

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TOPRAK ALTI ZARARLILARINA KARŞI FUNGAL SUŞLARIN SEÇİMİ VE  
GRANÜL FORMÜLASYONUN ÜRETİLMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Emine SÖNMEZ**

**EYLÜL - 2016  
TRABZON**



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

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TOPRAK ALTI ZARARLILARINA KARŞI FUNGAL SUŞLARIN SEÇİMİ VE GRANÜL  
FORMÜLASYONUN ÜRETİLMESİ**

**Emine SÖNMEZ**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde**  
**"DOKTOR (BİYOLOJİ)"**

**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 01 / 08 / 2016**

**Tezin Savunma Tarihi : 01 / 09 / 2016**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. İsmail DEMİR**

**Trabzon 2016**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun / / gün ve sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda  
**DOKTORA TEZİ**  
olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Üyeleri**

**Başkan :** .....

**Üye :** .....

**Üye :** .....

**Üye :** .....

**Üye :** .....

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

"Toprak Altı Zararlılarına Karşı Fungal Suşların Seçimi ve Granül Formülasyonun Üretilmesi" isimli bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda 'Doktora Tezi' olarak hazırlanmıştır.

Doktora tez konusunu belirleyen, çalışmalarım sırasında karşılaştığım tüm güçlüklerin üstesinden gelmemi sağlayan, her türlü desteği ve imkanı vaktinde sağlayarak, çok kıymetli bilgilerinden yararlandığım, aynı zamanda gerektiğinde ailemin yokluğunu aratmayan danışmanım sayın Prof. Dr. İsmail DEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Labaratuvarında maddi manevi imkanları sağlayan sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ'a, tez çalışmalarımın çeşitli aşamalarında desteklerini esirgemeyen hocalarım sayın Prof. Dr. Kazım SEZEN ve sayın Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU'na, tezimin her aşamasında desteğini esirgemeyen hocam Yrd. Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU'na, ve tüm mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına şükranlarımı sunuyorum.

Ayrıca tezin ana fikrinin oluşmasında yardımlarını esirgemeyen Swansea Üniversitesi'nden (UK) Prof Dr. Tariq BUTT'a teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, tezimin her aşamasında emeği geçen kuzenim Yüksek Mühendis Necmi Murat TANGAY'a ve hayatımın en yorucu yolculuğunda benden destek, anlayış ve sabrını hiçbir zaman esirgemeyen, beni yetiştiren ve bugün olduğum yeri borçlu olduğum annem, babam ve kardeşlerime teşekkürlerimi sunuyorum.

Emine SÖNMEZ  
Trabzon 2016

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum ‘‘Toprak Altı Zararlularına Karşı Fungal Suşların Seçimi ve Granül Formülasyonun Üretilmesi’’ başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. İsmail DEMİR’in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 01/08/2016

Emine SÖNMEZ

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ .....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER .....	V
ÖZET .....	VIII
SUMMARY .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER DİZİNİ .....	XIII
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Türkiye’de Üretilen Çeşitli Tarım Ürünleri ve Bunların Ekonomideki Yeri.....	6
1.3. Tarımsal Zararlılar .....	7
1.4. Toprak Altı Zararlıları ve Ekonomik Etkileri .....	8
1.4.1. Adi Mayıs Böceği .....	9
1.4.2. Zararlılarla Genel Mücadele Yöntemleri .....	11
1.4.3. Kimyasalların Çevreye Olan Etkileri .....	12
1.4.3.1. İnsektisitlerin İnsanlar Üzerine Olan Etkileri .....	14
1.4.4. Biyolojik Mücadele .....	16
1.4.4.1. Entomopatojenik Funguslar (EPF).....	18
1.4.4.1.1. Entomopatojenik Fungusların Mikrobiyal Mücadelede Kullanımı .....	18
1.4.4.1.2. Fungal Sporların Konaklarıyla İlişkisi .....	21
1.4.4.1.3. Fungal Enfeksiyon .....	22
1.4.4.1.4. Entomopatojenik Fungusların Etki Mekanizması.....	23
1.4.4.1.5. Entomopatojenik Fungusların Biyopestisit Olarak Geliştirilmesi .....	25
1.4.4.1.6. Suş Seçimi .....	26
1.4.4.1.7. Formülasyon ve Uygulama Stratejileri .....	29
1.5. Tezin Amacı .....	30

2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	31
2.1.	Çalışmada Kullanılan Funguslar .....	31
2.2.	Adi Mayıs Böceği ( <i>Melolontha melolontha</i> L.) Örneklerinin Toplanması ve Laboratuvarında Beslenmesi .....	32
2.3.	Tarama Testi.....	32
2.4.	Fungusların <i>Pr1</i> Gen İçeriğinin Belirlenmesi .....	33
2.4.1.	Fungal DNA'nın İzolasyonu .....	33
2.4.2	<i>Pr1</i> Geninin PCR ile Çoğaltılması .....	34
2.5.	Enzim-substrat Testi.....	35
2.5.1.	İzolatların Kültüre Edilmesi .....	35
2.5.2.	Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi .....	36
2.6.	Ardışık Pasajlamanın Fenotipik, Genotipik ve Biyokimyasal Dejenerasyona Etkisinin Belirlenmesi .....	36
2.6.1.	Ardışık Pasajlamanın Fenotipik Dejenerasyona Etkisinin Belirlenmesi..	37
2.6.2.	Ardışık Pasajlamanın Virulans Üzerine Etkisinin Belirlenmesi .....	37
2.6.3.	Ardışık Pasajlamanın Genotipik Dejenerasyona Etkisinin Belirlenmesi.	38
2.6.3.1.	RAPD-PCR .....	38
2.6.3.2	Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesim .....	38
2.6.4.	Ardışık Pasajlamanın Biyokimyasal Dejenerasyona Etkisinin Belirlenmesi .....	39
2.6.4.1	Proteolitik Aktivitenin Belirlenmesi .....	39
2.6.4.2	Esteraz Profillerinin Belirlenmesi .....	39
2.7.	Fungal Konidilerin Kuru Formülasyonu .....	40
2.7.1	Fungal Konidilerin Sıvı Besiyerinde Büyütülmesi .....	40
2.7.2	Fungal Konidilerin Katı Substrat Üzerinde Büyütülmesi .....	41
2.8.	Veri Analizi .....	41
3.	BULGULAR .....	42
3.1.	Tarama Testi Sonuçları .....	42
3.2.	<i>Pr1</i> Gen İçeriklerinin Tespiti ve Taksonomik Pozisyonlarının Belirlenmesi .....	43
3.3.	Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi .....	45
3.4.	Ardışık Pasajlamanın Fenotipik Dejenerasyona Etkisinin Belirlenmesi.	46
3.5.	Ardışık Pasajlamanın Virulans Üzerine Etkisinin Belirlenmesi .....	50
3.6.	Ardışık Pasajlamanın Genotipik Dejenerasyona Etkisinin Belirlenmesi	53

3.6.1.	RAPD-PCR .....	53
3.6.2.	Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesim .....	58
3.7.	Ardışık Pasajlamanın Biyokimyasal Dejenerasyona Etkisinin Belirlenmesi .....	61
3.7.1.	Proteolitik Aktivitenin Belirlenmesi .....	61
3.7.2.	Esteraz Profillerinin Belirlenmesi .....	62
3.8.	Fungal Konidilerin Kuru Formülasyonu .....	63
4.	TARTIŞMA .....	64
5.	SONUÇLAR .....	71
6.	ÖNERİLER .....	73
7.	KAYNAKLAR .....	74
8.	EKLER .....	88
ÖZGEÇMİŞ		



Doktora Tezi

ÖZET

TOPRAK ALTI ZARARLILARINA KARŞI FUNGAL SUŞLARIN SEÇİMİ VE  
GRANÜL FORMÜLASYONUN ÜRETİLMESİ

Emine SÖNMEZ

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. İsmail DEMİR  
2016, 90 Sayfa, 3 Sayfa Ek

Bu çalışmada tarım alanlarında önemli ekonomik kayıplara neden olan toprak altı zararlılarına karşı granüler formda etkili bir fungal biyopestisit üretmek amacıyla laboratuvar koleksiyonundan seçilen 9 adet *Metarhizium anisopliae* suşu, biyopestisit üretim çalışmalarına başlamadan önce kararlılık testlerine tabi tutuldu. Fungusların, önemli bir toprak altı zararlısı olan *Melolontha melolontha* larvaları üzerine patojenite testleri yapılarak, yüksek öldürücü etkiye sahip olan suşları belirlendi. Daha sonra aynı suşların *Pr1* gen içerikleri tespit edilerek, tümünün bu geni içerdikleri belirlendi. Tüm izolatlar için var olan genin uygun substrat varlığında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Yapılan bu deneyler sonucunda KTU-2, Gg-12, KTU-51 ve KTU-60 daha sonraki çalışmalarda kullanıldı. Belirlenen suşların ardışık 12 kez pasajları yapılarak, pasajlamanın morfolojik (koloni morfolojileri, renk değişimi, fertil olmayan alan oluşumu, spor üretimi ve sporların UV'ye karşı dirençliliği), virulans (*Galleria mellonella* larvaları üzerine biyotestler), genotipik (RAPD-PCR ve Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesim) ve biyokimyasal (Proteolitik aktivitenin ve Esteraz Profillerinin belirlenmesi) etkileri belirlendi. Deney sonuçları analiz edildiğinde en kararlı suşların KTU-2 ve KTU-60 olduğuna karar verildi. Seçilen suşlar katı fazlı fermantasyon yöntemi kullanılarak pirinç üzerinde konidiaların büyütülmesi ile Türkiye'de ilk defa başarılı bir şekilde fungal bir biyopestisit prototip haline getirilmiş oldu.

**Anahtar Kelimeler:** Kararlılık, *Pr1*, *Metarhizium anisopliae*, biyopestisit.

PhD Thesis

SUMMARY

SELECTION OF FUNGAL STRAINS AGAINST SUBTERRENEAN PESTS AND  
PRODUCTION OF GRANULAR FORMULATION

Emine SÖNMEZ

Karadeniz Technical University  
Institute Of Science And Technology  
Biology Department  
Advisor: Prof. Dr. İsmail DEMİR  
2016, 90 Page, 3 Additional Pages

In this study, 9 *Metarhizium anisopliae* strains, selected from laboratory collection in order to produce an effective fungal biopesticide with granular form against subterrenean pests causing significant economic losses in agriculture, were subjected to stability tests before biopesticide production studies. By realising pathogenicity tests on *Melolontha melolontha* larvae which are important subterrenean pests, strains of fungi with high lathel effect were determined. Later, *Pr1* gene contents of same strains were determined and it was seen that all these strains were included this gene. Enzyme activity measurements for all isolates, with the presence of appropriate substrate of the existing gene, were realised. After these tests; KTU-2, Gg-12, KTU-51 and KTU-60 were used in later studies. By consecutively realising 12 passaging operations on determined strains, morphological (colony morphologies, change of colour, formation of infertile area, spore production and resistivity of spores to UV), virulence (bioassays on *Galleria mellonella* larvae), genotypic (degestion with RAPD-PCR ve Restriction Endonucleases), biochemical (determination of proteolytic activity and esterase profiles) effects of passaging were determined. After analysing test results, it was decided that the most stable strains were KTU-2 and KTU-60. That is the first time, successfully, in Turkey that by growing up conidia on rice with solid phase fermentation, selected strains were converted to a fungal biopesticide prototype.

**Keywords:** Stability, *Pr1*, *Metarhizium anisopliae*, biopesticides.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Böceklerin bir bitki üzerinde etkili olarak zarar oluşturduğu kısımlar .....	8
Şekil 2. <i>Melolontha melolontha</i> (Adi mayıs böceği) .....	10
Şekil 3. <i>Melolontha melolontha</i> 'nın hayat döngüsü.....	11
Şekil 4. Böcek kütikulasındaki fungal enfeksiyon basamaklarının gösterimi .....	23
Şekil 5. İzolatların <i>M. melolontha</i> larvalarına karşı patojeniteleri ve kadavralar üzerindeki mikozlanma oranları.....	43
Şekil 6. Entomopatojenik fungusların <i>Pr1</i> gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması .....	43
Şekil 7. Fungal izolatların <i>Pr1</i> gen dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı .....	45
Şekil 8. Fungal izolatların üç farklı sıcaklıkta gösterdiği enzim aktivitesi .....	46
Şekil 9. KTU-2 izolatının pasajlarına ait kültürlerin SDA üzerindeki görüntüleri. ....	47
Şekil 10. Gg-12 izolatının pasajlarına ait kültürlerin SDA üzerindeki görüntüleri .....	47
Şekil 11. KTU-51 izolatının pasajlarına ait kültürlerin SDA üzerindeki görüntüleri .....	49
Şekil 12. KTU-51 izolatının pasajlarına ait kültürlerdeki “V” şeklindeki steril alan oluşumu.....	49
Şekil 13. KTU-60 izolatının pasajlarına ait kültürlerin SDA üzerindeki görüntüleri .....	50
Şekil 14. KTU-2 izolatına ait pasajların <i>G. mellonella</i> larvalarına karşı patojeniteleri ve kadavralar üzerindeki mikozlanma oranları.....	50
Şekil 15. Gg-12 izolatına ait pasajların <i>G. mellonella</i> larvalarına karşı patojeniteleri ve kadavralar üzerindeki mikozlanma oranları.....	51
Şekil 16. KTU-51 izolatına ait pasajların <i>G. mellonella</i> larvalarına karşı patojeniteleri ve kadavralar üzerindeki mikozlanma oranları.....	52
Şekil 17. KTU-60 izolatına ait pasajların <i>G. mellonella</i> larvalarına karşı patojeniteleri ve kadavralar üzerindeki mikozlanma oranları.....	52
Şekil 18a. İzolatlardan elde edilen pasajların OPA-3 bölgesinin RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılması .....	53

Şekil 18b. İzolatlardan elde edilen pasajların OPA-3 bölgesinin RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılması .....	54
Şekil 19a. İzolatlardan elde edilen pasajların OPA-8 bölgesinin RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılması .....	54
Şekil 19b. İzolatlardan elde edilen pasajların OPA-8 bölgesinin RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılması .....	55
Şekil 20a. İzolatlardan elde edilen pasajların OPB-4 bölgesinin RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılması .....	55
Şekil 20b. İzolatlardan elde edilen pasajların OPB-4 bölgesinin RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılması .....	56
Şekil 21a. İzolatlardan elde edilen pasajların OPB-7 bölgesinin RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılması .....	56
Şekil 21b. İzolatlardan elde edilen pasajların OPB-7 bölgesinin RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılması .....	57
Şekil 22a. İzolatlardan elde edilen pasajların OPE-1 bölgesinin RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılması .....	57
Şekil 22b. İzolatlardan elde edilen pasajların OPE-1 bölgesinin RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılması .....	58
Şekil 23. İzolatlardan elde edilen pasajların, Nested-PCR yöntemi ile çoğaltılmış <i>Pr1</i> gen bölgesinin <i>Rsa</i> I endonükleaz enzimi ile kesimi .....	59
Şekil 24. İzolatlardan elde edilen pasajların, Nested-PCR yöntemi ile çoğaltılmış <i>Pr1</i> gen bölgesinin <i>Hpa</i> II endonükleaz enzimi ile kesimi .....	60
Şekil 25. İzolatlardan elde edilen pasajların, Nested-PCR yöntemi ile çoğaltılmış <i>Pr1</i> gen bölgesinin <i>Dde</i> I endonükleaz enzimi ile kesimi .....	60
Şekil 26. <i>Metarhizium</i> izolatlarının ardışık pasajlarının N-succinly-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA substratı ile muamele edilmesi sonucu gösterdiği enzim aktiviteleri.....	62
Şekil 27. <i>Metarhizium</i> izolatlarının ardışık pasajlarının NATIVE-PAGE üzerindeki aktif enzim profilleri.....	62
Şekil 28. <i>Metarhizium</i> izolatlarına ait ardışık pasajların kuru formülasyonları .....	63

## TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Türkiye’de ürün kaybına sebep olan toprak altı zararlıları .....	9
Tablo 2. Biyolojik mücadelede kullanılan mikrobiyal mücadele etmenleri .....	17
Tablo 3. Ticari olarak geliştirilmiş, geliştirilmeye devam edilen ve potansiyel olarak dikkate alınan entomopatojenik funguslar .....	20
Tablo 4. Entomopatojenik funguslar tarafından üretilen bazı metabolitler.....	24
Tablo 5. Entomopatojen fungusların kararlılığı: Ardışık pasajlamanın virulansa etkisi...	27
Tablo 6. Çalışmada kullanılan <i>Metarhizium</i> cinsine ait farklı suşlar .....	31
Tablo 7. Nested PCR’da kullanılan gen bölgeleri ve primer sıraları .....	34
Tablo 8. <i>M. anisopliae</i> izolatlarının <i>Pr1</i> gen bölgesi içeriklerinin diğer izolatlarla benzerlikleri .....	44
Tablo 9. UV’nin <i>Metarhizium</i> izolatlarının germinasyon oranına etkisi .....	48

## SEMBOLLER DİZİNİ

ARSEF	: USDA-ARS entomopatojenik fungus koleksiyonu
bp	: Baz çifti
C	: Derece
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EPF	: Entomopatojenik fungus
I:K	: Işık: karanlık
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NCBI	: Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Enformasyon Merkezi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
SDA	: Sabouraud dekstroz agar
pol	: Polimeraz
SPSS	: Sosyal Bilimlerde İstatistik Paketi
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
$\mu$	: Mikro
$\mu$ g	: Mikrogram
$\mu$ L	: Mikrolitre
$\mu$ M	: Mikromolar
SSF	:Kati Fazlı Fermantasyon

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

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

Birçok virüsün böceklerin hastalanmasına neden olarak böcek salgınlarını etkiledikleri bilinmektedir (Steinhaus, 1956; Demir vd., 2009a; Demir vd., 2009b; Ince vd., 2007; Demir ve Demirbağ, 2006; Demir vd., 2013; Demir vd., 2014). Çiğneyici ağız yapısına sahip böcekler, özellikle yaprak yiyenler, virüs enfeksiyonlarına karşı daha hassastır. Bu durumda yaprak yiyen Lepidoptera tırtıllarıyla, Hymenoptera'nın yalancı tırtılları viral etmenlerden daha fazla zarar görürler (Weiser, 1969). Bu virüsler genellikle 2-3 yılda bir meydana çıkan epidemilerde çoğalarak birçok larvayı öldürürler ve böylece afetlerini ortadan kaldırırlar (Lipa, 1975). Virüsler birçok böcek takımıyla ilişkilidir. Bununla birlikte büyük bir kısmı Lepidoptera (%83), Hymenoptera (%10) ve Diptera (%4) takımlarında bulunmaktadır.

Böceklerde parazit olarak yaşayan ve bazı durumlarda ölümlerine yol açan birçok nematod türü bulunmaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda birçok nematod familyasına ait türlerin, böcekler ve diğer omurgasız hayvanlarla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Poinar, 1979, 1990; Kaya ve Stock, 1997; Yılmaz vd., 2009; Erbas vd., 2014;

Gokce vd., 2013; Gokce vd., 2015). Yapılan çalışmalar, zararlı böceklerin biyolojik mücadelesinde kullanılma potansiyeli taşımaları bakımından 7 familya üzerinde yoğunlaşmıştır. Bunlar Mermithidae, Tetradenematidae, Allantonematidae, Phaenopsitylenchidae, Sphaerulariidae, Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarıdır (Kaya ve Stock, 1997). Nematodların biyolojik mücadelede kullanılma potansiyelleri sadece böceklerle sınırlı değildir. Rhabditidae familyasına ait *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Schneider) türü, birçok tarımsal ürünün fidelerinde zarar yapan sümüklü böcek (*Deraceras sp.*) türlerinin ölümünü sağlar (Wilson ve Gaugler, 2000). Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyaları günümüzde, özellikle toprak böceklerinin mikrobiyal mücadelesinde en sık kullanılan gruplardır (Liu vd., 2000; Lacey vd., 2001). Bu nematodlar, *B. thuringiensis*'den sonra, Amerika'da yıllık 2-3 milyon dolarlık pazar satışlarıyla en fazla kullanılan mikrobiyal mücadele etmenleridir (Georgis, 1997).

