün boyunca devam etmiştir. Deneyin sonucunda *M. melolontha* için *Beauveria brongniartii*'ye ait suşlarda görülen insektisidal aktivite %100, %89 ve %68 olarak elde edilmiştir. Fakat ilk mortalite 37 gün sonunda görülmüştür. *M. anisopliae*'a ait suşlarda görülen insektisidal aktivite ise %8, %23 ve %25 olarak görülmüştür. Tüm bu çalışmalar göz önüne alındığında *M. melolontha* için daha çok *Baeveria* cinsine ait çalışmalar olduğu fakat insektisidal aktivitelerinin sınırlı olduğu görülmüştür. Tez kapsamında %100 insektisidal aktivite 15 günde elde edilmiştir. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalarda *M. melolontha* üzerinde yüksek insektisidal aktivite

nematod ve virüslere ait olarak elde edilmiştir. Sezen vd (2007) *M.melolontha*'ya ait ilk viral patojen tanımlamasını yapmış olup *Melolontha melolontha Entomopoxvirus(MmEPV)* ve %96,3 insektisidal aktivitesi olduğunu tespit etmiştir. Daha sonraki yıllarda Erbaş vd (2014) iki farklı nematod ile *Heterorhabditis bacteriophora* ve *Steinernema feltiae* çalışmalar yapmış ve %100 insektisidal aktivite gözlemlemiştir. Tez kapsamında yapılan çalışmalar neticesinde elde edilen sonuçlar *Metarhizium anisopliae*'ya ait suştan elde edilen yağ formülasyonunun %100 insektisidal aktive gösterdiği görülmüştür.

*Leptinotarsa decemlineata* özellikle patates, patlıcan, tütün, biber gibi bitkilerde ciddi miktarda ürün kaybına sebep olan bir tarımsal zararlıdır. Ürün kaybının yanı sıra patatesteki bazı bakteriyel ve viral hastalığın taşınmasına da sebep olur (URL-6). Wraight ve Ramos (2017) yapılan çalışmada *Beauveria bassiana*'dan elde edilen yağ ve toz formülasyonları larvalardaki etkisi üzerinde çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada böceklerdeki insektisidal aktivite tespit edilirken bir kaç farklı yöntem uygulanmıştır. Bütün yöntemlerde  $10^7$  spor/ml konsantrasyon kullanılmış ve uygulama spreyle yapılmıştır. Her iki formülasyon yapraklara uygulandığında, %10'dan daha az mortalite elde edilmiştir. Formülasyonların böceklere uygulanması sonucunda ise; yağ formülasyonunda %59, toz formülasyonda %57 mortalite görülmüştür. Ayrıca formülasyonlar hem böceklere hem de yapraklara uygulanmış ve bunun sonucunda; yağ formülasyonunda %63, toz formülasyonda %66 mortalite elde edilmiştir. Çalışmanın sonucunda böceklere uygulama yapılması ve hem böceklere hem yapraklara uygulama yapılması arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Fernandez vd (2001) yaptığı çalışmada; *Beauveria bassiana*'dan elde edilen sporlar  $6,2 \times 10^7$  spor/ml konsantrasyonda ve larvalara sprey yardımıyla uygulama yapmıştır. Yapraklara uygulandığında %34, böceklere uygulandığında %76, hem yapraklara hem böceklere uygulandığında %77 insektisidal aktivite elde etmiştir. Tez kapsamında yapılan çalışmalarda ise hem böceklere uygulama yapılmış hemde verilen besine uygulama yapılmıştır ve bunun sonucunda  $1 \times 10^7$  spor/ml kullanılan dozda larvalarda %66,6 olan insektisidal aktivite erginlerde %76,6 olarak elde edilmiştir. Akbarian vd (2012) yaptığı çalışmada hem *Beauveria bassiana* hem de *Metarhizium anisopliae*'e ait izolatlar ile deneme yapmıştır.  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  spor/ml konsantrasyonlar kullanılmış ve 2. ve 4. evre larvalar üzerinde denemeler yapılmıştır. En yüksek konsantrasyonda uygulanan *Beauveria bassiana*'ya ait 6 suştan insektisidal aktivitesi en yüksek olan suşun insektisidal aktivitesi 2. evre larvalarda %78,88 iken 4. evre larvalarda %44,44 olarak görülmüştür. *Metarhizium anisopliae*'e ait 2 suştan

sadece bir tanesi 2. evre larvalarda %27 insektisidal aktivite göstermiş 4. evre larvalarda ise %20'den daha düşük insektisidal aktivite göstermiştir. Tez kapsamında kullanılan larvalar 4. evre larvalar olmasına rağmen elde edilen insektisidal aktivite literatürdeki çalışmalarla kıyaslandığında oldukça yüksektir.