Protozoonların zararlı böcek popülasyonlarında meydana getirdikleri salgınlar, az rastlanılan bir durum olmasına karşın, neden oldukları bireysel ve küçük gruplar halindeki ölümler, zararlı böcek popülasyonlarının zarar eşiğinin altında tutulması bakımından önemlidir (Maddox, 1987; Ignoffo, 1977). Protozoa enfeksiyonları böcek popülasyonlarını dengede tutması bakımından büyük bir öneme sahiptirler (Maddox, 1987; Ignoffo, 1977). Entomopatojenik protozoonlar genellikle konağa özeldirler. Böceklerde oluşturdukları hastalıklar yavaş ilerler. Virulansları düşüktür ve çoğu kez böceklerde kronik enfeksiyonlar oluştururlar. Virulanslarının düşük olması nedeniyle protozoonların enfekte ettiği böceklerin ölümü bazen haftalar sürebilir (Hoffman ve Frodsham, 1993). Çoğu entomopatojenik protozoonun hayat döngüsü komplekstir. Sadece canlı konak içerisinde gelişebilirler ve çoğu türün gelişimini tamamlayabilmesi için bir ara konağa ihtiyacı vardır.

En yaygın şekilde kullanılan mikrobiyal mücadele etmeni *Bacillus thuringiensis* Berliner bakterisidir. Entomopatojen bakteriler, günümüzde zararlı böceklere karşı en fazla kullanılan mikroorganizmalardır (Çakıcı vd., 2014; Eski vd., 2015; Ozsahin vd., 2014; Ozkan-Cakıcı vd., 2014; Ozgen vd., 2013; Demirci vd., 2013; Danismazoglu vd., 2012; Secil vd., 2012; Demir vd., 2012; Sevim vd., 2012; Gokce vd., 2010; Kati vd., 2010; Ince vd., 2008; Sezen vd., 2007; Sezen vd., 2005; Sezen vd., 2004; Demir vd., 2002). Spor oluşturanlar ve spor oluşturmayanlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Böceklerle mücadelede, daha çok spor oluşturan bakteriler kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar, bunların sporlarının kuraklık ve yüksek sıcaklığa karşı dayanıklı olduğunu göstermiştir. Spor



oluşturmayan bakteriler ise olağanüstü koşullar karşısında oldukça dayanıksız ve hassastır. Buna göre, böceklere karşı yapılacak mücadelede, spor oluşturan ve fakültatif bakterilerin kristal taşıyanlarının kullanılması tavsiye edilmektedir (Oğurlu, 2000).

Son yıllarda patojenik potansiyeli hayli yüksek bir bakteri olan *Bacillus thuringiensis* üzerinde durulmaktadır. Bu bakterinin biyolojik mücadelede, diğer birçok bakteriye nazaran daha etkili olduğu bilinmektedir. *B. thuringiensis*'in çok sayıda varyetesi vardır. Bunlar, başta Lepidoptera olmak üzere Diptera ve Coleoptera türlerine karşı da kullanılmaktadır. Bu bakterinin spor ve kristalleri piyasaya toz, ıslanabilir toz veya sulu karışım halinde sunulmaktadır. *B. thuringiensis*'den hazırlanan karışımların uygulandığı böcekler, bu karışımların ihtiva ettiği toksin sebebiyle ölürlür.

Mikrobiyal insektisitlerin satışları son yıllarda büyük artış göstermiştir. Ancak, bu miktar toplam ürün koruma satışlarının %1-1,5'lük kısmını teşkil etmektedir. Bu miktarın çok büyük bir kısmını (%95) *Bacillus thuringiensis* kökenli insektisitler oluşturmaktadır (Gaugler, 1997; Georgis, 1997).

Entomopatojenik funguslar pek çok zararlı böceğin doğal olarak kontrol altına alınmasında önemli bir etmen olup, bu organizmalar zararlı böcek popülasyonlarında sık sık geniş yayımlı epizootiklere neden olmaktadır. Pek çok entomopatojenik fungus direkt olarak böcek kütikulasından enfeksiyon yapmaktadır. Bu nedenle fungal etmenlerin konak tarafından yenilmelerine gerek yoktur. Bu özellik entomopatojenik fungusları özellikle bitki özsuyu ile beslenen böceklerin mücadelesinde öncü aday konumuna getirmektedir. Şimdiye kadar birçok entomopatojen fungus böceklerden izole edilmiştir ve bunların tarım zararlıları üzerinde insektisidal aktiviteleri tespit edilmiştir (Sevim vd., 2010a; Sevim vd., 2010b; Tanyeli vd., 2010, Sevim vd., 2013, Demir vd., 2013, Sevim vd., 2014, Kocacevik vd., 2015, Sönmez vd., 2016, Sönmez vd., DOI: 10.3906/tar-1412-10, Kocacevik vd., 2016). Günümüzde, Dünya çapında entomopatojenik funguslardan oluşan pek çok ticari preparat bulunmaktadır ve bunlar çeşitli zararlılarla mücadelede kullanılmaktadır (Goettel vd., 2005).

Dünyada ve Türkiye'de hızlı nüfus artışına paralel olarak, tarımsal üretimin ve gıda arzının aynı oranda ve sürekli olarak artırılması imkanları kısıtlıdır. Bununla birlikte ortaya çıkan açlık sorunu, küresel bir felaket halini almaktadır. Bu felakete engel olmak için tarımda birim alandan elde edilebilecek verimi artırmak için yeni tarım tekniklerinin geliştirilmesi ve uygulanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Tarımda meydana gelen farklı çözüm önerilerine rağmen, günümüzde açlık sorunu halen devam etmektedir. Bu sorun,

Dünya’da üretim miktarındaki azlıktan ziyade gıda dağılımındaki dengesizlikten kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla, tarımda üretim sistemlerinde yeni arayışlar ve sağlıklı gıda elde edilmesi giderek önemi artan bir konu haline gelmiştir. Gıda güvenilirliğini tehlikeye iten en önemli faktörlerden birisi de üretim sırasında verimi ve kaliteyi azaltan bitki hastalık ve zararlılarına karşı kullanılan kimyasallardır.

Ülkemizde birçok orman ve tarım zararlısı bulunmakta ve bunlarla mücadele çoğunlukla kimyasal ilaçlar kullanılarak yapılmaktadır. Kullanılan kimyasal ilaçlar böceklerin bu ilaçlara karşı direnç kazanmalarına, çevredeki faydalı böceklerin, bal arılarının, kuşların ve balıkların ölmelerine, besin zinciri yoluyla insanlara ulaşarak birçok kalıcı ya da öldürücü hastalıklara neden olmaktadır (Ecevit, 1988 ve Peter, 1984). Oysa, biyolojik mücadele kimyasal mücadelenin getirebileceği birçok problemi ortadan kaldırmaktadır. Gelişmiş ülkelerin hepsinde biyolojik mücadele ön planda tutulmakta ve bu konu üzerindeki çalışmalar daha ileriye götürülmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda geliştirilen biyolojik mücadele etmenleri birçok ülkede ticari olarak üretilmekte ve satışa sunulmaktadır. Bu amaçla, Dünya çapında biyolojik mücadele etmenlerini üreten ve pazarlayan birçok biyoteknolojik kuruluş mevcuttur.

Entomopatojenik funguslar mikrobiyal mücadele etmeni olarak 100 yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır. Genel olarak, birçok böcek takımı fungal hastalıklara karşı duyarlıdır ve entomopatojenik funguslar zararlı böceklere karşı mikrobiyal mücadele etmeni olarak iyi bir potansiyele sahiptir (Roberts, 1989). Şimdiye kadar, en azından 90 cinsine ait 700 entomopatojenik fungus türü tanımlanmış ve bunlardan *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) ve *Verticillium lecanii* gibi bazı türler ise birçok ülkede pek çok zararlıyla mücadelede ticari olarak üretilerek kullanılmaktadır (Rath, 2000). *M. anisopliae* yaklaşık 130 yıldır zararlı böcek popülasyonlarının kontrolünde etkin bir şekilde kullanılmaktadır. *M. anisopliae*, *B. bassiana* ve *B. brongniartii* türleri ile kıyaslandığında yeryüzünde hem toprakta hem de böcekler üzerinde daha yaygın bulunmakla birlikte, inundatif kontrol çalışmalarında ve mikoinsektisit olarak kullanım oranı daha yüksektir (Zimmermann, 2007a). Tür ile ilgili dünya genelinde büyük miktarda karakterizasyon çalışmaları, çevresel faktörlerin gelişim ve dağılımına etkileri, aynı ortamı paylaştığı omurgalılarla ve diğer omurgasızlarla olan etkileşimi ve çeşitli güvenlik sorunları hakkında araştırmalar yayınlanmıştır (Zimmermann, 2007a). Farklı kıta ve ülkelere ait farklı *Metarhizium* varyete ve suşlarından elde edilen veriler sonucunda

(1) *M. anisopliae*'nin tipik bir toprak orjinli fungus türüdür ve tropiklerden kutuplara kadar dünyanın farklı yerlerine yayılmış farklı genotipleri içerir. (2) Entomopatojenik bir tür olarak geniş bir konak spektrumuna sahip olmakla birlikte türün bazı suş ve genotipleri genellikle daha seçicidir. (3) Bu tür çeşitli metabolit ve toksinler üretir, bunların başında farklı biyolojik aktivitelere sahip olan destruksin gelir. (4) Türün su yüzeyinde ve suyun içindeki akibeti ve davranışı bilinmemekle birlikte, topraktaki hareketliliği ve dayanıklılığı ile ilgili pek çok çalışma mevcuttur. (5) *M. anisopliae* geniş ölçüde farklı organizmalar üzerinde test edilmiştir. Bu testler sonucunda bitkiler ve toprak organizmaları üzerinde herhangi bir olumsuz etkisinin bulunmadığı sonucuna varılmıştır. (6) Bazı balıklarda ve sürüngenlerde patojenik etkilere rastlanmakla birlikte kuşlarda herhangi bir olumsuz etki görülmemiştir. (7) Son yıllarda insanlarda ve memelilerde doğal enfeksiyonlar görülmekle birlikte, memelilerde yapılan güvenlik testleri sonuçları negatif çıkmıştır ve üretimde kullanılan aplikatörlerde veya çalışan personelde herhangi bir olumsuz etkiye rastlanılmamıştır. Bu bilgiler doğrultusunda *M. anisopliae*'nin minimal risklerle birlikte güvenilir bir tür olduğu sonucuna varabiliriz (Zimmermann, 2007a). Tüm Dünya'da çeşitli zararlı böceklerden entomopatojenik funguslar izole edilmesine ve bunlara karşı biyolojik mücadele etmeni olarak geliştirilmesine rağmen, ülkemizde bu tip çalışmalar son derece azdır. Ülkemizde çeşitli izolasyon, karakterizasyon ve insektisidal aktivite çalışmaları yapılmıştır (Sevim vd., 2010a; Sevim vd., 2010b; Tanyeli vd., 2010). Bu çalışmalarda değişik zararlılar üzerinde öldürücü etkileri oldukça yüksek çok sayıda tür veya alttür elde edilmiştir. Mikrobiyal insektisitler, küresel pestisit satışlarının  $>1\%$ 'ini oluşturmakla beraber zararlıların mikrobiyal organizmalarla kontrol altına alınması önem kazanmaktadır. Bu durumun sebebi ise kimyasal insektisitlere karşı artropodların direnç geliştirmesiyle beraber artan maliyettir. Son yıllarda maliyetinin yanı sıra kimyasalların biyotik ve abiyotik etkileri göz önünde bulundurulduğunda mikrobiyal insektisitlerin kullanımı yılda % 10-25 oranında artış göstermektedir (Koul ve Dhaliwal, 2002). Bunun dışında mikrobiyal pestisitler tarım alanlarında zararlıların kontrol altına alınmasında etkili olan yeni ajanların keşfedilmesine olanak sağlar (Koul ve Dhaliwal, 2002). Biyopestisit geliştirilmesinde temel çalışmalar *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, entomopatojenik funguslar ve bakülovirüslerden elde edilmiştir. Bu veriler doğrultusunda özellikle Doğu Karadeniz Bölgesi'nin iklim koşulları göz önünde bulundurulduğunda, fındık ve orman zararlılarına karşı biyolojik mücadele etmeni tespit etmeye ve geliştirmeye ihtiyaç vardır.

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

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

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

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

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

Kendine özgü tat ve aromalarıyla zevkle tüketilen ve güzel görünüşleriyle sofralarımızı süsleyen sebzeler, beslenmemizde önemli bir yere sahiptir. Özellikle içerdikleri vitaminler ve mineral maddeler ile lif bakımından zengin olan sebzelerin bazılarının protein içerikleri de göz ardı edilemeyecek kadar fazladır. İyi bir beslenme programı ile yeteri kadar

sebze tüketildiğinde, günlük vitamin ve mineral madde gereksiniminin tamamının veya tamamına yakın bir bölümünün karşılandığı bilinmektedir.

Sebze tarımı birim alanda yarattığı yüksek verim ve sağladığı net gelir nedeniyle, her geçen gün daha fazla dikkat çekmektedir. Türkiye’de sebze üretimi, 1960’tan 2000’e kadar oldukça düzenli ve hızlı bir artış eğilimi izlemiş, üretim her 10 yıllık dilimde yaklaşık %50 oranında artmıştır. Türkiye, sebze dış ticaret dengesi bakımından net olarak ihracatçı konumundadır ve ihracat miktarları da giderek yükselme eğilimindedir. Türkiye’nin sebze ihtiyacını karşılamak ve ihracat miktarını artırmak için tarımda sebze zararlıları ile kimyasal mücadele yönteminden vazgeçilerek, derhal biyolojik mücadele yöntemine eğilim gösterilmelidir.

### **1.3. Tarımsal Zararlılar**

Yukarıda belirtildiği gibi tarım alanlarında önemli miktarlarda çeşitli tarımsal ürünler üretilmektedir. Bunlar, farklı miktar ve oranlarda insan ve diğer canlılar için önemli besin kaynakları olarak tüketilmektedir. Ayrıca, bunların üretimlerini yapan üreticilere sağladıkları ekonomik katkılar da oldukça önemlidir. Özellikle bir tarım ülkesi olduğumuzu düşünecek olursak, bu üretimin bizim için ne kadar daha büyük bir öneme sahip olduğu ortaya çıkmaktadır. Çeşitli çevresel, iklimsel ve kültürel etkiler yukarıda belirtilen ve önemi vurgulanan tarım ürünlerinin üretiminde etkili olmaktadır. Bu etkiler zaman zaman önemli ürün kayıplarına da neden olmaktadır. Zararlı böcekler de bitkisel ürün kayıplarında önemli bir yer tutmaktadır. Çevresel olarak bakıldığında bitkilerin farklı kısımlarını etkileyen çok sayıda zararlı vardır (Şekil 1). Bunlar, bitkilerin kök uçlarından başlayarak, yaprak, sürgün, tomurcuk, meyve gibi bütün kısımların üzerinde farklı miktar ve oranlarda zararlar oluşturmaktadır (URL-1). Bu zarar ve etkinin yeri ve derecesine bağlı olarak da, bitki tamamen kuruyabildiği gibi, önemli derecelerde bitkisel yapı ve ürün kayıpları ortaya çıkmaktadır. Sonuç olarak bundan üreticiler, tüketiciler ve ihracatçılar dolayısıyla tüm ülke etkilenmektedir.



Şekil 1. Böceklerin bir bitki üzerinde etkili olarak zarar oluşturduğu kısımlar (Halkalar, bitkinin kök ucundan en uç noktaya kadar zararlarının etkili olduğu muhtemel zararlı gruplarını ve zarar şeklini göstermektedir.) (URL-1)

#### 1.4. Toprak Altı Zararlıları ve Ekonomik Etkiler

Tarım alanlarından elde edilen ürünler, başta insanlar olmak üzere, yeryüzünde yaşayan çok sayıda canlı için besin kaynağı olarak kullanılmaktadır. Türkiye tarım ülkeleri arasında ilk sıralarda yer almasından dolayı hem üretici hem de tüketiciler açısından toprağın ve ürünün miktarı ile kalitesi oldukça önemlidir. Tarımda üretimde iklim koşulları, çevresel etmenler ve insanların etkisi gibi pek çok sorun görülmektedir. Bu sorunların çoğu ya üründe verimin düşük olmasına ya da direkt ürün kaybına neden olmaktadır. Ürün kaybına sebep olan en önemli faktörlerden birisi de tarım alanlarında ekonomik zarara neden olan zararlı böceklerdir. Bunlar, bitkilerin kök ucundan başlayarak, yaprak, sürgün, tomurcuk ve meyve gibi bitkinin tüm kısımlarında zarar oluşturabilme potansiyeline sahiptir. Bu zararlılardan bir kısmı bitki köklerini kemirerek, kalın kök ve yumruların içine girer, bazıları yeni dikilmiş

fidelerin köklerini keserek bitkinin kurumasına neden olur, bazıları ise çimlenmekte olan tohumları ve yumrulu bitkilerin toprak içindeki yumrularını da yiyerek ürün kaybına neden olurlar. Türkiye’de ürün kaybına sebep olan zararlı böceklerden bir kısmı Tablo 1’de görülmektedir.

Tablo 1. Türkiye’de ürün kaybına sebep olan önemli toprak altı zararlıları

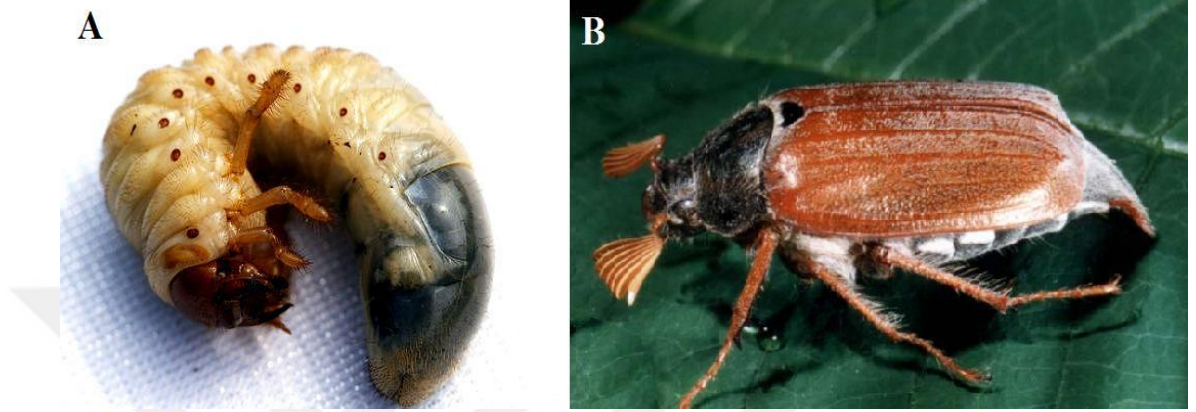
Bilimsel Adı	Türkçe Adı	Takım-Aile	Zararı
<i>Agrotis ipsilon</i>	Bozkurt	Lepidoptera: Noctuidae	Bitki
<i>Agrotis segetum</i>	Bozkurt	Lepidoptera: Noctuidae	Bitki
<i>Agriotes obscurus</i>	Telkurdu	Coleoptera: Elateridae	Bitki
<i>Agriotes lineatus</i>	Telkurdu	Coleoptera: Elateridae	Bitki
<i>Anisoplia spp.</i>	Ekin bambulu	Coleoptera: Rutelidae	Ürün
<i>Delia brassicae</i>	Lahana sineği	Diptera: Anthomyiidae	Ürün
<i>Delia platura</i>	Tohum sineği	Diptera: Anthomyiidae	Ürün
<i>Gryllotalpa gryllotalpa</i>	Danaburnu	Orthoptera: Gryllotalpidae	Ürün
<i>Melolontha melolontha</i>	Mayıs böceği	Coleoptera: Scarabaeidae	Bitki
<i>Psila rosae</i>	Havuç sineği	Diptera: Psilidae	Ürün

Ülkemizde çeşitli meyve fidanı ve ağaçları ile asmaların köklerinde zarar yapan *Polyphylla spp.*, *Melolontha spp.*, *Anoxia spp.* cinsine bağlı türler de bulunmaktadır. Bunlar içinde en önemlileri *Polyphylla turkmenoglui Petr.*, *P. Fuilo L.* ve *Melolontha melolontha L.*’dir. *M. melolontha* larvaları halk arasında “kadı lokması” ,“manas” veya “adi mayıs böceği” olarak isimlendirilir (T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı, 2011).

#### 1.4.1. Adi Mayıs Böceği (*Melolontha melolontha L.*) (Coleoptera:Scarabaeidae)

Coleoptera takımına ait olan Adi mayıs böceği, *Melolontha melolontha L.*, meşe, dişbudak, ladin, göknar ve fındık gibi fidanlıklarda büyük ekonomik kayıplara neden olan etkili bir tarımsal toprak altı zararlılarından biridir (Tuncer ve Ecevit 1997, Sezen 2004). Sadece fındık üzerindeki etkisi dikkate alındığında zararlı, fındık ağaçlarının köklerini yiyerek her yıl fındık üretiminde yaklaşık % 20-30 oranında ekonomik zararlara sebep olur.

Adi mayıs böceği erginleri genellikle kızıl kahverengi renklidir. Larvalar tombul, beyaz ve kıvrık C şeklindedir. Larvaların vücutlarının son halkası çok büyümüş ve şişmiş bir hal almıştır. Bu kısım, içerisindeki besin nedeniyle siyahımsı görülür (URL-2) (Şekil-2).



Şekil 2. *Melolontha melolontha* (Adi mayıs böceği). A: Larva, B: Ergin (URL-2)

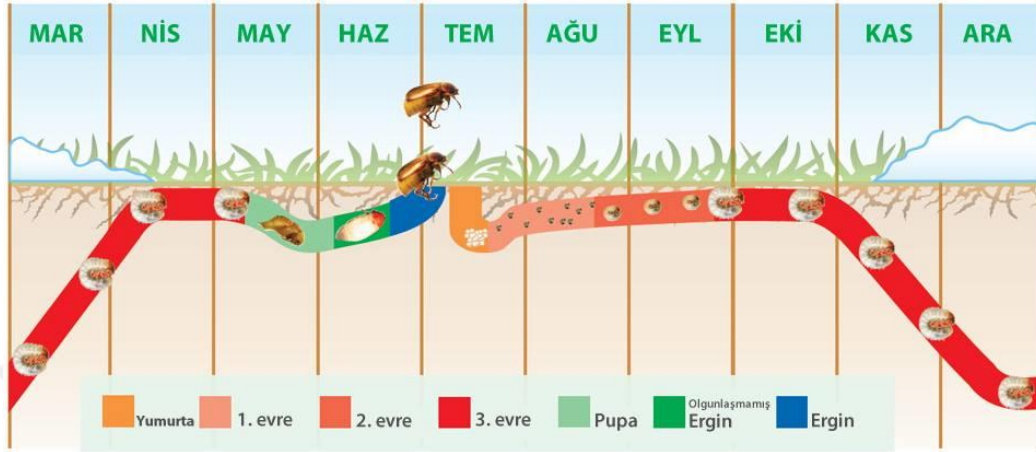
Havaların ısınmasıyla nisan-mayıs aylarında erginler topraktan çıkmaya başlar (Şekil 3). Güneş battıktan sonra uçarak ağaçlara konan erginler çiftleşerek yumurtalarını işlenmemiş ve üzeri otlanmış bahçelerde toprağa bırakır. Bir dişi ortalama 60 yumurta üretir. Yumurtadan çıkan larvalar toplu halde yaşayıp, otların köklerini kemirir ve 2 ay sonra gömlek değiştirerek ikinci dönem larva olurlar.

İkinci dönem larvalar oburca beslenir. Larvalar sonbaharda kışı geçirmek için toprağın derinliklerine inerler. Bu derinlik Karadeniz Bölgesinde yaklaşık 50 cm kadardır. Mart- nisan aylarında önemli zararlar yapacak bir beslenme başlar ve bu, haziran başına kadar devam eder. Daha sonra bir gömlek daha değiştirerek üçüncü dönem larva haline gelirler. Üçüncü dönem larva süresi bir yıldır ve bu dönemde larvalar önemli zararlar yapar. Temmuz ayında toprak yüzeyinden 15-35 cm derinde topraktan bir yuva içerisinde pupa olurlar. Eylülde ergin hale geçen pupalar yuvayı terk etmeyip, ertesi yıl ilkbahara kadar burada kalmaya devam eder. Bu şekilde yumurtadan çıkan birey 3 yıl sonra ergin olur, dolayısıyla 3 yılda bir döl verir (Şekil 3).

Larvalar, ilk dönemlerinde toprak yüzeyine yakın otların kökleri üzerinde beslendiklerinden derin köklerde zarar oluşturmazlar. Fakat ikinci döneme geçen larvalarda gelişme hızlanır ve daha derinlere indiklerinden ot köklerinden uzaklaşıp, ağaç ve



ağaççıkların kökleriyle beslenirler. Larvalar ağaçlarda 1 cm çapına kadar olan köklerini kolayca koparıp, saçak kökleri tahrip edebilirler.



Şekil 3. *Melolontha melolontha*'nin hayat döngüsü (URL-3)

#### 1.4.2. Zararlılarla Genel Mücadele Yöntemleri

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

**Doğal mücadele:** İnsanın herhangi bir yardımı olmadan doğal kuvvetlerle böcek popülasyonlarının kontrol altında tutulmasıdır. Çevre direncinin bir sonucu olarak böceklerin önemli bir kısmı ya çoğalmadan ya da çoğaldıktan sonra ölürler.

**Yasal mücadele:** Yasal yollardan yararlanarak, zararlıların yayılmasını önlemektir. Karantina, ambargo, muayene ve sertifika uygulamak bunların başında gelir.

**Mekanik mücadele:** Böcekleri çeşitli yöntemlerle toplamak, pusuya düşürmek, yem tuzakları kurmak, feromonlar kullanmak, tuzak odunları hazırlamak veya gıda değişimi yapmak sureti ile yapılan mücadele şeklidir.

Fiziksel mücadele: Sıcaklık ve nemden yararlanarak böceklerin öldürülmesi, elektrik veya radyoaktivite kullanarak böceklerin kısırlaştırılması işlemlerini içeren mücadele yöntemidir.

Kültürel mücadele: Toprak bakımı, işlenmesi ve gübrenmesi, yabancı ot ve atıkların temizlenmesi ve bitki nöbetleşmesi gibi toprakla ilgili yapılması gereken işleri kapsar.

Kimyasal mücadele: Çeşitli kimyasal maddelerin toz veya sulu halde kullanılması sureti ile yapılan mücadeledir. Ülkemizde çok yaygın olmasına rağmen, çevreye verdiği olumsuz etkilerden dolayı günümüzde, gelişmiş ülkelerde yavaş yavaş bu yöntemden vazgeçilmektedir. Bu mücadele ülkemiz fındık bahçelerinde en çok kullanılan mücadele yöntemidir. Bu mücadele uygulanırken, birçok yan etkileri ortaya çıkmaktadır ve bu yüzden birçok canlı grubu zarar görmektedir.

Biyolojik mücadele: Zararlı böcek popülasyonlarının dolayısıyla böceklerin zararını 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 mücadele yöntemidir (Demirbağ, 2008).

### 1.4.3. Kimyasalların Çevreye Olan Etkileri

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

Zararlı böceklerle mücadelede 1800'lü yılların ortalarına kadar, zararlıların toplanması veya yıkanması şeklinde mücadele ediliyordu. Bu tarihten sonra önce kükürt ve arsenik, daha sonraları ise kurşun asetat, kryolite ve borik asit gibi çok az kimyasal madde böceklere karşı kullanıldı. Dikloro-difenil-trikloroetan (DDT)'nin keşfinden önceki 1940'ların başına kadar zararlılar tarafından üründe meydana gelen kaybın dünya ortalaması

%7 iken, 1980'lerin sonuna doğru bu kayıp %13'e yükselmiştir. Bu ürün kaybındaki iki katlık artış, ilaç devriminden sonra başlamış ve aynı dönem içinde ilaç kullanımında ise 12 katlık bir artış meydana gelmiştir. Ürün kayıplarındaki bu artış, ilaçlara dayanıklılığın artması, potansiyel zararlıların ekonomik zararlı durumuna geçmesi ve doğal düşmanların öldürülmesinden kaynaklanmıştır. Bunlara insan ve hayvan sağlığının tehdit edilmesi, gıda maddelerindeki ilaç kalıntıları, çevre kirlenmesi ve yüksek ilaç fiyatları da eklenince, kimyasal mücadeleye alternatif çevre dostu ve daha ucuz mücadele yöntemlerine geçilmesi zorunlu hale gelmiştir.

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

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

Insektisitlerin etki tarzı bakımından zararlı ve faydalı böcekler arasında bir farklılık yoktur. Fakat etkileri bakımından farklılık vardır. Faydalı böcekler olarak kabul edilen

predatör ve parazitler insektisitlerden daha fazla etkilenmektedir. Ne yazık ki parazit ve predatörlerdeki dayanıklılığın oluşumu, zararlı böceklerdeki kadar çabuk olmamaktadır. Bunun sonucu olarak, zararlı popülasyonları üzerinde dengeleyici olan predatörler ve parazitler ortadan kalkmakta ve zararlılar daha çabuk yayılmaktadır (Ecevit, 1988).

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

#### **1.4.3.1. İnsektisitlerin İnsanlar Üzerine Olan Etkileri**

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

Bursa'da 1963 yılında, parathionla ilaçlanmış şeftali yiyen 32 kişiden 7'sinin aynı gün ölmesi akut toksisiteye örnek verilebilir. İnsektisitlerin üretim ve kullanımları sırasında meydana gelen iş kazaları, bu ilaçların insan sağlığına karşı olumsuz etkilerini çok çabuk bir şekilde göstermesine sebep olmaktadır. Örneğin, Hindistan'ın Bhopal kentinde 1984 yılında, ABD'ye ait Union Carbide Şirketi'nin bir fabrikasından çevreye yayılan yaklaşık 45 ton

metil izosiyonat gazı, civardaki 2500 kişiyi uykularında öldürmüş ve fabrika çevresindeki çok geniş bir alanı yaşanmaz hale getirmiştir. Aradan 4 yıl geçtikten sonra dahi, fabrika çevresindeki köylülerden her yıl ortalama 500 kişinin ölmesi, tehlikenin boyutlarını göstermesi açısından oldukça önemlidir (Ünal, 1998).

Kronik toksisite ise bir kimyasalın akut toksisiteye neden olmayacak kadar düşük dozlarda uzun süre alınması halinde sıvakkanlılarda meydana getirdiği fizyolojik düzensizlik olarak tanımlanır (Ünal, 1998). İnsektisitlerle bulaşık veya bekleme süresi bitmeden insektisit kalıntısı içeren bitkisel besinlerin yenmesiyle de kronik toksisite meydana gelebilmektedir. Düşük dozlarda alınan bu insektisitlerin insan vücudunda birikimi sonucu, gelecek kuşaklarda neler meydana getireceğini de şimdiden tahmin etmek oldukça zordur. İnsektisitlerin sinir sistemi üzerindeki enzimlere etkili oluşu, önemlerini bir kat daha arttırmaktadır. Bugün özellikle fazla miktarlarda kullanılan klorlandırılmış hidrokarbonların insan ve hayvanların beyin, karaciğer, böbrek ve yağ dokularında toplanarak toksik etkide bulunduğu bilinmektedir (Ecevit, 1988).

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

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

#### 1.4.4. Biyolojik Mücadele

Bilim adamlarınca biyolojik mücadelenin tanımı uzun yıllardan beri tartışılmaktadır. Biyolojik mücadele terimi ilk kez 1919 yılında Harry Smith tarafından kullanılmış ve basitçe “zararlı popülasyonlarını doğal düşmanları vasıtasıyla baskı altına alma veya düzenleme” şeklinde ifade edilmiştir. Yazar burada doğal düşman olarak sadece parazitoit, predatör ve patojenleri kastetmiştir. Van den Bosch vd., (1982), biyolojik mücadele teriminin hem “uygulamalı biyolojik mücadele” yani “insanlar tarafından doğal düşmanların zararlılara karşı kullanılması” ve hem de “doğal biyolojik mücadele” yani “insanın müdahalesi olmadan doğada kendiliğinden oluşagelen baskıyı” ifade etmek üzere kullanıldığını belirtmektedir. DeBach (1974) biyolojik mücadeleyi doğal mücadelenin bir parçası olarak kabul etmekte ve ekolojik anlamda “parazitoit, predatör ve patojenlerle, herhangi bir zararlının popülasyon yoğunluğunu, bu etmenlerin olmadığı zamanki yoğunluğundan daha düşük düzeyde tutulmasını sağlayan düzenlemeler” olarak tarif etmektedir. DeBach (1974) doğal mücadeleyi ise “doğada canlı popülasyonlarının belirli bir zaman periyodunda iniş ve çıkışlarının bir veya daha çok doğal faktörler kombinasyonu tarafından düzenlenmesi” şeklinde tarif etmekte ve bu faktörleri biyotik ve abiyotik olarak iki gruba ayırmaktadır. Bu faktörler; doğal düşmanlar, besin, tür içi rekabet, türler arası rekabet, iklim ve diğer fiziksel faktörler, yer ve yaşam alanı istekleridir. Günümüzde ise biyolojik mücadele, "zararlı böceklerin yapmış olduğu zararı en aza indirmek için bu böceklerin doğal düşmanlarını kullanma" olarak tanımlanabilir. Doğal düşman terimi, predatör ve parazitlerle birlikte hastalık oluşturan mikroorganizmaları kapsamaktadır (Peter, 1984). Ancak, böceklerde hastalık oluşturan mikroorganizmaların kullanımı, genellikle mikrobiyal mücadele olarak adlandırılır. Biyolojik mücadele, kimyasal mücadelenin tüm olumsuz yönlerini ortadan kaldırması bakımından son yıllarda tercih edilmesi gereken bir mücadele yöntemi haline almıştır.

Biyolojik mücadelenin bir alt kolu olan mikrobiyal mücadele, zararlı böceklerle mücadelede patojen mikroorganizmaların kullanılmasını kapsar (Tablo 2). Entomopatojen olarak adlandırılan bu mikrobiyal mücadele etmenleri (bakteriler, virüsler, funguslar, nematodlar, protozoonlar) zararlı böceklerde hastalık oluşturarak böcek popülasyonlarının dengede tutulmasını ve zararlarının en aza indirilmesini sağlamaktadır. Bu entomopatojenlerin büyük bir çoğunluğu konağa özel olduğu için yalnızca mücadele

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

Tablo 2. Biyolojik mücadelede kullanılan mikrobiyal mücadele etmenleri

<b>Mikrobiyal Mücadele Etmeni</b>	<b>Patojenler</b>
Bakteriler	<i>Pseudomonas, Bacillus, Serratia, Photorhabdus, Xenorhabdus.</i>
Virüsler	Bakülovirüsler, Entomopoksvirüsler, İridovirüsler, Askovirüsler.
Funguslar	<i>Metarhizium, Beauveria, Verticillum, Paecilomyces, Fusarium.</i>
Nematodlar	<i>Heterorhabditis, Steinernema.</i>
Protozoanlar	Mikrosporlar ( <i>Nosema pyrausta, N. locustae</i> )

Biyolojik mücadele, diğer mücadele yöntemlerine göre doğal dengenin kurulmasına yardımcı olması, uzun vadede kalıcı sonuçlar vermesi ve nihai hedefe ulaştırabilmesi bakımından en çok tercih edilmesi gereken mücadele yöntemidir (Khan, 2012). Biyolojik mücadeleyi asıl önemli kılan, ekosistemi bozmaması ve zararlı türler üzerinde kalıcı ve dinamik bir etki meydana getirmesidir. Bu iki özellik diğer mücadele yöntemlerinde bulunmaz. Biyolojik mücadele diğer mücadele yöntemlerine göre, yan etkilerinin olmayışı, başlangıçta masraflı olsa da ilerleyen yıllarda ilk kuruluş harcamalarını tolere ederek en az masrafla en iyi sonucun alınabilmesine imkan vermesi, etkisini uzun süre devam ettirebilmesi, zararlılarda dayanıklılığa ve bağışıklığa yol açmaması ve zararlıyı direkt olarak öldürmekten başka, üreme gücünü azaltma ve gelişiminde dengesizlikler yaratma gibi dolaylı faydalar sağlaması bakımından birçok avantajlara sahiptir. Buna karşın esaslı bilgi gerektirmesi, başlangıçta risk taşıması ve neticenin geç alınması gibi tolere edilebilecek dezavantajları bulunmaktadır.

#### **1.4.4.1. Entomopatojenik Funguslar (EPF)**

Entomopatojenik funguslar böcek popülasyonlarının düzenlenmesinde önemli role sahiptir. Beş farklı sınıf içerisinde farklı bir diziliş göstermekte olan entomopatojenik funguslar özel böcek türlerini enfekte eden zorunlu patojenler, pek çok böcek türünü enfekte edebilen genel patojenler ve fakültatif patojenler olarak gruplandırılabilir. Fungal epizootikler bazı böcek türlerinde yaygın olmasına rağmen, bazı böcek türlerinde ise nadir görülür (Goettel vd., 2005). Entomopatojenik fungusların mikrobiyal mücadele etmeni olarak 100 yılı aşkın bir süredir kullanılmakta olduğu bilinmektedir (Hall vd., 1982). Şimdiye kadar tanımlanan 700'ün üzerinde entomopatojenik fungus bilinmekte ve bunlardan bazıları biyolojik mücadele etmeni olarak üretilmekte ve kullanılmaktadır (Strasser vd., 2000). Entomopatojenik fungus orjinli yaklaşık 150 ticari preparat 2007 yılından itibaren kullanımdadır ve üretimi devam etmektedir (Faria ve Wraight, 2007).

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

##### **1.4.4.1.1. Entomopatojenik Fungusların Mikrobiyal Mücadelede Kullanımı**

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

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



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

İnokülatif biyolojik mücadele ise biyolojik mücadele etmeni olan canlı bir organizmanın, mücadele bölgesine salınarak uzun bir süre zarfında çoğalması sonucu zararlı böceği kontrol altına almasıdır. Fakat, bu mücadele kalıcı değildir. Bu uygulama stratejisinde salınan organizmanın sayısı önemli değildir. Aksine biyolojik mücadele etmeninin salınan alanda çoğalması önemlidir. Genellikle alana düşük sayıda mücadele etmeni salınır. Bu kısmen de olsa salınan organizmanın kabul edilemez masraflarından kaynaklanmaktadır. Böcek patojenleri inokülatif mücadele için kullanılabilir. Örneğin, *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch (Deuteromycotina: Hyphomycetes) mayıs böceğiyle (*Melolontha melolontha* L. (Coleoptera: Scarabaeidae)) mücadele etmek için İsviçre'de kullanılmıştır. Buradaki amaç, salınan fungusun zaman içerisinde çoğalması ve uzun süreli bir mücadele elde edilmesiydi (Keller, 1997; Eilenberg vd., 2001). Bununla birlikte, *Entomophaga maimaiga* Amerika'da *Lymantria dispar* popülasyonlarında epizootik başlatmak amacı ile inokülatif olarak kullanılmıştır (Hajek ve Webb, 1999; Goettel vd., 2005).