*Tenebrio molitor* depolanmış tarım ürünlerinde özellikle un üzerinde zarar oluşturur. Batta vd (2010) yaptığı çalışmada *Beauveria bassiana*'dan elde edilen yağ formülasyonu ve formüle edilmemiş sporları kullanarak kıyaslama yapmıştır. Yapılan çalışmada; yağ formülasyonu  $1 \times 10^8$  spor/ml, formüle edilmemiş sporların konsantrasyonu ise  $3 \times 10^6$  spor/ml konsantrasyonda kullanılmış ve 7 günün sonunda insektisidal aktiviteler belirlenmiştir. Yağ formülasyonunda %50 olan insektisidal aktivite formüle edilmemiş sporlarda %20 olarak görülmüştür. Kılıç vd (2018) yaptığı çalışmada *Beauveria bassiana* ve *Metarhizium anisopliae* sporlarını *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera littoralis*, *Tenebrio molitor* ve *Blattella germanica* üzerinde test etmiş ve en yüksek insektisidal aktiviteyi *Tenebrio molitor* ile yaptığı çalışmadan elde etmiştir. Her iki tür için de aynı konsantrasyon olan  $2 \times 10^7$  kullanılmış ve 12 günün sonunda şu veriler elde edilmiştir; *Beauveria bassiana* %80 insektisidal aktivite gösterirken *Metarhizium anisopliae* ise %70 insektisidal aktivite göstermiştir. Ling vd (2017) ise yaptığı çalışmada *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* ve *Isaria cicadae* türlerine ait fungusların *Tenebrio molitor* üzerinde etkinliğini böceğin farklı evreleri üzerinde test etmiştir. Bu çalışmanın sonucunda ise *Metarhizium anisopliae*'nin böceğin pupa, larva ve ergin olarak her döneminde etkili olduğu, *Isaria cicadae*'nin her dönemde düşük virülans gösterdiği, *Beauveria bassiana*'nın larvalarda düşük virülans gösterdiği, *Isaria fumosorosea*'nin ise *Metarhizium anisopliae*'a kıyasla daha düşük virülans göstermesine rağmen böceğin her döneminde etkili olduğu görülmüştür. Tüm bu literatür bilgileri dikkate alındığında yapılan çalışmalar entomopatojenik fungusların *Tenebrio molitor* üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Fakat tez kapsamında yapılan deneylerde etkin bir insektisidal aktivite elde edilemedi.

Sonuç olarak bu tez kapsamında *Metarhizium anisopliae*'ye ait yağ formülasyonu hazırlandı ve bunun Coleoptera takımına ait farklı türler üzerinde etkinlik denemesi farklı dozlar kullanılarak yapıldı. Bu çalışmada; elde edilen yağ formülasyonu başarılı bir şekilde *Melolontha melolontha* ve *Leptinotarsa decemlineata* üzerinde test edildi ve insektisidal aktivitelerinin yüksek olduğu sonucuna ulaşıldı. Fakat *Tenebrio molitor* için yapılan denemelerde insektisidal aktivitesinin olmadığı görüldü.

## 5. SONUÇLAR

"*Metarhizium anisopliae*'dan *Melolontha melolontha* L. (Coleoptera: Scarabaeidae)'ya karşı mikrobiyal pestisit geliştirilmesi" başlıklı bu tez çalışmasında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. Yerel bir izolat olan *Metarhizium anisopliae*'a ait KTU-2 suşundan yağ formülasyonu başarılı bir şekilde elde edildi.

2. *Melolontha melolontha* için yapılan denemelerin sonucunda en düşük dozda bile yüksek insektisidal aktivite görüldüğü ve  $10^7$  spor/ml konsantrasyonda %100 insektisidal aktivite görüldüğü ve bu böcek için başarılı bir biyopestisit olduğu görülmüştür.