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

(Goettel vd., 2005). Hyphomycetes funguslar inundatif biyolojik mücadele açısından büyük bir öneme sahiptir. Çünkü kitle üretimleri ve formülasyonları nispeten kolaydır ve geleneksel sprey uygulamalarıyla kolaylıkla uygulanabilmektedirler. Pek çok ticari ürün farklı tarım alanlarında zararlılar ile mücadelede kullanılmaktadır. Bunların bazı örnekleri Tablo 3’de verilmiştir (Shah ve Pell, 2003; Strasser vd., 2000; Cross vd., 1999; Lacey ve Goettel, 1995; Montesinos, 2003; Scholte vd., 2004; Milner, 2000).

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

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

Konzervatif biyolojik mücadele ise zararlı böceğin etkisini azaltmak için çevresel veya mevcut uygulamalarda değişiklikler yaparak alanda bulunan doğal düşmanın veya diğer organizmaların korunmasıdır (Eilenberg vd., 2001). Bu stratejide etmen salınımı yoktur fakat, tarım sistemleri ve uygulamaları doğal olarak mevcut olan düşmanı korumak veya

sayısını arttırmak için modifiye edilir. Bu sayede zararlı böcek popülasyonunun zarar eşiğinin altında tutulması amaçlanmaktadır (Goettel vd., 2005). Bu uygulamada ilk örnek, *Neozygites fresenii*'nin Amerika'da bulunan pamuk tarlalarındaki uygulamasıdır. Çiftçiler topladıkları afidlerin %15'inin bu fungusla enfekte olduğunu buldukları zaman mevcut patojeni korumak için herhangi bir insektisid uygulaması yapmadılar. Böylece, hem zamandan hem de paradan tasarruf ederek, çevresel kontaminasyonu azaltarak yararlı böcekleri de korumuş oldular (Shah ve Pell, 2003; Pell vd., 2001).

Fındık, insektisit kullanımı ve kültürel uygulamaların değişikliğiyle mevcut olan doğal düşmanların korunması sayesinde konzervatif biyolojik mücadeleye iyi bir aday ürün konumundadır (Ali Niازه, 1998).

#### **1.4.4.1.2. Fungal Sporların Konaklarıyla İlişkisi**

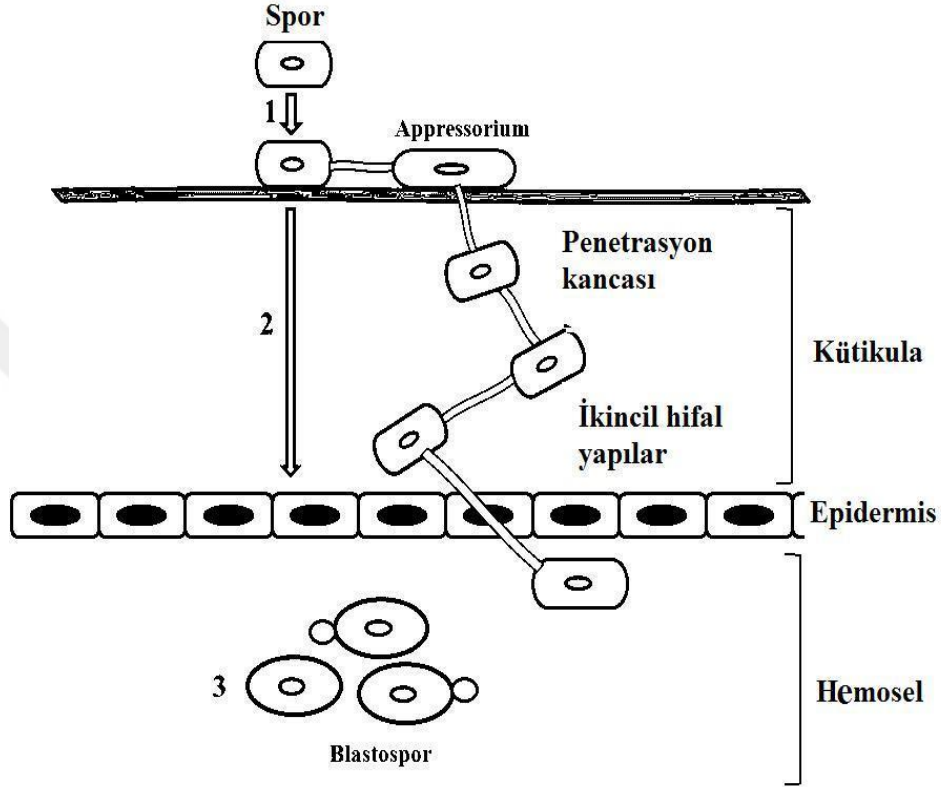
Entomopatojenik fungusların yaşam döngüleri çoğunlukla konaklarının gelişme safhaları ile eş zamanlı olarak gerçekleşmektedir (Shah ve Pell, 2003). Fakat, pek çok entomopatojenik fungus, hayat döngülerinde birçok benzerliğe sahiptir (Roy vd., 2006). Bakteri ve virüslerden farklı olarak, funguslar konaklarını yalnızca bağırsaktan değil, aynı zamanda böceklerin solunum deliklerinden ve integumentin yüzeyinden de enfekte edebilir. Bu özellik entomopatojenik fungusları böceklerin beslenme aktivitelerinden bağımsız olarak doğrudan enfekte edebileceği gerçeğini doğurmaktadır (Ferron, 1978). Bu durum bitkilerin öz sıvısı (başta afidler) veya hayvan kanı ile beslenen böceklerin mikrobiyal mücadelesinde entomopatojenik funguslara önemli avantajlar sağlamaktadır (Lacey ve Goettel, 1995). Entomopatojenik fungusların yaşam döngülerinde ilk olarak fungus enfektif bir spor üretir ve bu spor konağın kütikulasına tutunarak penetre olur. Penetrasyondan sonra spor çimlenerek germ tüpünü oluşturur ve bunu takiben appressorium oluşumu meydana gelir. Bu penetrasyon işlemi sıklıkla integumentin enfeksiyon bölgelerinde melanizasyon reaksiyonuna yol açmaktadır (Ferron, 1978). Melanizasyon sıklıkla geç olur veya yeterli büyüklükte olur. Bu da patojenin yavaş büyümesini veya gücünü durdurmasına yardımcı olur (Hajek ve Leger, 1994). Bundan sonra, fungus konağın hemoseline ulaşarak konağı istila eder ve konağı toksin üretimi veya çoğalma gibi nedenlerle öldürür. Uygun koşullar altında böceğin ölümünden sonra, fungus konaktan dışarı doğru sporlaşmaya başlar ve bu sporlaşma ya da konidiyogenezis kadavranın dış yüzeyinde meydana gelir (Goettel vd.,

2005; Shah ve Pell, 2003). Alternatif olarak, fungus primer konağın olmadığı zamanlarda taksonomik olarak birinci derecede ilişkili bir başka konağı enfekte edebilir. Benzer olarak, alternatif konağın enfeksiyonundan sonra konak ölür ve üretilen sporlar primer ilişkili diğer bireyleri enfekte edebilir. Bunun haricinde, enfeksiyon için uygun olmayan çevresel koşullarda, fungus, bu koşullara dayanıklı dinlenme yapılarını (resting spores) oluşturur. Bu yapı çevrede konak olmadığı zaman uzun bir süre varlığını sürdürebilmektedir. Dinlenme yapılarının kendisi enfektif özelliğe sahip değildir. Fakat yeniden enfektif spor oluşturabilir. Sporlaşmadan sonra çevreye yayılan sporlar başka konakları enfekte eder. Normal olarak bu yaşam döngüsünün pek çok istisnaları bulunmaktadır. Fakat önemli olan çevresel faktörlerin fungusun üremesi ve hayatta kalması için son derece önemli olmasıdır. (Goettel vd., 2005).

#### 1.4.4.1.3. Fungal Enfeksiyon

Entomopatojenik funguslar diğer böcek patojenlerinden farklı olarak konağın integümentinden enfeksiyon yapabilirler. Bu nedenle, konak tarafından yenilme gerekli değildir ve enfeksiyon çiğneme yapan böcekler ile sınırlı kalmaz (Fuxa, 1987). Genellikle eşeysiz olarak üreyen sporlar enfeksiyondan sorumludur ve enfeksiyondaki başlangıç aşaması pasif veya spesifik olmayan tutunmadır (Castrillo vd., 2005; Shah ve Pell, 2003). Bu adım böceğin kütikulasına temas için birçok farklı yol içermektedir. Örneğin, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* ve *Nomurae rileyi* durumunda, tutunma işlemi sporlarda yer alan iyi organize olmuş fasikül rodletler ve böcek kütikulası arasındaki hidrofobik ilişkinin sonucu olarak meydana gelir. Sucul ortamlarda yaşayan entomopatojenik funguslarda ise tutunma işlemi zoosporların kese oluşturması ile takip edilir (Castrillo vd., 2005). Tutunma işlemi takiben, sporlar konağın çeşitli bariyerlerinin üstesinden gelmek için fungusa yardımcı olan appressorium yapısını oluşturmak için çimlenmeye başlar (Hajek ve Leger, 1994). Bundan sonra, çimlenmiş spor kütikulanın içerisine penetre olur. Penetrasyon safhasında, proteaz, kitinaz ve lipaz gibi kütikulayı parçalayan bazı enzimler konağa girişte önemli rol oynamaktadır (Clarkson ve Chamley, 1996). Penetrasyonu takiben, hemoselin içerisindeki filamentöz fungus yapıları maya benzeri hifal yapılara veya protoplastlara (blastospor) geçiş yapar. Bu yapılar hemolenf içerisinde dolaşırlar ve tomurcuklanma ile çoğalırlar. Daha sonra tekrar filamentöz yapılara geçiş yapılarak fungus iç dokuları ve organları istila eder ve sonunda böcek ölür (Castrillo vd., 2005). Son olarak,

fungus ölmüş böcek üzerinde sporlaşır ve yeni oluşmuş sporlar başka bir konağı enfekte edebilir. Uygun koşullar altında, bu durum aynı şekilde devam eder. Fungal enfeksiyon işleminin ayrıntılı şeması Şekil 4’de verilmiştir.



Şekil 4. Böcek kütikulasındaki fungal enfeksiyon basamaklarının gösterimi. 1. Böcek kütikulası ve spor arasındaki fiziksel temastan sonra fungusun konağı tanıması spor çimlenmesini ve appressorium oluşumunu başlatır. 2. Penetrasyon kancası ve çeşitli hifal yapılar kütikula ve epidermisi geçer. 3. Fungusun hemosele girmesinden sonra blastospor oluşumu başlar ve fungus konağı istila eder (Castrillo vd., 2005).

#### 1.4.4.1.4. Entomopatojenik Fungusların Etki Mekanizması

Entomopatojenik funguslar, farklı metabolitler üreterek konaklarını birçok farklı şekilde öldürmektedir (Zimmermann, 2007b). Kimyasal olarak farklı toksik metabolitler *Beauveria*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Metarhizium*, *Paecilomyces* ve *Verticillium* gibi biyolojik mücadele etmenlerinde tanımlanmıştır. Bu metabolitlerden bazılarının önemli patojenite etmenleri olduğu bilinmektedir (Strasser vd., 2000). Şimdiye kadar birçok

araştırmacı *Beauveria* spp. ve *M. anisopliae* tarafından üretilen metabolitler üzerine odaklanmıştır. Çünkü bu iki fungus en önemli mikrobiyal mücadele etmenleridir. Bazı entomopatojenik funguslar tarafından üretilen bazı metabolitler Tablo 4’de verilmiştir (Zimmermann, 2007a; Zimmermann, 2007b; Strasser vd., 2000).

Tablo 4. Entomopatojenik funguslar tarafından üretilen bazı metabolitler

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

*Beauveria* spp. beauverisin, bassianin, bassianolide, oosporin, destruksin B gibi *in vivo* ve *in vitro* ortamda pek çok toksik bileşik üretmektedir (Zimmermann 2007a). Ayrıca, destruksinler (28 tip), sitokalsin C ve hidroksifungerin A ve B gibi metabolitler ise *Metarhizium* spp. tarafından üretilmektedir. Şimdiye kadar entomopatojenik fungusların hastalık sırasında herhangi bir toksini üretilip üretmedikleri veya virülans için toksin gerekir gerekeceği belirlenmemiştir. Quesada-Moraga ve Vey (2003) *B. bassiana*’nın çekirgelere karşı patojenik olması için toksin üretimine gerek duymadığını belirtmiştir. Bazı durumlarda, toksin üretiminden şüphelenilmesine rağmen, kesin olarak belirtilmemektedir. *Coelomycidium*, *Coelomomyces* cins ve Entomophthoralean ordosuna ait bir kısım funguslar bazı çok zayıf toksinlere sahip olabilir. Fakat, büyük ihtimalle, bu funguslar konaklarını hayati dokuları istila ederek öldürürler (Goettel vd., 2005). İlave olarak, fungal enfeksiyon konak hareketlerinde ateş artması, yüksek yerlere çıkma, aktivitede artış veya azalma, semikimyasallara karşı azalmış cevap ve üreme davranışlarında değişme gibi değişiklikler meydana getirebilir (Roy vd., 2006).

#### 1.4.4.1.5. Entomopatojenik Fungusların Biyopestisit Olarak Geliştirilmesi

Biyopestisidlerde olduğu gibi mikoinsektisidlerin etkinliğini etkileyen pek çok faktör vardır. Bunlar yavaş öldürme hızı, orta düzeyde etkinlik, zayıf depolanabilirlik, uygulama sonrası alanda kalma süresinin az olması ve üretim maliyetleri en önemlileri olarak sayılabilir. Fakat, suş seçimi, genetik mühendisliği, formülasyon ve uygulama teknikleriyle bu tür problemlerin üstesinden gelinir (Goettel vd., 2005).

Geçtiğimiz 50 yıl zararlı böcek popülasyonları, yabancı otlar ve bitki hastalıkları ile mücadelede fungal patojenlerin kullanımı geniş bir araştırma alanı oluşturmuştur ve bu araştırmalar ulaşılabilir pek çok ticari preparatın marketlerde yer alması ile sonuçlanmıştır (Butt vd., 2001; Charudattan 2001; Wraight vd., 2001; Fravel 2005; Faria ve Wraight 2007). EPF’lerden geliştirilmiş ticari preparatlar, genellikle yüksek miktarda enfektif fungal propagullerin zararlı böcek popülasyonlarının yoğun olduğu ortamlara uygulanması esasına dayanan, inundasyon kontrol yaklaşımı kullanılarak, zarar düzeyini minimuma indirmeyi amaçlar (Eilenberg vd., 2001).

Fungal bir biyolojik mücadele etmenini formüle etmek ve bunu ürüne dönüştürmek oldukça hassas bir konudur. Biyolojik mücadele etmeni maliyeti düşük, uygulaması kolay, raf ömrü uzun ve arazi koşullarında zararlı böcek popülasyonlarının kontrol altına alınmasında tutarlı olmalıdır. Bu niteliklerden herhangi birinin eksikliği biyolojik mücadele etmeninin ticari preparata dönüştürülmesi aşamasında başarısızlığa neden olabilir. Ürünün maliyeti ve depolanması esnasındaki kararlılık, formülasyonun geliştirilmesinde olumlu sonuçlar elde edilmesini sağlar. Genellikle bu üretim hedefleri tutarlı sonuçlara varabilmek ve zarar düzeyini minimuma indirmek için ekolojik ve çevresel koşullarla çatışma halindedir. Başka bir deyişle zararlı böcekler ile tarımsal sistem arasında ilişkiyi yönetmek için, zararlılarla mücadelede formüle edilmiş ürünün tek başına değil, entegre mücadele yöntemleriyle birlikte kullanılması gerekmektedir (Shah ve Pell 2003; Lacey ve Shapiro-Ilan 2008).

Günümüzde 150’yi aşan fungal ticari preparat geliştirilmiştir. Bu ürünlerin %75’inden fazlası *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* ve *B. brongniartii* türlerinden geliştirilmiştir (Faria ve Wraight 2007). Bu ürünlerden 2-3 tanesi katı substrat yüzeyinde büyütülmüş *B. bassiana* ve *M. anisopliae*’ya ait hazır konidialardan oluşmaktadır. Hem *B. bassiana* hem de *M. anisopliae* zengin katı besin ortamlarında büyütüldükten sonra

elde edilen aerial konidilerinin yüksek etkinlikleri sebebiyle geniş bir konak spektrumuna sahiptir (Jaronski, 1997). Ticari preperat üretiminde konidiaların kullanılması doğal enfektif propagul olmalarından dolayı garanti sonuçlar verir. Ancak konidiaların uygulandığı tarımsal alanlardaki farklı ekolojik ve çevresel faktörler her zaman doğru seçim olmayabilir. Örneğin *I. fumosorosea* konidialarının oda sıcaklığındaki raf ömrü aynı türün blastosporları ile karşılaştırıldığında konidiaların, blastosporlara oranla daha dayanıklı olduğu görülür (Vega, 1999).

Muhtemel fungal izolatların üretim ve formülasyon stratejileri geliştirilirken çevresel faktörler ve ekolojik koşulların getirdiği sınırlamalar mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır (Vega, 2009). Biyoteknolojik açıdan bakıldığında, farklı fungal propaguller besin içeriği ve çevresel koşullar değiştirilerek katı substratlarda ve derin fermentörlerde yetiştirilebilirler. Benzer şekilde fungal propagullerin fiziksel ve kimyasal özellikleri değiştirilerek, farklı çevresel koşullara uyum sağlayıp, daha yüksek oranda insektisidal aktivite gösterebilmeleri için farklı formülasyonlar da geliştirilebilir.

#### **1.4.4.1.6. Suş Seçimi**

Entomopatojenik funguslar genellikle genetik olarak heterojen suşlardan oluşmaktadır. Bu suşlar zararlı böceklerle karşı virulans gibi önemli karakteristik özellikler bakımından farklılık göstermektedir. Bu nedenle, zararlıya karşı en virulent suşun seçimi entomopatojenik fungusların etkinliğinin artırılmasında önemli bir rol oynayabilir. Bundan başka, çevresel koşullarda daha fazla devamlılık sağlayan diğer bazı önemli özellikler de suş seçiminde kullanılabilir. Fungal bir biyolojik mücadele etmeninin araştırılmasında yaygın olarak kullanılan ilk adım patojenitesi en yüksek suşun seçimidir (Goettel vd., 2005). Suş seçiminde kararlılığın in vitro ortamda sürdürülmesi, endüstriyel ölçekli biyopestisit üretiminde önemli rol oynar. Kararlılığı etkileyen bir diğer faktör ise entomopatojenik fungusların yapay besiyerindeki ardışık pasajlarında virulansın azalması yönündeki eğilimidir (Shah ve Butt, 2005; Lösch vd., 2010). Kararlı suşlar birkaç generasyon boyunca virulansını muhafaza edebilirken, kararlı olmayan suşlar birkaç pasaj sonrasında virulansını büyük ölçüde düşürmektedir (Butt, 2006; Lösch, 2010) (Tablo 5). Bu sebepten dolayı verimli ürün geliştirilmesi noktasında kararlı suş seçimi oldukça önemlidir.



Tablo 5. Entomopatojen fungusların kararlılığı: Ardışık pasajlamanın virulansa etkisi (Butt, 2006)

Patojen	İn vitro pasajlama stabilitesi	Enfekte böcekten itibaren pasajlama stabilitesi	Referans
<i>Beauveria bassiana</i>	-	Bezelye yaprak biti ile enfeksiyonun ardından virulansa artış.	Aizawa 1972.
<i>Beauveria bassiana</i>	Virulansa düşüş.	-	Samsinankova vd., 1981.
<i>Beauveria bassiana</i>	Virulansa herhangi bir değişim yok.	<i>Oryctes rhinoceros</i> larvalarının enfeksiyonunun ardından patojenitede artış yok.	Latch, 1976.
<i>Beauveria bassiana</i>	16 ardışık pasajlamanın ardından, <i>Leptinotarsa decemlineata</i> üzerinde virulansında düşüş.	-	Schaerffenberg 1964.
<i>Conidiobolus coronatus</i>	-	<i>Galleria mellonella</i> larvalarına 3 kez enfeksiyonun ardından, <i>Porthetria dispar</i> larvalarının ölüm oranında artış.	Hartman ve Wasti, 1974.
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Virulansa kayıp	-	Al-Aidroos ve Seifert, 1980
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Virulansa kayıp	<i>Oryctes rhinoceros</i> larvalarına enfeksiyonun ardındaki 3. veya 5. pasajlardaki patojenitede artış yok.	Latch, 1965.
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Virulansa kayıp, beyaz veya sarı sporlar ve sporilasyonda düşüş, küçük kromozomlarda kayıp.	Kromozom hasarından dolayı virulansın restorasyonu sağlanamıyor.	Wang vd., 2003.
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Virulansa kayıp, beyaz veya sarı sporlar ve sporilasyonda düşüş.	Virulansın restorasyonu duyarlı bir konağa (Örn; <i>Tenebrio molitor</i> ve <i>Galleria mellonella</i> larvaları) enfeksiyonun ardından pasajlama suretiyle sağlanabilir.	Shah vd., 2005.
<i>Metarhizium anisopliae</i>	dsRNA mycovirüslerinin bulunmadığı kültürler daha infeksiyöz.	Enfekte kenelerden izole edilen kültürler, in-vitro kültürlerden daha infeksiyöz.	Frazzon vd., 2000.
<i>Paecilomyces farinosus</i>	Virulansa kayıp, seyrek misel büyümesi, sporilasyonda düşüş.	Uygun konukçuya enfeksiyonun ardından pasajlandığında, virulansın restorasyon sağlanabilir.	Kawakami, 1960.
<i>Verticillium lecanii</i>	98 ardışık pasajlamanın ardından <i>Macrosiphoniella sanborni</i> üzerindeki virulansında düşüş yok.	Konukçu enfeksiyonunun ardından elde edilen ilk pasajın virulansında herhangi bir değişiklik yok.	Hall, 1980.

Fungus sporları konaklarının öncelikle kutikulasını istila ederek içeriye girmeye çalışırlar. Bu giriş şekli bitki patojeni funguslarla benzerdir ve mekanik basınç ve enzimatik

bozulmanın bir kombinasyonu sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Entomopatojenik fungus sporları kutikula komponentini degrade etmede kullanacağı birçok enzime sahiptir ve bu enzim çeşitliliği virulansın cinsten cinse hatta suştan suşa dahi farklılık göstermesine neden olur. EPF'ların böcek patogenezinde bilinen çeşitli proteolitik enzimler vardır. Bu enzimler kutikula degradasyonunda, hemolenfteki profenol oksidasyonunun aktivasyonunda ve virulansta görev alırlar. Protein degradasyonunda görev alan enzimler proteazlar, kollegenazlar ve Pr1 gibi kimoelastazlardır. Bunlardan başka entomopatojen fungus sporlarının böcek kutikulasına penetrasyonu esnasında esteraz ve ekzokitinaz aktivitesi, fungal ve kutikula içeriğinin desorbsiyonu sonrasında tespit edilmiştir (St Leger vd., 1987). Fungusların virulans farklılığını açıklamak için bu enzim çeşitliliğinin belirlenmesi gerekmektedir. Ratault ve Vey (1977) yaptığı bir çalışmada *M. anisopliae*'nin *Oryctes rhinoceros*'nin kutikulasına girişi esnasında özel olmayan esteraz ve ekzokitinaz enzimlerinin aktif olduğunu görmüştür. Michel vd. (cited in Fargues, 1984)'nin yaptığı kapsamlı bir çalışmada ise *B. bassiana*'nın *Galleria mellonella* larvasına girişi esnasında oluşan konidia ve penetrasyon kancasında lipaz/esteraz ve ekzokitinaz enzimlerinin aktif olduğunu göstermiştir.

*M. anisopliae* konidileri hücre duvarında Pr1 olarak adlandırılan subtilisin benzeri bir proteaz bulundurur. Bu enzim kutikulanın degradasyonunda, dolayısıyla virulansın belirlenmesinde önemli rol oynar (Leger, 1987; Shah ve Butt, 2005). Pr1 enzimi böcek kutikulası varlığında indüklenen, besin yetersizliği durumunda da çalışan ancak aşırı besin varlığında baskılanan bir enzimdir (Wang, 2002). Bu enzim böcek kadavralarında konidilerin çimlenmesi esnasında yeniden düzenlenirler (Small ve Bidockka, 2005). Kırık pirinç, yapay besiyeri veya böcek kutikulası gibi farklı substratlar üzerinde ardışık pasajlamalar sonucunda elde edilen Pr1 geninin virulans üzerine etkisi henüz açıklanamamıştır. Daha önce Shah vd., (2007) ve Hutwimmer vd., (2008)'nin yaptıkları çalışmalarda ardışık pasajlama işleminde olduğu gibi farklı konsantrasyonlardaki besin içeriklerinde Pr1 enziminin aktivitesine bağlı olarak virulansın değiştiği görülmüştür.

Virulansın azalmasından başka ardışık pasajlarda fenotipik dejenerasyon ve fizyolojik değişiklikler de EPF'ların ürün olarak geliştirilmesi noktasında dikkat edilmesi gereken parametrelerdir. EPF'ların yapay besiyerinde ardışık pasajlanmaları sonucunda renk değişimi, spor üretiminde azalmalar, germinasyonun yavaşlaması, fertil olmayan alan oluşumu gibi fenotipik değişiklikler görülmektedir. Ticari biyopreperatlarda implikasyon

oluşumu istenmeyen bir durumdur ve bu duruma sebep olan en önemli etkenlerden biri ardışık pasajlanan kültürlerde meydana gelen fertil olmayan alanlardır. Fertil olmayan alan oluşumunun sebebi genellikle mutasyon, transpozonlar ve dsRNA mikovirüsleri ile açıklanır (Becker vd., 2003). Fertil olmayan alanlarda bazı metabolitlerin ve sporların üretimi ilk kültüre göre daha düşüktür (Chu vd., 2002). Bu sebeple fertil olmayan alanı içeren kültürlerden üretilen formülasyonun spor üretimi düşük olacağından, bu duruma paralel olarak virulansı da düşük olacaktır. Bu durumda formülasyonun uygulandığı alandan düşük oranda verim elde edilecek bu da istenmeyen durumların oluşmasına neden olacaktır. Hall (1980) ve Vadenberg ve Cantone (2004)'ün yaptıkları çalışmalarda *Verticillium lecanii* ve *Paecilomyces fumosoroseus* türlerinin ardışık pasajlanmaları sonucunda fenotiplerinin değiştiğini ancak virulanslarında herhangi bir değişikliğin olmadığını rapor etmişlerdir. Marrow vd. (1989) yaptığı bir çalışmada ise *Nomuraea rileyi*'nin ardışık pasajlarında fenotipin değiştiğini ve bu fungusun maya benzeri hifal yapıları oluşturma ve kadavra üzerinde sporlanma oranında düşüş olduğunu belirtmiştir. Daha önce yapılan çalışmalar larval bir konak, fungal sporlar ile enfekte edildiğinde ve konak tarafından hızlı bir hücrel savunma mekanizması uyarıldığında, misellerin oluşum fazının, hif oluşum fazının aksine enfektif olmadığını gösterdi (Butt vd., 2006). Dejenerasyona uğramış kültürler ürün geliştirilmesi noktasında, ürünün ilgili konağa adaptasyonunda düşüşe sebep olacağından ürün kalitesinde istenmeyen sonuçlara sebep olabilir. Ayrıca bu durum biyoassay çalışmalarında yüksek LC50 dozlarının ortaya çıkmasının sebebini de açıklamaktadır. Kısaca fenotipik değişiklikler virulansın azalmasında etkili olup, ürün geliştirmek için seçilen suşun ardışık pasajlarında kararlılığı test edilmesi gereken bir parametredir.

#### **1.4.4.1.7. Formülasyon ve Uygulama Stratejileri**

Entomopatojenik funguslar hala kısa raf ömrü gibi bazı uygulama zorluklarına sahiptir. Fakat, uygun formülasyonların geliştirilmesiyle bu zorlukların üstesinden gelinebilir. Uygun formülasyonun kullanılması uzun raf ömrü ve fungal yapıların devamlılığı açısından önemlidir. Formülasyon etmen ile uyumlu olmalı, onun performansını arttırmalı ve ideal olarak normal tarımsal uygulamalar ile birlikte yapılabilir. İlave olarak, formülasyon güvenli, kullanımı kolay ve uygulama, depolama ve dağıtım sırasında

etmenin canlılığını muhafaza etmelidir (Boland ve Kuykendall, 1998). Kitle üretimini takiben, granüler ve sprey (sulu ve yağlı) gibi farklı türlerde formülasyonlar kullanılabilir (Leland, 2001). Bunlardan başka *M. anisopliae* ve *B. bassiana* türleri, inoküle edilecek biyomasın sıvı kültürde elde edildikten sonra, genellikle pirinç ve arpa gibi ekonomik katı yüzeylerde büyütülmesi esasına dayanan difazik üretim yöntemi kullanılarak kolaylıkla ürüne dönüştürülebilirler (Ansari ve Butt, 2011).

Entomopatojenik fungusların granüler formülasyonları tuzak gibi formüle edilmiş misellerin veya sporların uygulamasını içermektedir. Bu uygulamada, kuru misellerin alanda sporlaşması gerekmektedir ve bu nedenle kurak iklimlerde kullanılması pek pratik değildir (Leland, 2001).

Sprey şeklinde formülasyonlar ise granüler formülasyonlara göre daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Güneş radyasyonundan mikrobiyal pestisidleri korumak için sıvı formülasyonlar dört ana yaklaşım çerçevesinde kullanılmaktadır. (1) Yağ taşıyıcıları ile yağda çözünebilir güneş kremlerinin kullanılması. (2) Yağ-su karışımı emülsiyonların kullanılması. (3) Su taşıyıcıları ile engelleyicilerin veya askıda kalan emicilerin veya suda çözünenlerin kullanılması. (4) Su taşıyıcıları ile kapsüller içerisinde kullanım (Leland, 2001). Son zamanlarda, LUBILOSA programı ile yağ temelli formülasyonlar başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Lomer vd., 2001).

### **1.5. Tezin Amacı**

Bu doktora çalışmasının amacı, ülkemiz orman ve tarım alanlarında önemli zararlar oluşturan toprak altı zararlıları ile mücadelede etkili, güvenli, ekonomik ve çevreye duyarlı bir yerel fungal mücadele etmeninin seçilmesi ve seçilen etmenin granül formülasyonu halinde geliştirilmesidir.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Çalışmada Kullanılan Funguslar

Çalışmada kullanılan fungusların özellikleri Tablo 6’da özetlenmiştir. Belirtilen bu *Metarhizium* cinsine ait suşlar farklı zamanlarda, farklı zararlılar üzerinde gösterdikleri yüksek öldürücü etkileri sebebiyle seçilmiştir. Çalışmada, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan ve farklı ortamlardan izole edilmiş 9 adet *Metarhizium anisopliae* suşu kullanıldı (Tablo 6).

Tablo 6. Çalışmada kullanılan *Metarhizium* cinsine ait farklı suşlar

İzolat	Kaynak	Etkili Oldukları Zararlılar	Referans
As-1	<i>Amphimallon solstitialis</i>	<i>Ips sexdentatus</i> <i>Ips typographus</i>	Basılmamış veri
As-2	<i>Amphimallon solstitialis</i>	<i>Ips sexdentatus</i> <i>Ips typographus</i>	Basılmamış veri
As-18	<i>Amphimallon solstitialis</i>	<i>Ips sexdentatus</i> <i>Ips typographus</i>	Basılmamış veri
Gg-12	<i>Gryllotalpa gryllotalpa</i>	<i>Gryllotalpa gryllotalpa</i> <i>Leptinotarsa decemlineata</i> <i>Corythucha arcuata</i>	Sönmez vd., 2016
KTU-21 (117)	Toprak	<i>Corythucha ciliata</i> <i>Corythucha arcuata</i> <i>Plagioderia versicolora</i>	Sevim vd. 2010b
KTU-60 (269)	Toprak	<i>Corythucha ciliata</i> <i>Corythucha arcuata</i> <i>Plagioderia versicolora</i>	Sevim vd. 2010b
KTU-2 (Ardeşen)	Toprak	<i>Corythucha ciliata</i> <i>Corythucha arcuata</i> <i>Plagioderia versicolora</i>	Sevim vd. 2010b
KTU-40 (53)	Toprak	<i>Corythucha ciliata</i> <i>Corythucha arcuata</i> <i>Plagioderia versicolora</i>	Sevim vd. 2010b
KTU-51 (4GümA)	Toprak	<i>Corythucha ciliata</i> <i>Corythucha arcuata</i> <i>Plagioderia versicolora</i>	Sevim vd. 2010b

## 2.2. Adi Mayıs Böceği (*Melolontha melolontha* L.) Örneklerinin Toplanması ve Laboratuvarında Beslenmesi

Doğu Karadeniz Bölgesi orman ve tarım alanlarında çeşitli zararlar oluşturan Adi mayıs böceği larvaları 2013 Kasım-Aralık ve 2014 Şubat-Mart aylarında fındık ve orman ağaçları köklerinden çapa ve balta yardımıyla çıkarılarak toplandı ve yeterince havalandırma açıklığı bulunan plastik kaplara konularak laboratuvara getirildi. Sağlıklı *M. melolontha* larvaları tarama testlerinde kullanılmak üzere tekrar elemeyen geçirildi.

## 2.3. Tarama Testi

Patojenite testlerinde kullanılan fungal izolatların  $1 \times 10^6$  spor/ml'lik stok solüsyonlarından Sabouraud dextrose agar (SDA) besiyeri üzerine 100 µl yayma ekim yapıldı ve 25 °C'de 2-3 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Büyüme periyodunun sonunda, tek koloniler seçilerek başka bir SDA besiyerine transfer edildi ve 25 °C'de 4 hafta boyunca inkübe edildi. Bu süre sonunda, petri üzerine 10 ml steril %0,01'lik Tween 80 eklendi ve cam baget ile kazınarak sporlar agar yüzeyinden koparıldı. Spor süspansiyonları iki katlı tülbent ile 50 ml'lik steril Falcon tüplerine süzülerek misel ve agar parçalarının uzaklaştırılması sağlandı. Elde edilen süspansiyonlar 5 dakika vorteksenerek homojen hale getirildi. Sporlar Neubauer hemositometre ile sayıldı ve belirlenen konsantrasyonlara ayarlandı.

Sporların yaşayabilirliği, 100 µl spor süspansiyonunun SDA agar üzerine yayma ekim yapılması ve 24 saatlik bir inkübasyondan sonra çimlenme özelliğinin belirlenmesiyle test edildi. Germ tüpü spor çapından büyük olan sporlar çimlenmiş olarak kabul edildi. Bunun sonucunda %95 oranında çimlenen sporlar patojenite testlerinde kullanıldı.

Sağlıklı *M. melolontha* larvaları,  $1 \times 10^7$  spor/ml konsantrasyondaki spor süspansiyonu içerisine daldırıldı ve 2-3 sn. bekletildi. Kontrol grubu ise steril %0,01'lik steril Tween 80 ile inoküle edildi. İnokülasyondan sonra larvalar, steril kum içeren plastik kutuların (10 x 10 x 7 cm) içerisine konularak 20 °C'de 12:12 (I:K) ışık periyodunda 15 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Bütün kutular 15. günde incelenerek ölü bulunan larvalar sayıldı ve yüzde ölüm değerleri hesaplandı. Yüzde mikoz değerini hesaplamak için ise ölü larvalar %1'lik sodyum hipoklorit çözeltilisiyle yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra 3 kez steril distile su ile yıkandı ve steril nemli filtre kağıdı içeren petrilere alındı.

Sporlanan larvalar sayılarak yüzde mikoz değerleri hesaplandı. Bütün deneyler 3 tekrarlı olacak şekilde tasarlandı.

#### 2.4. Fungusların *Pr1* Gen İçeriğinin Belirlenmesi

Birçok fungal patojen gibi, böcek patojeni olan *Metarhizium anisopliae* de konukçunun zengin besin içeriğine sahip hemolenfine ulaşmak amacıyla kutikulasını degrede etmek için enzim ve mekanik güçlerin kombinasyonlarını kullanır. Kutikulayı degrede eden en önemli enzimlerden biri subtilisin benzeri *Pr1* enzimidir (Wang, 2002). Bu enzim doğrudan böcek kutikulasını parçalamak üzere adapte olmuştur. Penetrasyonun erken aşamalarında konakçı kutikulası boyunca ultrastrüktürel olarak lokalizedir ve ekstraselüler aktivite gösterir.

Çalışmada farklı kaynaklardan izole edilen 9 farklı *Metarhizium* suşunda virulansı artırıcı etkiye sahip *Pr1* geni taraması yapıldı. Gen içeriğinin belirlenmesi için önce izolatlardan genomik DNA izolasyonu, ardından uygun primerler ile nested PCR yöntemi kullanılarak istenilen gen bölgeleri çoğaltıldı.

##### 2.4.1. Fungal DNA'nın İzolasyonu

Moleküler çalışmalarda kullanılacak izolatlardan DNA izolasyonu yapmak için öncelikle fungusların SDA besiyerine ekimleri yapıldı ve 28°C'de 1 haftalık süre ile inkübasyona bırakıldı. Büyüyen funguslardan yaklaşık 50 mg ağırlığında doku kesilerek alındı. Doku lisis tüplerine transfer edildikten sonra üzerine 750 µl lisis solusyonu eklenerek doku parçalayıcı içinde homojenize edildi. Doku parçalayıcıdan alınan tüpler 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Pipet yardımıyla süpernetant kısımdan 400 µl alınarak filtrasyon tüplerine aktararak 1 dakika 7.000 rpm'de santrifüj edildi. Filtrenin altında kalan sıvıya 1,200 µl genomik lisis solusyonu eklendi. Oluşan karışım DNA'nın tutunacağı filtrelili tüplere alınarak 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtre yeni bir tüpe alınarak yıkama işlemi 200 µl ön yıkama solusyonu ile yapıldı ve 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Tüpün altında kalan sıvı uzaklaştırılarak ikinci kez yıkama yapmak amacıyla 500 µl fungal-Bakteriyal DNA yıkama solusyonu eklendi. Tüpler bu haliyle 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek filtre artık DNA'nın saklanacağı ependorf

tüplere alındı. Son olarak filtrenin üzerine 50 µl DNA çözme tamponu bırakılarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen DNA'lar -20°C'de saklandı.

#### 2.4.2. *Pr1* Geninin PCR ile Çoğaltılması

*Pr1* gen bölgelerinin çoğaltılması için birçok amplifikasyon ürünü içerisinde bulunan DNA dizisinin bulunup çıkarılmasını sağlayan oldukça spesifik bir yöntem olan nested PCR yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde farklı primer takımlarıyla ikinci bir çoğaltma oluşumu sağlandı. İlk amplifikasyonda elde edilen ürün ikinci PCR için kalıp olarak kullanıldı. Belirtilen bölgenin çoğaltılması için Tablo 7'deki primerler (Leal vd., 1997) kullanıldı. METPR1 ve METPR2 dış primer takımı, METPR5 ve METPR4 iç primer takımı olarak belirlendi.