3. *Leptinotarsa decemlineata* için yapılan denemelerin sonucunda insektisidal aktivitenin larva için %83,3, ergin için ise %90 olmasıyla başarılı bir biyopestisit olduğu görülmüştür.

4. *Tenebrio molitor* için yapılan denemelerin sonucunda ise etkili bir insektisidal aktivite elde edilememiştir.

## 6. ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, *Metarhizium anisopliae* orjinli bir yağ formülasyonu hazırlandı ve farklı böcekler üzerinde doz denemeleri yapılarak insektisidal aktivitesi belirlendi. Elde edilen sonuçlar neticesinde çalışmanın etkinliğini arttırmak amacıyla bundan sonraki çalışmalara yönelik olarak aşağıdaki hususlar belirlenmiştir.

1. Fungusun biyoteknolojik önemi araştırılabilir.
2. Ürünün saha ve yan etki denemeleri yapılabilir.
3. Ürünün ruhsatlandırma ve ticarileştirilme işlemleri başlatılabilir.



## 7. KAYNAKLAR

- Akbarian, J., Ghosta, Y., Shayesteh, N. ve Safavi, S.A., 2012. Pathogenicity of some isolates of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin on 2nd and 4th larval instars of colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Col.: Chrysomelidae), under laboratory conditions, African Journal of Microbiology Research, 6,34, 6407-6413.
- Alves, R.T., Bateman, R.P., Prior, C. ve Leather, S.R., 1998. Effects of simulated solar radiation conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations, Crop Protection 17,675-679.
- Ash, G.J., 2010. The science, art and business of successful bioherbicides, Biological Control 52, 230–240.
- Barbieri, R.T, Croce. J., Gandra, R.F., Gagete, E., Paula, C.R. ve Gambale, W., 2005. Allergenic extracts from *Metarhizium anisopliae*: Obtainment and characterization, Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology, 15,131-139.
- Bartlett, M.C. ve Jaronski, S.T., 1988. Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects, in fungi in biological control systems (Burge, M.N., Ed.). Manchester University Press, Manchester, 61-85.
- Batta, Y., Murdoch, G. ve S. Mansfield, S., 2010. Investigations into the formülation and efficacy of entomopathogenic fungi aganist larvae of yellow mealworm (*Tenebrio molitor* L., Coleoptera: Tenebrionidae), General & Applied Entomology, 39.
- Bateman, R.P., 1995. Formulation and application of mycopathogens for locust and grasshopper control. LUBILOSA Technical Bulletin, 67.
- Benker, U. ve Leuprecht, B., 2005. Field experience in the control of common cockchafer in the Bavarian region Spessart. IOBC/ WPRS Bull, 28, 21–24.
- Berner, M. ve Schnetter, W., 2001. Wirksamkeit entmopathogener nematoden gegen engerlinge der maikäfer *Melolontha melolontha* und *M. hippocastani*. Mitteilungen der deutschen gesellschaft für allgemeine und angewandte entomologie, 13(1-6), 165-167.
- Bischoff, J.F., Rehner, S.A. ve Humber R.A., 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. Mycologia, 101, 512–530.
- Braga, G., Flint, S.D, Messias, C.L, Anderson, A.J. ve Roberts, D.W., 2001a. Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*, Mycological Research, 105, 874-882.
- Braga, G., Flint, S.D., Miller, C.D., Anderson, A.J. ve Roberts, D,W., 2001b. Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, Photochemistry and Photobiology, 74, 734-739.