Tablo 7. Nested PCR'da kullanılan gen bölgeleri ve primer sıraları

Genler		Kullanılan primerler
METPR1	Dış primer	Fw: 5' CACTCTTCTCCCAGCCGTTC 3'
METPR2	takımı	Rv: 5' AGGTAGGCAGCCAGACCGGC 3'
METPR5	İç primer	Fw: 5' TGCCACTATTGGCCGGCGCG 3'
METPR4	takımı	Rv: 5' GTAGCTCAACTTCTGCACTC 3'

Hazırlanacak PCR reaksiyon karışımı, her bir dNTP'den 200 µM, her bir primerden 50 pmol, 2,5 unite *Taq* DNA-polimeraz, 5 µl 10X *Taq* DNA polimeraz reaksiyon tamponu, 50 ng genomik DNA içerecek ve son hacim ddH<sub>2</sub>O ile 50 µl'ye tamamlandı. PCR koşulları: 95 °C'de 5 dakika denatürasyondan sonra 95 °C'de 1 dakika, 50 °C'de 45 saniye ve 72 °C'de 2 dakika 35 döngü ve son adım olarak 72 °C'de 10 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Muro vd., 2005). PCR reaksiyonu sonucu elde edilen ürünlerden 5'er µl alınarak 0,5 µg/ml etidyum bromür katkılı %1'lik agaroz jelde 90 V'de 45 dakika elektroforez edilerek geri kalan PCR ürünleri Qiaquick PCR 50 (Qiagen GmbH, Leuten, the Netherlands) kiti ile saflaştırıldı ve DNA dizi analizi için VIB Genetic Service Facility (Antwerp, Belçika) şirketine gönderildi. Elde edilen DNA dizileri tür tayinlerini doğrulamak için NCBI GenBank'ta yer alan DNA dizileri ile karşılaştırılarak genin varlığı doğrulandı.



## 2.5. Enzim-substrat Testi

Proteolitik enzimler böcek kutikulasının degradasyonunda kilit rol oynarlar. Böcek kutikulasının da büyük bir kısmının kitin ve proteinden oluştuğu düşünülürse bu bariyeri aşmakla görevli enzimlerin aktif halde bulunması gerekmektedir. Degradasyonda primer olarak iş gören *Pr1* enziminin varlığının teyit edilmesinden sonra bir sonraki aşama enzimin aktif olup olmadığının belirlenmesidir. Bu basamakta yine genin varlığı tespit edilen 9 adet *Metarhizium* suşu minimal besiyerinde büyütülerek, uygun substrat ile aktivite deneyine tabi tutuldu.

### 2.5.1. İzolatların Kültüre Edilmesi

*Pr1* gen bölgesinin dizi analizleri yapıldıktan sonra mevcut enzimin aktivite değerini belirlemek amacıyla aşağıda belirtilen yöntemle izole edilen bu enzim substratı varlığında enzim-substrat testine tabi tutuldu. Bunun için izolatlar minimal besiyerinde büyütüldü. Minimal besiyeri, % 0,6 NaNO<sub>3</sub>, % 0,1 Glikoz, % 0,2 Pepton, % 0,05 Yeast Ekstaktı ve % 0,8 Kitin ihtiva edecek şekilde hazırlandı (Beys-da-Silva vd., 2010).

Hazırlanan minimal besiyeri içerisine konsantrasyonu  $1 \times 10^6$  spor/ml'ye ayarlanmış spor süspansiyonundan 1 ml eklenerek, 150 rpm'e ayarlanmış sallayıcıda 96 saat inkübe edildi (Beys-da-Silva vd., 2010). İnkübasyonun ardından minimal besiyerinde büyüyen konidiler 1 numara whatman filtre kağıdından süzülerek -80°C'de muhafaza edildi. Süzüntüdeki mevcut proteinlerin belirlenmesi için aktivite deneyinden önce Bradford (1976) yöntemi kullanılarak, izolatların toplam protein ölçümleri yapıldı. Bu metotta kullanılacak 1000 ml boya solusyonu hazırlamak için 100 mg Commassie Brilliant Blue G-250 boyası önce 50 ml % 95'lik etanol içinde iyice çözülerek, üzerine 100 ml %85'lik fosforik asit eklendi. Daha sonra oluşan karışım saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti karanlık bir yerde filtre kağıdı ile süzüldü. Bu boya ile ilk olarak BSA (Bovin Serum Albumin) kullanılarak 595 nm dalga boyunda protein konsantrasyonu standardı grafiği oluşturuldu. Standart grafik için 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 µg BSA içeren çözeltiler 0,15 M NaCl ile 100 µl'ye tamamlandı. Her bir örneğin üzerine 5 ml hazırlanan boyadan eklenildi. Protein ve boya karışımları vortekslendi ve oda sıcaklığında

15 dakika inkübe edildi. Standart grafik oluşturulduktan sonra, örneklerin ölçümü yapılırken değişik miktarlarda örnek 0,15 M NaCl ile 100 µl'ye tamamlandı ve üzerine 5 ml boya eklendi. Protein ve boya karışımı vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Süre sonunda standart grafiğin yüklendiği Spectroscopy System cihazı kullanılarak 595 nm'de ölçümler yapıldı ve protein konsantrasyonu µg/µl cinsinden hesaplandı.

### 2.5.2. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Elde edilen proteinlerin konsantrasyonları eşitlendikten sonra filtre edilmiş süzütünden 5 µl alınarak 96 gözlü kaplara aktarıldı. Bu süzütünün üzerine 10 mM, 5 µl N-succinly-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA substratı ve 90 µl, 0,1 Molar, pH:0,8 Tris-HCl tampon eklenerek 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı (Perinotto vd., 2014). Her izolat için deneyler 3 tekrarlı olacak şekilde hazırlandı. İnkübasyonun ardından 405 nm de ölçüm yapılarak aktivite sonuçlarının grafikleri çizildi (Safavi, 2001).

### 2.6. Ardışık Pasajlamanın Fenotipik, Genotipik ve Biyokimyasal Dejenerasyona Etkisinin Belirlenmesi

Pasajlamanın fenotipik, genotipik ve biyokimyasal değişikliklere etkisi olup olmadığını belirlemek için öncelikle *Pr1* gen varlığı, protolitik aktivitesi ve virulans özelliklerine göre seçilen 4 farklı *Metarhizium* suşunun konidiaları (KTU-2, KTU-51, KTU-60, Gg-12), *Galleria mellonella* larvalarına enjekte edilerek virulanslarının restorasyonu sağlandı. Bunun için  $1 \times 10^7$  spor/ml konsantrasyondaki spor süspansiyonu içerisine daldırılan *G. mellonella* larvaları 15 günlük inkübasyonun ardından yüzeyde görülen konidia kolonileri SDA'a transfer edilerek 25 °C'de 15 gün inkübasyona bırakıldı. Enfeksiyondan sonraki ilk pasaj 1. pasaj olarak kabul edildi ve pasajlama 12 kez olacak şekilde tekrar edildi. Her pasaj 10 tekerrürlü olacak şekilde ekimler yapıldı ve 15 günlük inkübasyonunu dolduran petripler +4 ° C'de muhafaza edildi. 12. pasaja ulaşıldığında tüm pasajlar aynı anda SDA üzerine ekilerek gerekli deneyler için kullanıldı (Ansari ve Butt 2011).

### 2.6.1. Ardışık Pasajlamanın Fenotipik Dejenerasyona Etkisinin Belirlenmesi

Fenotipik değişiklikler genellikle kültürlerde renk değişimi, büyüme hızı ve formunun değişmesi, fertil olmayan alan oluşumu, spor üretiminde düşüşler, UV dirençliliği veya bazı metabolitlerin azalışı şeklinde görülür. Bu değişimlerin seçilen 4 *Metarhizium* suşunun ardışık pasajlarında test edilmesi amacıyla bu suşlara ait 1., 6. ve 12. pasajlar aynı anda SDA besiyerine nokta ekimleri yapılarak 14 gün inkübasyona bırakıldı. Büyüme süresinin ardından öncelikle kültürlerdeki renk değişimleri ve koloni morfolojileri incelendi. Fertil olmayan alan oluşumu belirlendikten sonra spor üretimindeki düşüşleri belirlemek için 1., 6. ve 12. pasajlardan 2.3’de anlatıldığı gibi spor süspansiyonları ve inokülasyon işlemleri hazırlanarak iki deney grubu hazırlandı. 1. grup (Kontrol grubu) herhangi işleme tabi tutulmadan normal şartlar altında 12 saatlik inkübasyona bırakıldı. 2. grup ultraviyole (UV) ışığına maruz bırakılmış kültür kaplarından oluşturuldu. Bu grup Bidochka vd. (2001) tarafından uygulanan yöntemle göre belirlendi. Spor süspansiyonları ve inokülasyon işlemleri yine 2.3’de belirtilen yöntemle göre yapıldı. Farklı olarak, fungal örnekler inokülasyondan sonra 15 ve 30 dakika olmak üzere 2 farklı süre için UV radyasyonuna (306 nm) maruz bırakıldı. Daha sonra kültürler 12 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından Neubauer hemositometre yardımıyla spor sayımları yapıldı ve izolatların % germinasyonları hesaplandı (Sevim, 2010).

### 2.6.2. Ardışık Pasajlamanın Virulans Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Ardışık pasajlanan kültürlerde sporların çimlenme oranında ve germinasyon hızında düşüş, sporların konağa penetrasyonunda yavaşlama ve hemosöle giren sporların gelişmesindeki gerilemeden dolayı virulansla kayıpların olması muhtemeldir. Çalışmanın başından itibaren belirli parametrelere göre seçilen 4 farklı *Metarhizium* suşu 12 ardışık pasajın ardından virulansın stabil olup olmadığını test etmek üzere, 1., 6. ve 12. pasajlara ait kültürlerden rastgele seçim yapılarak 2.3’te anlatıldığı gibi spor süspansiyonu hazırlanarak *Galleria mellonella* larvaları enfekte edildi. Spor bulaştırılan larvalar içerisinde yapay besiyeri bulunan plastik kaplara yavaşça transfer edildi. Her bir deney kabı 10 adet larva içerecek şekilde hazırlandı. Deney süresi 15 gün olarak belirlendi ve böcekler 5., 10. ve 15. günlerde sayılarak ölümler deney kaplarından uzaklaştırılarak

kurutma kağıdı ihtiva eden steril petrilere transfer edildi. Ölü larvaların mikoz oranlarının belirlenmesi için petrilere %60 nem ortamında 28 °C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı ve yüzde ölüm ve mikozlanma değerleri hesaplandı (Abbott, 1925).

### **2.6.3. Ardışık Pasajlamanın Genotipik Dejenerasyona Etkisinin Belirlenmesi**

#### **2.6.3.1. RAPD-PCR**

İzolaların uzun süre pasajlanmaları sonucunda oluşabilecek genotipik değişiklerin belirlenmesi amacıyla 1., 6. ve 12. pasajlardan 2.5.1.'de anlatıldığı gibi DNA izolasyonu yapıldı ve elde edilen DNA'lar, 5 farklı primerle (OPA- 03, AGTCAGCCAC; OPA-08, GTGACGTAGG; OPB- 04, GGA CTGGAGT; OPB-07, GGTGACGCAG; OPE-01, CCCAAGGTCC) RAPD-PCR işlemine tabi tutuldu (Wang vd., 2002). Deney tüplerinin her birine 2 µl *Metarhizium* genomik DNA'sı, 1.5 µl 1 mM OPA primeri, 1 µl 10 mM dNTP, 10 µl 5X tamponu, 3 µl 0.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 ünite *Taq* DNA Polimeraz (Promega) enzimi bırakıldı ve son hacim steril dH<sub>2</sub>O ile 50 µl'ye tamamlandı. PCR koşulları 95 °C'de 2 dakika denatürasyondan sonra 35 döngü olacak şekilde 95 °C'de 1 dakika, 55 °C'de 55 saniye, 72 °C'de 2 dakika ve son olarak da 72 °C'de 5 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. PCR sonucunda çoğaltılan DNA fragmentleri 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %1'lik agaroz jelde yürütülerek jel görüntüleme sistemi (Gel Logic; Kodak) ile görüntülendi ve elde edilen PCR ürünlerinin oluşturdukları profiller incelenerek izolatlarda genotipik değişikliğin olup olmadığı belirlendi.

#### **2.6.3.2. Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesim**

*Pr1* geninin nested PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen ürünler, dizi içerisinde polimorfizm varlığının belirlenmesi amacıyla restriksiyon endonükleaz enzimleri ile muamele edildi. 1., 6. ve 12. pasajlardan 2.5.2.'de anlatılan şekilde elde edilen *Pr1* gen sıraları, içerisinde mevcut bir polimorfizm varlığında, bu reaksiyonun en iyi derecede ortaya çıkmasını sağlayan *Dde* I, *Hpa* II ve *Rsa* I enzimleri ile muamele edildi (Leal vd., 1997). Reaksiyon koşulları 5 µl (100 ng) PCR ürünü, 0,5 µl (5 ünite) enzim, 1 µl 10x tampon, 13,5 µl dH<sub>2</sub>O olarak hazırlandı ve enzimlerin kesim işlemini

gerçekleştirebilmeleri için reaksiyon tüpleri 37 °C’de 4-18 saat inkübasyona bırakıldı. Kesim işlemi tamamlandıktan sonra kesim ürünleri % 1,5’luk agaroz jelde yürütülerek bantlar arasındaki farklılıklar incelendikten sonra polimorfizm varlığı belirlendi.

#### **2.6.4. Ardışık Pasajlamanın Biyokimyasal Dejenerasyona Etkisinin Belirlenmesi**

##### **2.6.4.1. Proteolitik Aktivitenin Belirlenmesi**

Fungal biyopestisit geliştirilmesi çalışmalarında endişe duyulan en büyük problem, fungusların ardışık pasajlanmaları sonucunda virulanslarının düşmesidir. İzolatların virulans düşüşleri cinsten cinse hatta suştan suşa farklılık gösterir (Butt vd., 2006). Bu enzimin üretiminin takip edilmesi fungusların ticari preperat üretiminde önemli rol oynamaktadır (Shah vd., 2005; Safavi vd., 2007). Bu bağlamda 2.6.’dan elde edilen 4 farklı *M. anisopliae* suşuna ait 1., 6. ve 12. pasajlar SDA besiyerine aynı anda ekimleri yapıldıktan sonra 2.5.2 deki basamaklar tekrar edilip ardışık pasajlardaki *Pr1* geninin aktivitesinde değişiklik olup olmadığı incelenmiştir.

##### **2.6.4.2. Esteraz Profillerinin Belirlenmesi**

İzolatlardan elde edilen ardışık pasajların aktif enzim aktivitelerinde değişiklik olup olmadığını belirlemek amacıyla 1., 6. ve 12. pasajlardan elde edilen fungal sporlar sıvı besiyerinde (10 gr dextrose, 2.5 gr pepton ve 0.4 gr yeast extract), 28 °C’de 7 gün büyütüldü. Elde edilen biyomas filtre kağıdı yardımıyla süzülerek, süzüntü havan ve tokmak yardımıyla sıvı azotta ezildi. Ezinti üzerine 2 µl Tris-glisin tampon eklenerek 15 dakika 15.000 rpm’de santrifüj edildi. Elde edilen süpernetanttaki protein miktarı Bradford metodu ile belirlendi. Pasajların protein miktarları eşitlendikten sonra her örnekten 100 µg NATIVE-PAGE’ye yüklendi. Protein jel elektroforezi % 12’lik jel kullanılarak 15 mA’lik akım altında gerçekleştirildi. Ayrıştırma jeli 5.9 mL distile su, 2.4 mL %30 akrilamid bisakrilamid (29:1), 2.6 mL 1.5 M Tris-hidroklorik asit (pH 8.8), 100 µL %10 amonyum persülfat ve 4 µL TEMED kullanılarak hazırlandı. Yığılma jeli ise 6.2 mL distile su, 1.3 mL % 30 akrilamid bisakrilamid (19:1), 2.5 mL 0.5 M Tris-hidroklorik asit (pH 6.8), 50 µL % 10 APS ve 15 µL TEMED karışımından elde edildi. Jel 1.5 saat 80 V’luk akımda, yürütme

tamponu (0.031 M Tris ve 0.25 M glisin pH 8.6) eklenerek yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel 0.05 M fosfat tompununda (pH 7.2) yıkandı ve işaretleme tamponu ile (100 mL 0.05 M fosfat buffer pH 7.2, 1 mL asetonda çözünmüş 10 mg  $\alpha$ -naftil asetat, 50 mg Fast Blue RR ve 4 mL %4 formaldehyde) 30 dakika muamele edildi. Elde edilen bant profilleri incelenerek, ardışık pasajlar arasında aktif proteinler açısından değişiklik olup olmadığı belirlendi.

## 2.7. Fungal Konidilerin Kuru Formülasyonu

Yapılan morfolojik ve moleküler çalışmaların ardından KTU-2 ve KTU-60 suşlarının diğer *Metarhizium* izolatlarına göre daha kararlı oldukları sonucuna varılmasının ardından, bu kararlı suşların bifazik kültür sistemine göre kuru formülasyonlarının üretilmesi çalışmaları yapılmıştır. Bu sisteme konidilerin öncelikle sıvı besiyeri ortamında büyütüldükten sonra, oluşan inokülantın (misel veya hifler), katı substrat üzerine transfer edilmesi esasına dayanmaktadır (Machado vd., 2010).

### 2.7.1. Fungal Konidilerin Sıvı Besiyerinde Büyütülmesi

Fungal konidilerin ilk basamakta sıvı besiyerinde büyütülmesinin birçok avantajı vardır. Bunların arasında en önemlilerinden biri stok formülasyona ulaşmadan önce, kontaminasyon oluşumunda bariyer görevi üstlenmesidir. Bunun dışında bu sistem fungusun rekabetçi özelliğini artırarak, kontaminasyona sebep olan mikroorganizmaların katı substrat üzerinde kolonileşmesini önlemektedir. Bu önemli özelliklerinden dolayı seçilen iki *Metarhizium* izolatu (KTU-2 ve KTU-60) öncelikle sıvı besiyeri içerisinde büyütüldü. Bunun için öncelikle SDA üzerinde büyütülen 1., 6. ve 12. pasajlara ait konidiler % 0,01'lik Tween 80 ile yüzeyden koparılarak  $6 \times 10^6$  spor/ml'lik konsantrasyona ayarlandı ve bu süspansiyondan pipetör yardımıyla 1 ml alınarak konidiler otoklav edilmiş minimal besiyerine transfer edildi. Minimal besiyeri; 20 gr/l Dextrose ve 10 gr/l Pepton 150 ml'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak, pH 5,6 olacak şekilde hazırlandı. Elde edilen kültürler 28°C'de, 150 rpm'de, 6 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından oluşan biyomas, steril katı substrat üzerine inoküle edildi.

### 2.7.2. Fungal Konidilerin Katı Substrat Üzerinde Büyütülmesi

Konidial üremenin optimizasyonu için uygun yüzey alanı, fermentasyon işleminin gerçekleşebilmesi, uygun nem ve pH ortamının sağlanması koşullarını sağlayabilmesi sebebiyle, tez çalışmasında formülasyon geliştirilmesi aşamasında pirinç katı substrat olarak kullanılmıştır. Pirinç üzerine transfer edilecek biyomas bölüm 2.7.1. de anlatıldığı gibi hazırlandıktan sonra pirinçler bir miktar su ile haşlanarak yarı pişmiş hale getirildi. Haşlanmış pirinçler eşit ağırlıklarda (250 gr) otoklavlanabilir poşetlere aktarılarak ağızları ip ile bağlandı ve 121 °C’de 20 dakika steril edildi. Poşetler soğuduktan sonra her birine parazitik fungal büyümeyi engellemek için 160 ml %0.02 kloromfenikol eklendi. Daha sonra bölüm 2.7.1 den elde edilen biyomasdan yaklaşık 5 ml pirinç üzerine inoküle edildikten sonra poşetlerin ağızı sıkıca bağlanarak 28°C’de 30-40 gün inkübasyona bırakıldı. Fungal büyümenin homojen olması için büyümenin ilk 5. ve 10. günü poşetler yavaşça alt üst edilerek sporların katı substrat üzerine yayılması sağlandı (Ansari ve Butt, 2011).

### 2.8. Veri Analizi

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

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

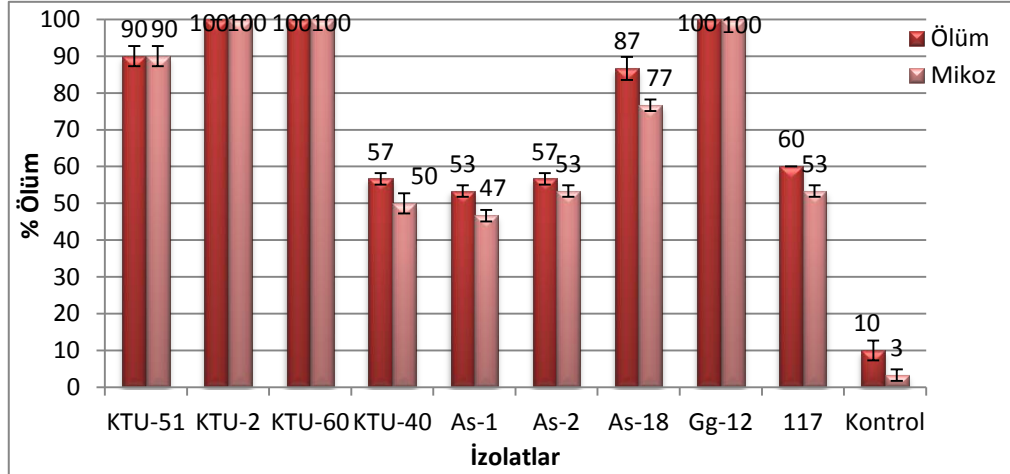
### 3. BULGULAR

#### 3.1. Tarama Testi Sonuçları

Yüksek patojeniteye sahip fungal izolatların seçimi ve fungal izolatlar arasındaki patojenite bakımından farkı belirlemek amacı ile bütün fungal izolatlar (Tablo 6) *M. melolontha* larvalarına karşı test edildi. Tarama testi için konsantrasyonu  $1 \times 10^7$  spor/ml<sup>-1</sup>'e ayarlanan spor süspansiyonu içerisine daldırma yöntemi ile batırılan böceklerde farklı oranlarda ölümler gözlemlendi (Şekil 5). *M. melolontha* larvalarına karşı test edilen fungal izolatların patojenite değerlerinin kontrol grubu ile karşılaştırılmasında, izolatların kontrol grubundan farklı ölüm değerlerine sahip oldukları belirlendi ( $F=41,699$ ,  $df=9$ ,  $p<0,05$ ). İzolatların birbirleriyle karşılaştırılmasında ise bütün izolatların farklı ölüm değerlerine sahip oldukları tespit edildi ( $F=22,339$ ,  $df=8$ ,  $p<0,05$ ). Ölü böcekler üzerindeki büyüme ve sporlaşma oranlarının karşılaştırılmasında da bütün izolatların kontrol grubundan farklı olduğu ve aralarında değişik mikozlanma seviyeleri gösterdikleri tespit edildi ( $p<0,05$ ).

Fungal izolatlar ile muamele edilen böceklerde enfeksiyonun ardından 4. günden sonra iştah kaybı ile birlikte hareketlerinde zayıflama meydana geldi. KTU-2 kodlu izolat ile muamele edilmiş böceklerin 6. günden sonra vücutları kararmaya başlayarak, 7. gün ölüm meydana geldi. Gg-12 ve KTU-60 kodlu izolatlarda ise sırası ile 9 ve 11. günlerde ölüm gözlemlendi. Tarama testi sonucunda KTU-2, KTU-60 ve Gg-12 kodlu izolatların %100 ölüm oranı ile en yüksek öldürücü etkiye sahip oldukları görüldü. Bu izolatlar için Bradford yöntemi ile belirlenen protein içeriklerinin yüksek ve proteolitik aktivite deneyinde de en iyi aktivite gösterdikleri bilinmektedir. Tüm bu sonuçlar doğrultusunda biyopestisit üretimi çalışmalarında bu üç izolatın ümit verici olduğu düşünülmektedir.

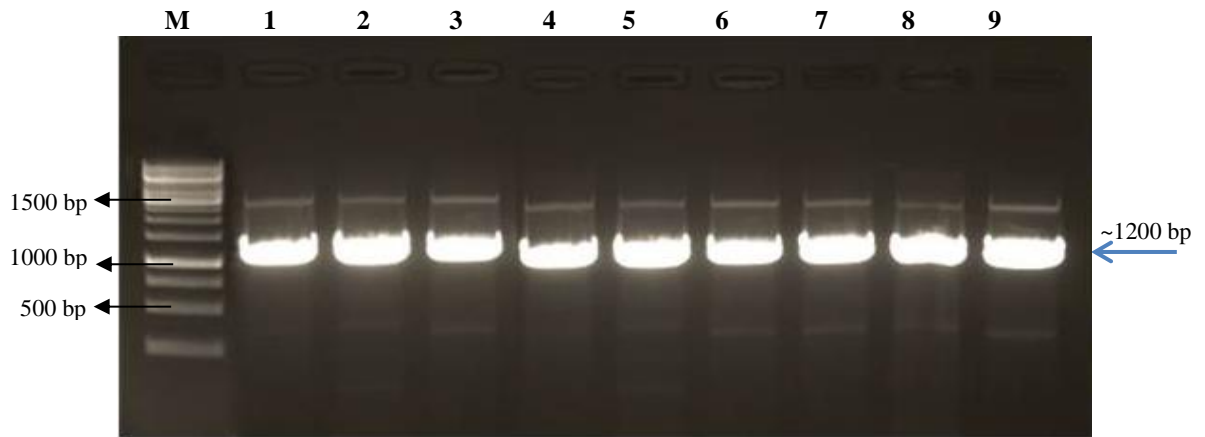




Şekil 5. İzolatların *M. melonitha* larvalarına karşı patojeniteleri ve kadavralar üzerindeki mikozlanma oranları. Ölüm değerleri Abbott formülü (Abbott, 1925) kullanılarak hesaplandı. Sütunların üzerindeki sayılar patojenite değerlerini, barlar ise standart sapmayı göstermektedir.

### 3.2. *Pr1* Gen İçeriklerinin Tespiti ve Taksonomik Pozisyonlarının Belirlenmesi

Öldürücü etkisi belirlenen *Metarhizium* cinsine ait 9 farklı izolatin böcek kütikulasında degradasyona sebep olan *Pr1* gen varlığını belirlemek amacıyla yaklaşık 1200 bp'lik gen bölgesi Nested PCR yöntemi ile çoğaltıldı. İki farklı çoğaltma reaksiyonu sonucunda elde edilen bantlar Şekil 6'da gösterilmektedir. Yaklaşık 1200 bp uzunluğundaki PCR ürünleri daha sonra QIA quick kiti ile saflaştırılarak DNA dizi analizi yapıldı.



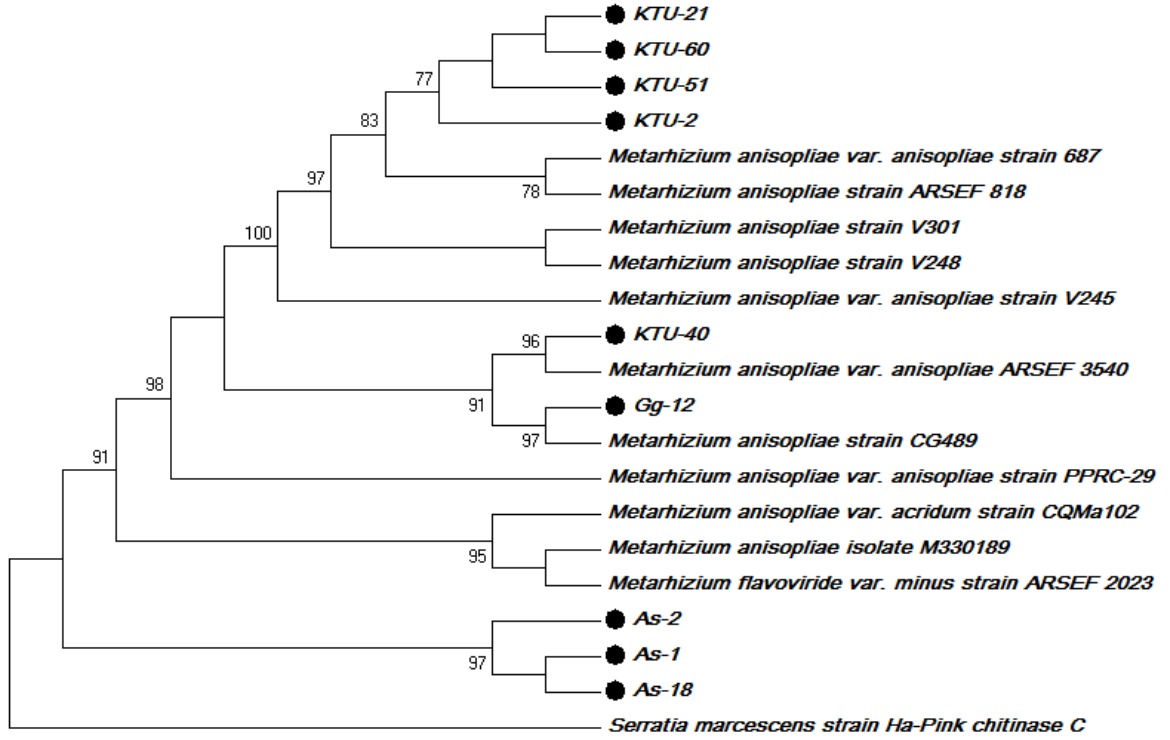
Şekil 6. Entomopatojenik fungusların *Pr1* gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması. M: 1000 bp DNA ladder, 1: As-1, 2: As-2, 3: As-18, 4: Gg-12, 5: KTU-21, 6: KTU-60, 7: KTU-2, 8: KTU-40, 9: 4-KTU-51.

Elde edilen *Pr1* gen bölgesi dizileri NCBI GenBank'ta blastlanarak izolatların GenBank'ta yer alan diğer entomopatojenik fungus türleri ile yüzde benzerlik oranları belirlendi. Yüksek öldürücü etkiye sahip 9 farklı *Metarhizium* suşunun GenBank'daki izolatlarla karşılaştırılması sonucu bütün izolatların *Pr1* gen bölgesini içerdiği tespit edildi (Tablo 8).

Tablo 8. *M. anisopliae* izolatlarının *Pr1* gen bölgesi içeriklerinin diğer izolatlarla benzerlikleri

İzolat	<i>Pr1</i> gen dizisi	<i>Pr1</i> gen benzerliği	Accession No
KTU-2	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> suş Ma9	%99	AY389125.1
	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> suş V245	%98	AY389127.1
KTU-40	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> ARSEF 3540	%99	AY389134.1
	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> suş Ma 23	%99	AY389133.1
KTU-21	<i>M. anisopliae</i> suş ARSEF 818	%98	GQ226045.1
	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> suş Ma1	%98	AY389122.1
KTU-60	<i>M. anisopliae</i> suş V301	%99	FJ659171.1
	<i>M. anisopliae</i> suş V248	%99	FJ659170.1
KTU-51	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> suş 687	%99	AY389129.1
	<i>M. anisopliae</i> izolat 5940	%99	AB073327.1
Gg-12	<i>M. anisopliae</i> suş CG489	%97	FJ659159.1
	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> suş ARSEF 3540	%97	AJ416695.1
As-1	<i>M. anisopliae</i> izolat M330189	%86	EU526905.1
	<i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> suş CQMa102	%86	AY849935.1
As-2	<i>M. flavoviride</i> var. <i>minus</i> suş 2023	%85	GQ226047.1
	<i>M. majus</i> suş CG438	%84	FJ659173.1
As-18	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> suş PPRC-29	%84	AY389126.1
	<i>M. lepidiotae</i> suş CG648	%84	FJ659189.1

Elde edilen *Pr1* gen dizileri, NCBI veri tabanındaki %98 ve üzeri homoloji gösteren diğer gen sıraları ile filogenetik analizlerde kullanılmak üzere Bioedit versiyon 7.0.0 (Hall, 1999) programı ile hizalandı. Türler arası benzerlik MEGA versiyon 5.05 (Tamura vd., 2011) programı ile yapıldı. Filogenetik analizler için dış grup olarak *Serratia marcescens* bakterisinin kitinaz gen sırası kullanıldı. Bu türün nükleotid dizileri GenBank'tan temin edildi. Ağaç topolojisindeki dallar arasındaki güvenilirlik değerleri 1000 tekrar seç-bağla (Bootstrap) testi ile belirlendi. Ortaya çıkan filogenetik ağaç incelendiğinde KTU-21, KTU-60, KTU-51, KTU-2 izolatlarının birbirlerine ve *M. anisopliae* var. *anisopliae* strain 687 ile *M. anisopliae* strain ARSEF 818 suşlarına daha yakın akraba oldukları görülmektedir (Şekil 7). KTU-40 ve Gg-12 izolatları ise sırası ile *M. anisopliae* var. *anisopliae* ARSEF 3540 ile %96, *M. anisopliae* strain CG489 ile %97 homoloji göstermektedir. As-1, As-2 ve As-18 türlerinin de kendi aralarında %97 oranında akrabalık oluşturdukları görülmektedir (Şekil 7).



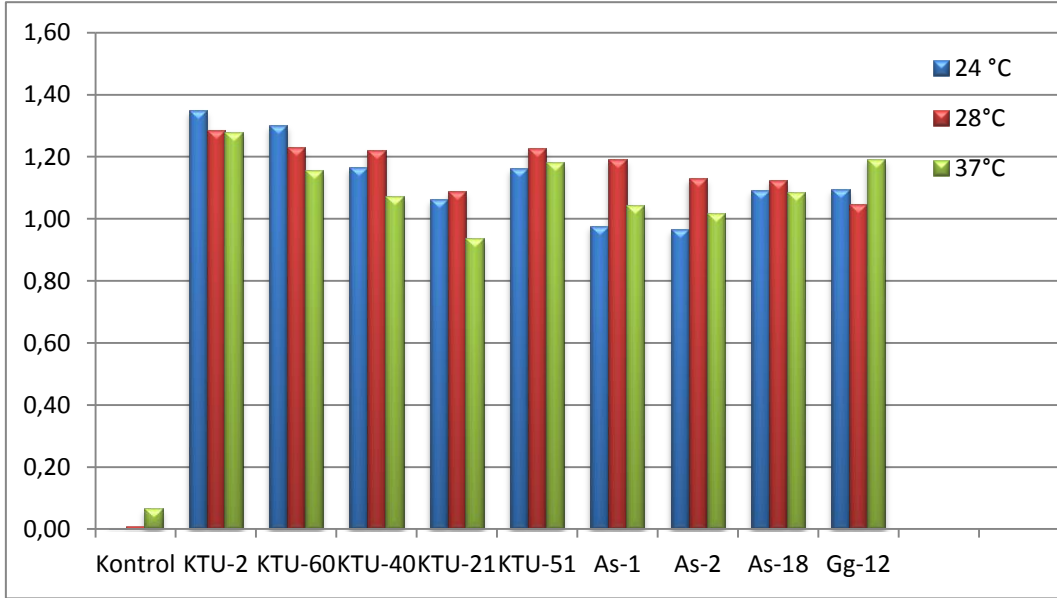
Şekil 7. Fungal izolatların *Pr1* gen dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı. Seç- bağla (bootstrap) değerlerinin %70 ve yukarısı olanlar belirtildi.

### 3.3. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Protein varlığının belirlenmesi için aktivite deneyinden önce Bradford yöntemi kullanılarak izolatların protein miktarları belirlendi. Protein miktarı belirlenen ve moleküler çalışmalar sonucunda *Pr1* geni bulduran izolatlar, 96 gözlü kaplarda enzim-substrat testi deneyine tabi tutuldu. Bu çalışma sonucunda kütüphaneden seçilen izolatlardan tüm *M. anisopliae* türlerinde (9 adet) *Pr1* geninin aktif olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmanın arazi koşullarında hedeflenen amaca hizmet edebilmesi amacıyla, kütikulyayı degrede eden bu genin enzimler için optimum sıcaklıkta, arazi koşullarında ve fungusların en iyi büyüebildiği sıcaklıkta çalışıp çalışmadığını belirlemek amacıyla enzim-substrat testi deneyi sırasıyla 37, 24 ve 28 °C’lerde üçer tekrarlı olmak üzere yapılmıştır. Sonuçlar bu genin üç farklı sıcaklıkta da aktif olduğunu doğrulamaktadır (Şekil 8). KTU-2 izolatu diğer izolatlarla karşılaştırıldığında, tüm sıcaklıklarda en yüksek enzim aktivitesini göstermiştir. KTU-60 suşu ise 24 ve 28 °C’lerde gösterdiği yüksek enzim aktivitesiyle ikinci sırada yer almaktadır. KTU-51 izolatu değerlendirildiğinde en

iyi 28 °C’de aktivite gösterirken diğer sıcaklıklardaki etkisinin birbirine oldukça yakın olduğu sonucuna varılmıştır. Gg-12 suşu ise enzimlerin optimum çalışma sıcaklığı olan 37 °C’de en iyi enzim aktivitesi gösterirken, bu sırasıyla 24 ve 28 °C’ler takip etmektedir.



Şekil 8. Fungal izolatların üç farklı sıcaklıkta gösterdiği enzim aktivitesi

### 3.4. Ardışık Pasajlamannın Fenotipik Dejenerasyona Etkisinin Belirlenmesi

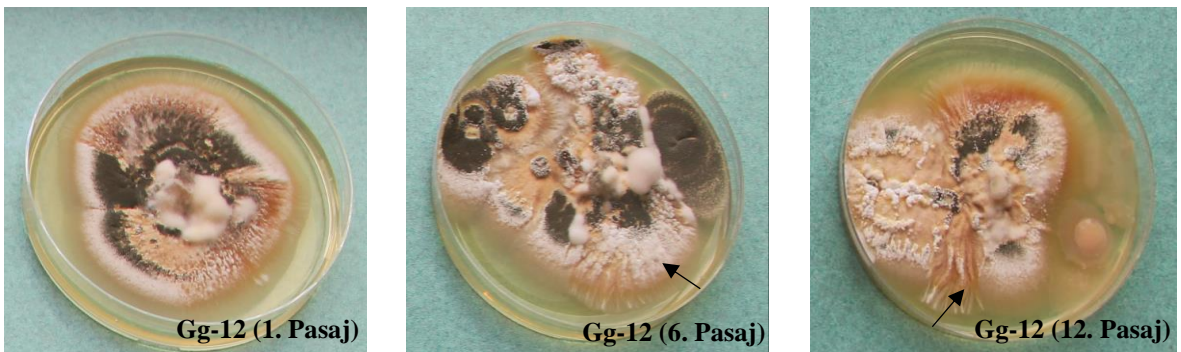
*M. melolontha* larvaları üzerindeki virulansı, *Pr1* geni bulundurması ve bu genin aktivitesi özellikleri göz önünde bulundurularak seçilen 4 adet *Metarhizium* izolatı (KTU-2, Gg-12, KTU-51, KTU-60) ardışık 12 kez pasajlandıktan sonra, 1., 6. ve 12. pasajlardan rastgele üçer petri seçilerek kültürler koloni morfolojileri, renk değişimi, fertil olmayan alan oluşumu, spor üretimi ve sporların UV’ye karşı dirençliliği yönünden incelendi.