- Braga, G., Flint, S.D., Miller, C.D., Anderson, A.J. ve Roberts, D.W., 2001c. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 618N to 548S, Journal of Invertebrate Pathology, 78, 98-108.
- Burges, H.D., 1998. In: Burges, H.D. Ed. Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments, Kluwer Academic, Dordrecht, 1-6.
- Butt, T., Jackson, C. ve Magan, N., 2001. Introduction fungal biological control agents: progress, problems and potential. In: Butt TM, Jackson C, Magan N, editors. Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. Wallingford, UK: CABI International, 1-8.
- Butt, T., Wang, C., Shah, F.A. ve Hall, R., 2006. Degeneration of entomogenous fungi. In An Ecological and Societal Approach to Biological Control, 213-226, Springer Netherlands.
- Castrillo, L.A., Roberts, D.W. ve Vandenberg, J.D., 2005. The fungal past, present, and future: germination, ramification, and reproduction, Journal of Invertebrate Pathology, 89, 46-56.
- Cherrie-Lee, N. ve Bidochka, M.J., 2005. Up-regulation of *Pr1*, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*, Mycological research, 109, 307-313.
- Copping, L.G., editor. 2004. The manual of biocontrol agents. 3rd ed. Alton: British Crop Protection Council, 702.
- Çakır, Ş. ve Yamanel, Ş., 2005. Böceklerde İnektisidlere Direnç. Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi, 6, 1, 21-29.
- Demirbağ Z., 2008. Entomopatojenler ve biyolojik mücadele, Esen Ofset Matbaacılık, Trabzon.
- Dolci, P., Guglielmo, F., Secchi, F. ve Ozino, O.I., 2006. Persistence and efficacy of *Beauveria brongniartii* strains applied as biocontrol agents against *Melolontha melolontha* in the Valley of Aosta (northwest Italy), Journal of Applied Microbiology 100, 1063-1072.
- Donovan-Peluso M., Wasti, S.S. ve Hartmann, G.C., 1980. Safety of entomogenous fungi to vertebrate hosts, Applied Entomology and Zoology 15, 498-499.
- Dromph, K.M. ve Vestergaard, S., 2002. Pathogenicity and attractiveness of entomopathogenic hyphomycete fungi to collembolans, Applied Soil Ecology, 21, 197-210.
- Eilenberg, J., Hajek, A. ve Lomer, C., 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control, Biocontrol, 46, 387-400.

- El-Kadi, M.K., Xara´, L.S., De Matos, P.F., Da Rocha, J.V.N. ve De Oliveira, D.P., 1983. Effects of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* on guinea pigs and mice, Environmental Entomology, 12, 37-42.
- Erbaş, Z., Gökçe, C., Hazır, S., Demirbağ Z. ve Demir İ., 2014. Isolation and identification of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) from the Eastern Black Sea region and their biocontrol potential against *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 38, 187-197.
- Fargues, J., Goettel, M.S., Smits, N., Quedraogo, A., Vidal, C., Lacey, L.A., Lomer, C.J. ve Rougier, M., 1996. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes, Mycopathologia, 135, 171-181.
- Faria, M.R. 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.
- Fatu, A.C., Dinu, M.M. ve Andrei, A.M., 2018. Susceptibility of some Melolonthine scarab species to entomopathogenic fungii *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch And *Metarhizium anisopliae* (Metsch.), Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies, 22.
- Fernandez, S., Groden, E., Vandenberg, J. ve Furlong, M., 2001. The effect of mode of exposure to *Beauveria bassiana* on conidia acquisition and host mortality of colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. Journal of Invertebrate Pathology, 77(3), 217-226.
- Ginsberg, H.S., Lebrun, R.A., Heyer, K. ve Zhioua, E., 2002. Potential nontarget effects of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) used for biological control of ticks (Acari: Ixodidae), Environmental Entomology, 31, 1191-1196.
- Goettel, M.S., Hajek, A.E., Siegel, J.P. ve Evans, H.C., 2001. Safety of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson C, Magan N, editors. Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential, Wallingford, UK: CABI International. 347-376.
- Goettel, M.S., Eilenberg, J., ve Glare, T., 2005. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. In L. I. Gilbert & S. S. Gill (Eds.), Comprehensive molecular insect science, 361-406.
- Gulsar B., Subahasan, K. ve Iyer, R., 2004. Occurrence and Distribution of Entomopathogenic Nematodes in White Grub Endemic Areas of Kerala, Journal Plant Crops, 32, 333-334.
- Hajek, A.E., 1993. New options for insect control using fungi. pp. 54-62. In: LUMSDEN, R.D., VAUGHN, J.L. (Eds.), Pest Management Biologically Based Technologies. Washington, D.C. American Chemical Society, 435.



- Hokkanen, H.M.T., Zeng, Q.Q. ve Menzler, H.I., 2003. Assessing the impacts of *Metarhizium* and *Beauveria* on bumblebees. In: Hokkanen HMT, Hajek AE, editors. Environmental impacts of microbial insecticides, 63-71.
- Hozzank, A., Keller, S., Daniel, O. ve Schweizer, C., 2003. Impact of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) on *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Lumbricidae). IOBC/WPRS Bulletin, 26, 31-34.
- Hunt, T.R., Moore, D., Higgins, P.M. ve Prior, C., 1994. Effect of sunscreens, irradiance and resting periods on the germination of *Metarhizium flavoviride* conidia. Entomophaga, 39, 313-322.
- Hynes, R.K. ve Boyetchko, S.M., 2006. Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. Soil Biological Biochemistry 38, 845–849.
- Ignoffo, C.M. ve Garcia, C., 1992. Influence of conidial color on inactivation of several entomogenous fungi (Hyphomycetes) by simulated sunlight, Environmental Entomology, 21, 913-917.
- Kabaluk, T. ve Gazdik, K., 2005. Directory of microbial pesticides for agricultural crops in OECD countries, Agriculture and Agri-Food Canada, 242.
- Kanga, L.H.B., Jones, W.A. ve James, R.R., 2003. Field trials using the fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) to control the ectoparasitic mite, varroa destructor (Acari: Varroidae) in honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies, Journal of Economic Entomology, 96, 1091-1099.
- Kence, M., 1988. The ecological genetics of malathion resistance in house fly *Musca domestica*. PhD Thesis. METU, Ankara,.
- Kılıç, E., Güven, Ö., Baydar, R. ve Karaca, I., 2018. The mortality effects of some entomopathogenic fungi against *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera littoralis*, *Tenebrio molitor* and *Blattella germanica*. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 25, 1, 33-37.
- Kim, J.S., Kassa, A., Skinner, M., Hata, T. ve Parker, B.L., 2011. Production of thermotolerant entomopathogenic fungal conidia on millet grain. Journal of Industry Microbiology & Biotechnology, 38, 6, 697–704.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter D.W. ve Stalpers, J.A., 2008. Dictionary of the fungi (10th ed.). Wallingford, UK: CAB International.
- 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.

- Ling, X., Yaguan, Z., Zihong, C., Kai, C. ve Xiaona, Y., 2017. Biocontrol of 4 entomogenous fungi on different stages of *Tenebrio molitor*. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 30, 8, 1784-1789
- Loera-Corral, O., Javier P.L.J., Montesinos, M.R. ve Favela, T.E., 2016. Microbial-Based Biopesticides Methods and Protocols Travis R. Glare ve Maria E. Moran-Diez, Humana Press, 61-70.
- Lord, J.C., 2007. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. Journal of Invertebrate Pathology, 89 (1), 19–29.
- Lyn, M.E., Burnett, D., Garcia, A.R. ve Gray, R., 2010. Interaction of water with three granular biopesticide formulations, Journal of Agriculture and Food Chemistry, 58, 1804–1814.
- Moore, D., Bridge, P.D., Higgins, P.M., Bateman, R.P. ve Prior, C., 1993. Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens, Annals of Applied Biology, 122, 605-616.
- Moore, D., Bridge, P.D., Higgins, P.M., Bateman, R.P. ve Prior, C., 1995. Long-term storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in oil formulations for the control of locusts and grasshoppers. Biocontrol Science and Technology, 5, 193–199.
- Moore, D., Higgins, P.M. ve Lomer, C.J., 1996. Effects of simulated and natural sunlight on the germination of conidia of *Metarhizium flavoviride* gams and rozsygal and interactions with temperature. Biocontrol Science and Technology, 6, 63-76.
- Müller-Kögler, E., 1965. Pilzkrankheiten bei Insekten. Anwendung zur biologischen Schadlingsbekämpfung und Grundlagen der Insektenmykologie, 444.
- Neethling, D.C. ve Dent, D.R., 1998. *Metarhizium anisopliae*, isolate IMI 330189: A mycoinsecticide for locust and grasshopper control. The 1998 Brighton Conference: Pests and Diseases, 37–42.
- Niemczyk, M., Sierpińska, A., Tereba, A. ve Sokołowski, K., 2019. Natural occurrence of *Beauveria* spp. in outbreak areas of cockchafers (*Melolontha* spp.) in forest soils from Poland, BioControl, 64, 159–172.
- Prior, C., Jollands, P. ve Le Patourel, G., 1988. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Invertebrate Pathology, 52, 66 – 72.
- Ramle, M., Norman, K., Ang, B.N., Ramlah, A.A. ve Mohd, B.W., 2007. Application of Powder Formulation of *Metarhizium anisopliae* To Control *Oryctes rhinoceros* In Rotting Oil Palm Residues Under Leguminous Cover Crops, Journal of Oil Palm Research, 19, 319-331.

- Rangel, D., Braga, G., Flint, S.D., Anderson, A.J. ve Roberts, D.W., 2004. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. Journal of Invertebrate Pathology, 87, 77-83.
- Roberts, D.W., 1989. Word Picture of Biological Control of Insects by Fungi, Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 84, 89-100.
- Sevim, A., 2010. Doğu karadeniz bölgesi'nden entomopatojenik fungusların izolasyonu, karakterizasyonu ve virulanslarının belirlenmesi, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Sezen, K. ve Demirbağ, Z., 2007a. A new isolate of *Melolontha melolontha* entomopoxvirus in Turkey: Morphology, infectivity and prevalence in the field, Applied Entomology and Zoology, 41, 471-477
- Sezen, K., Demir, İ. ve Demirbağ, Z., 2007b. Identification and pathogenicity of entomopathogenic bacteria from common cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae), New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 35, 79-85.
- Shadduck, J.A., Roberts, D.W. ve Lause, S., 1982. Mammalian safety tests of *Metarhizium anisopliae*. Preliminary results. Environmental Entomology 11, 189-192.
- Shah, P.A., Douro-Kpindou, O.K., Sidibe, A., Daffe, C.O., Van der Pauuw, H., Lomer, C.J. 1998. Effects of the sunscreen oxybenzone on field efficacy and persistence of *Metarhizium flavoviride* conidia against *Kraussella amabile* (Orthoptera: Acrididae) in Mali, West Africa. Biocontrol Science and Technology, 8, 357-364.
- Sönmez, E., 2016. Toprakaltı Zararlılarına Karşı Fungal Suşların Seçimi Ve Granül Formülasyonunun Üretilmesi, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2016.
- Stathers, T.E., Moore, D. ve Prior, C., 1993. The effect of different temperatures on the viability of *Metharhizium flavoviride* conidia stored in vegetable and mineral oils. Journal of Invertebrate Pathology, 62, 111 – 115.
- Steinhaus, E.A., 1949. Principles of insect pathology. New York: McGraw-Hill Book Company, 757.
- Steinhaus, E.A., 1956. Microbial control: The emergence of an Idea, Journal of Agriculture Science, 26, 107-160.
- Takatsuka, J., 2007. Characterization of *Beauveria bassiana* isolates from Japan using intersimple-sequence repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification, Applied Entomology and Zoology, 42, 563-571.
- Tartanus, M., Łabanowska1, B.H, Tkaczuk, C., Malusá, E. ve Chałańska, A., 2016. Holistic approach for an effective control of white grub of european cockchafer

(*Melolontha melolontha*) in organic strawberry plantations in Poland, Researchgate, 227-229.

Ummudi, V.R.S. ve Vadlamani, P., 2014. Preparation and use of oil formulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Spodoptera litura* larvae, African Journal of Microbiology Research, 8, 1638-1644.

URL-1, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

URL2, <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/findik/Belgeler/MayisBocegi.pdf>

URL-3, <https://www.almstead.com/insect-controls.html>

URL-4, <https://www.ukbeetles.co.uk/melolontha-melolontha>

URL-5, <https://www.dreamstime.com/illustration/melolontha-life.html>

URL6, [https://kayseri.tarimorman.gov.tr/Belgeler/patates\\_bocegi.pdf](https://kayseri.tarimorman.gov.tr/Belgeler/patates_bocegi.pdf)

Wraight, S.P., Jackson, M.A. ve de Kock, S.L., 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson C, Magan N, editors. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. Wallingford, UK: CABI International, 253-287.

Wraight, S.P. ve Ramos, M.E., 2017. Effects of inoculation method on efficacy of wettable powder and oil dispersion formulations of *Beauveria bassiana* against Colorado potato beetle larvae under low-humidity conditions. Biocontrol Science and Technology, 27(3), 348–363.

Zimmermann, G., 1982. Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, 40,36-40.

Zimmermann, G., 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, Biocontrol Science and Technology, 17, 879-920.

## ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında İstanbul'un Beykoz ilçesinde doğdu. İlköğrenimini Fatin Hoca İlköğretim Okulu'nda, liseyi Ahmet Ferit Lisesi'nde tamamlamıştır. 2015 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde lisans öğrenimini tamamlamıştır. 2016 Eylül ayında başladığı Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.