KTU-2 izolatına ait kültürler incelendiğinde, pasajlamalarla birlikte fungusun koloni morfolojisinde herhangi bir değişikliğin oluşmadığı görülmektedir (Şekil 9). Birinciden 12. pasaja doğru gidildikçe fungal sporlarda renk değişimi oluşmamıştır. Birinci ve 6. pasaja kadar sporlar tüm alana yayılmış ve petrinin tamamı fertil olmakla birlikte 12. pasaja ait kültürde kısmen fertil olmayan alanlar görülmektedir (Şekil 9). İzolata ait sporların UV’ye maruz bırakıldıklarında germinasyon yüzdeleri incelendiğinde, kontrol grubu ile kıyaslandığı zaman anlamlı bir farklılığın olduğu ancak pasajların kendileri arasında herhangi bir farklılığın oluşmadığı görülmektedir (Tablo 9).



Şekil 9. KTU-2 izolatının pasajlarına ait kültürlerin SDA üzerindeki görüntüleri. İşaretli alanlar fertil olmayan misel büyümelerini göstermektedir.

Gg-12 izolatının pasajları kendi arasında kıyaslandığında, pasaj sayısı arttıkça kültürler arasındaki farklılığın da arttığı görülmektedir. Öncelikle koloni morfolojisi ilk pasajda düzgün yuvarlak halinde iken, 6. pasajda koloni şekilsiz bir hal alarak, fertil olmayan misel büyümeleri kolonilerin uç kısımlarında oluşmaya başlamıştır. Onikinci pasajda ise kültür sporilizasyon miktarını iyice düşürerek yerini fertil olmayan (verimsiz) misel büyümesine bırakmıştır. Az miktarda da olsa sporlaşma sadece kültür kabının merkezi kısımlarında görülmekte, uç kısımlarda sadece verimsiz miselyumlar dikkat çekmektedir (Şekil 10). İzolata ait sporlar UV ışığına maruz bırakıldığında, başlangıçta kullanılan spor miktarları eşit olduğundan ( $1 \times 10^6$  spor/ml) kontrol grubuna ait kültürler arasında anlamlı bir farklılık görülmemektedir. On beş dakikalık UV ışığına maruz kalmış kültürlerde kendi aralarında yine bir farklılık gözlenmemektedir. Ancak 30 dakikalık UV ışığının ardından 6. pasajdaki sporların germinasyonu %90 iken, 12. pasajdaki sporların germinasyonu tekrar ilk pasajdaki gibi %85' lere düşmüştür.



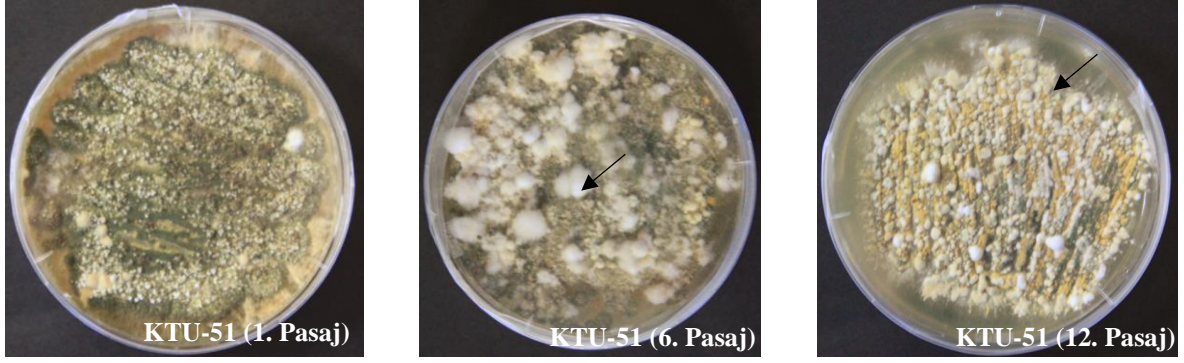
Şekil 10. Gg-12 izolatının pasajlarına ait kültürlerin SDA üzerindeki görüntüleri. İşaretli alanlar fertil olmayan misel büyümelerini göstermektedir.

Tablo 9. UV'nin *Metarhizium* izolatlarının germinasyon oranına etkisi

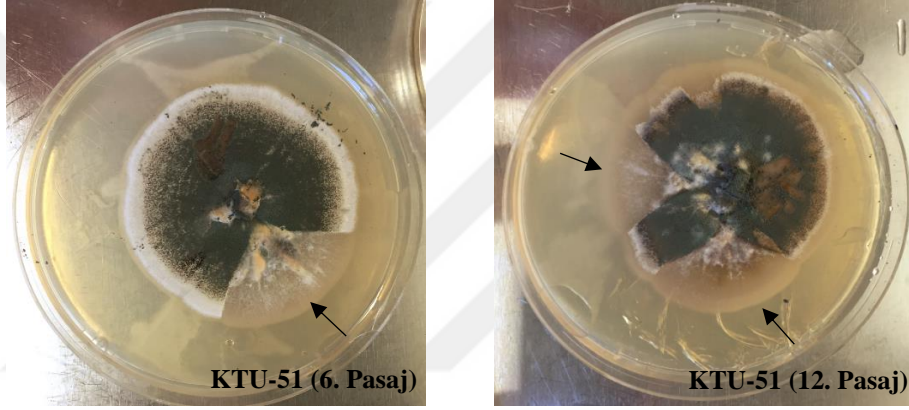
İzolat	Koşullar	1. Pasaj	6. Pasaj	12.Pasaj
KTU-2	Kontrol*	97,3 ± 1,5	96 ± 2,0	95,3 ± 2,1
	UV 15'	90,3 ± 1,5	90 ± 1,0	91 ± 2,7
	UV 30'	89,6 ± 1,2	89 ± 1,0	90,3 ± 1,2
Gg-12	Kontrol	92,6 ± 1,5	91,6 ± 2,5	91,6 ± 3,1
	UV 15'	87,6 ± 3,5	88,6 ± 2,3	88,3 ± 3,1
	UV 30'	87 ± 2,6	90 ± 1,73	85 ± 1,7
KTU-51	Kontrol	94,3 ± 2,3	94,6 ± 2,1	94 ± 3,0
	UV 15'	82,6 ± 3,5	85 ± 4,4	85 ± 3,5
	UV 30'	80,6 ± 2,5	80,3 ± 1,5	81 ± 3,0
KTU-60	Kontrol	95,6 ± 0,6	93,6 ± 2,1	95 ± 1,7
	UV 15'	87,6 ± 3,5	89 ± 3,0	88 ± 2,0
	UV 30'	86,3 ± 1,2	86,3 ± 1,8	86,6 ± 1,5

\*Kontrol grubu normal koşullarda büyütülmüş kültürlerden oluşmaktadır.

KTU-51 izolatının ardışık pasajlarına ait kültürlerin koloni morfolojileri incelendiğinde, pasajlanma miktarı artıkça kolonilerin çaplarında bir değişiklik olmamasına rağmen, sporilasyon oranında düşüşle birlikte spor renklerinin yeşilden soluk sarıya doğru değiştiği görülmektedir (Şekil 11). Fertil olmayan alanların oluşumu 6. pasajdan itibaren başlamış, bu alanların sıklığı 12. pasajda artış göstermiştir. Bu izolatta ayrıca biyopestisit üretiminde istenmeyen durumlardan biri olan “V” şeklinde alan (“V” shaped sector) oluşumu 6. ve 12. pasajlarda gözlenmektedir (Şekil 12). Bu alanlarda genellikle spor üretimi olmamakla birlikte verimsiz misel büyümeleri de görülmediğinden steril bölge olarak da isimlendirilir.



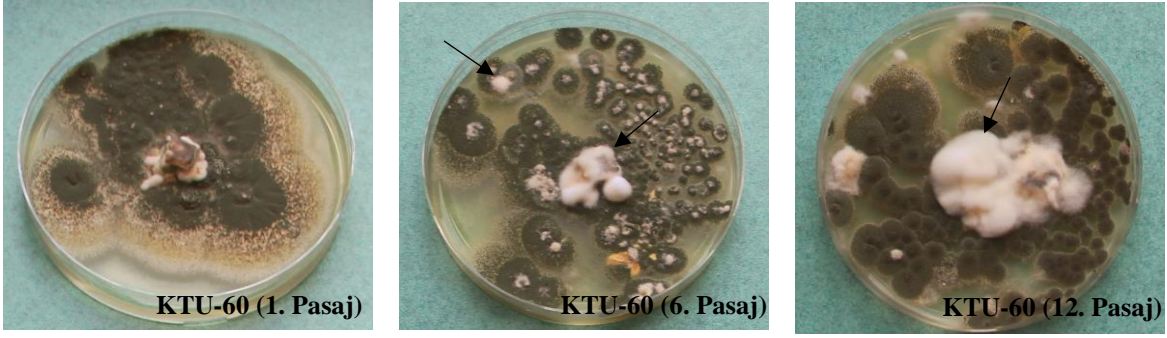
Şekil 11. KTU-51 izolatının pasajlarına ait kültürlerin SDA üzerindeki görüntüleri. İşaretli alanlar fertil olmayan misel büyümelerini göstermektedir.



Şekil 12. KTU-51 izolatının pasajlarına ait kültürlerdeki "V" şeklindeki steril alan oluşumu.

İzolatın pasajlarına ait sporlar UV'ye maruz bırakıldığında kontrol grubu ile pasajlara ait sporların germinasyon yüzdeleri arasında anlamlı bir farklılık gözlenmektedir. Ancak pasajlar kendi arasında kıyaslandığında anlamlı bir farklılığın olmadığı görülmektedir (Tablo 9).

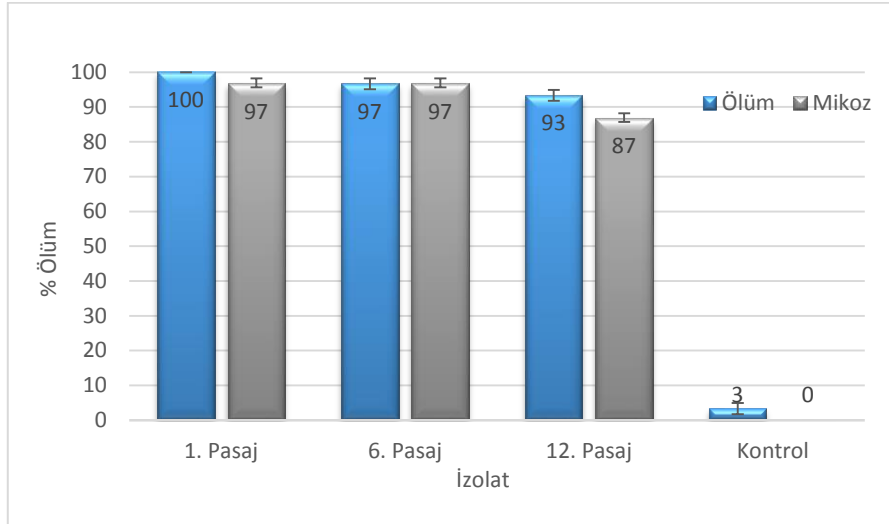
Diğer *Metarhizium* izolatı KTU-60'a ait pasajlar morfolojik özellikleri yönünden birbirleriyle karşılaştırıldığında, sporların oluşturduğu kolonilerin çaplarında 12. pasaja doğru gidildikçe küçülmelerin olduğu görülmektedir. Ancak petri kabının tamamını çevreleyen sporlarda herhangi bir renk değişikliği görülmemektedir. Altıncı pasajdan itibaren küçülmeye başlayan fungal kolonilerin merkezinde fertil olmayan misel büyümeleri gözlenmektedir (Şekil 13). Fungal sporlar 15 ve 30 dakikalık UV'ye maruz bırakıldıklarında ise pasajların kendi arasında germinasyon yüzdelerinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Tablo 9).



Şekil 13. KTU-60 izolatının pasajlarına ait kültürlerin SDA üzerindeki görüntüleri. İşaretli alanlar fertil olmayan misel büyümlerini göstermektedir.

### 3.5. Ardışık Pasajlamanın Virulans Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

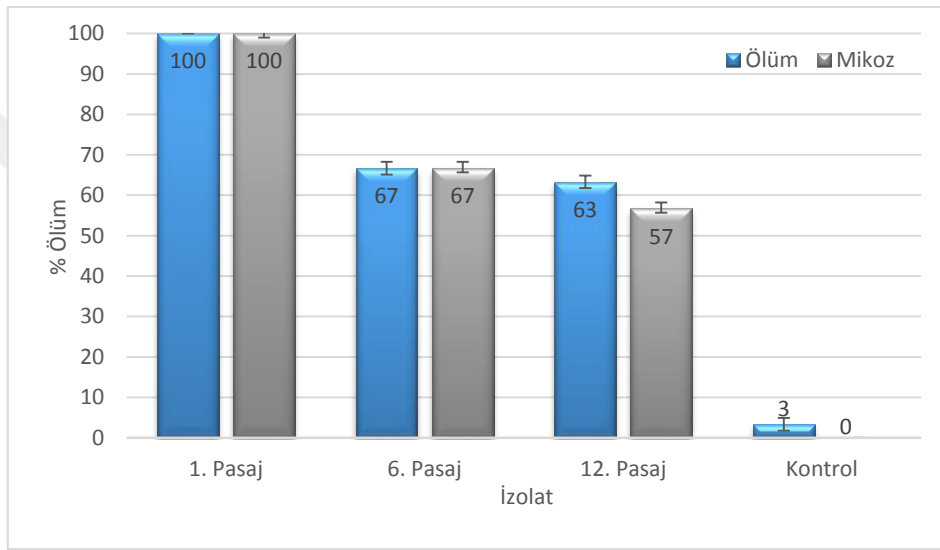
*Metarhizium* suşlarına ait pasajların virulans özelliklerinde kayıp olup olmadığının belirlenmesi için yapılan bu deneyde KTU-2 izolatı 1. pasajda %100 oranında ölüm gösterirken, 12. pasajda bu oran %93'e düşmüştür (Şekil 14). Ancak, bu düşüş ardışık pasajlanma sayısı ile karşılaştırıldığında, pasajlar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir ( $p < 0,05$ ). Bu durumda izolatın 1'den 12'ye doğru pasajlandığında virulans özelliğinde de kararlı olduğu söylenebilir.



Şekil 14. KTU-2 izolatına ait pasajların *G. mellonella* larvalarına karşı patojeniteleri ve kadavralar üzerindeki mikozlanma oranları. Ölüm değerleri Abbott formülü (Abbott, 1925) kullanılarak hesaplandı. Sütunların üzerindeki sayılar patojenite değerlerini, barlar ise standart sapmayı göstermektedir.

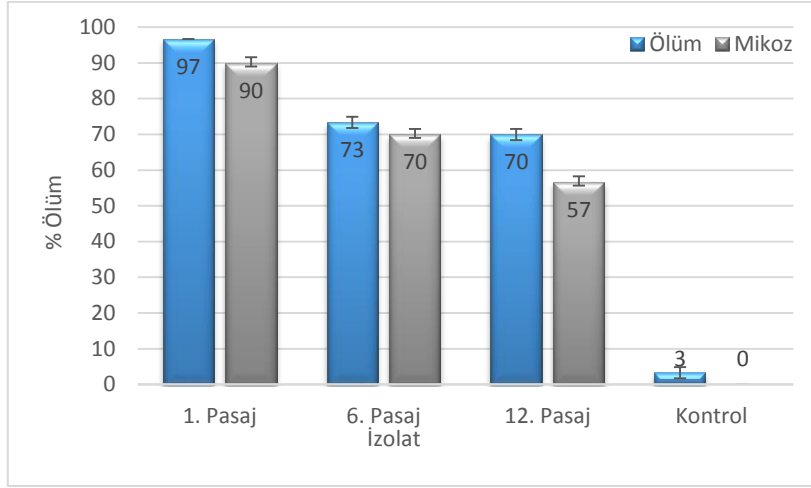


Diğer *Metarhizium* suşu olan Gg-12 izolatı, *M. melolontha* ve *G. mellonella* larvaları üzerinde oldukça yüksek öldürücü etki göstermesine rağmen, bu etki pasajlanma sayısına paralel olarak düşüş göstermektedir. İzolatın morfolojik değişimleri de göz önünde bulundurulduğunda virulanstaki bu değişim beklenen bir durum arz etmektedir. Gg-12 suşunun pasajlarına ait konidilerle *G. mellonella* larvalarının enfeksiyonu sonucunda 1. ve 12. pasajları arasında anlamlı bir farklılığın olduğu görülmektedir ( $p<0,05$ ) (Şekil 15).



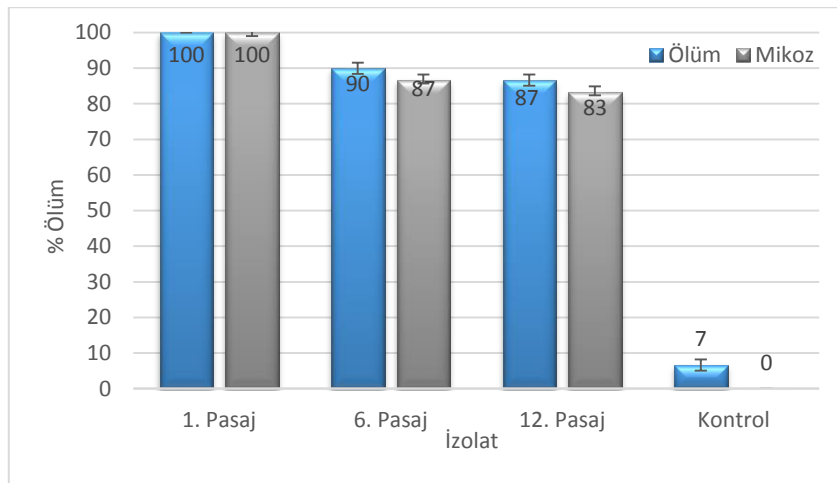
Şekil 15. Gg-12 izolatına ait pasajların *G. mellonella* larvalarına karşı patojeniteleri ve kadvralar üzerindeki mikozlanma oranları. Ölüm değerleri Abbott formülü (Abbott, 1925) kullanılarak hesaplandı. Sütunların üzerindeki sayılar patojenite değerlerini, barlar ise standart sapmayı göstermektedir.

Ardışık pasajların virulans üzerine etkisi incelenen diğer bir *Metarhizium* suşu KTU-51, ilk pasajda yüksek oranda öldürücü etkiye sahipken, bu etkinin 6. ve 12. pasajda düştüğü görülmektedir (Şekil 16). Pasajlar kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı farklılığın 1.-12. ve 1.-6. pasajlar arasında olduğu görülmektedir ( $p<0,05$ ). İzolatın pasajlarında oluşan morfolojik değişimler göz önünde bulundurulduğunda 6. pasajdan itibaren oluşan “V şekli” koloniler virulansın düşmesi ile ilişkilendirilebilir.



Şekil 16. KTU-51 izolatına ait pasajların *G. mellonella* larvalarına karşı patojeniteleri ve kadvralar üzerindeki mikozlanma oranları. Ölüm değerleri Abbott formülü (Abbott, 1925) kullanılarak hesaplandı. Sütunların üzerindeki sayılar patojenite değerlerini, barlar ise standart sapmayı göstermektedir.

KTU-60 izolatının pasajları arasındaki virulans farklılığı incelendiğinde, ilk pasajda *G. mellonella* larvaları üzerindeki öldürücü etkinin %100 olduğu görülmektedir. Altıncı pasajda bu oran %90'a, 12. pasajda ise %87'ye düşmektedir (Şekil 17). Altıncı ve 12. pasajlar arasında anlamlı bir fark görülmemekle birlikte ( $p < 0,05$ ), virulansa ait bu sonuçlar izolatın morfolojik bulguları ile uyum sağlamaktadır.

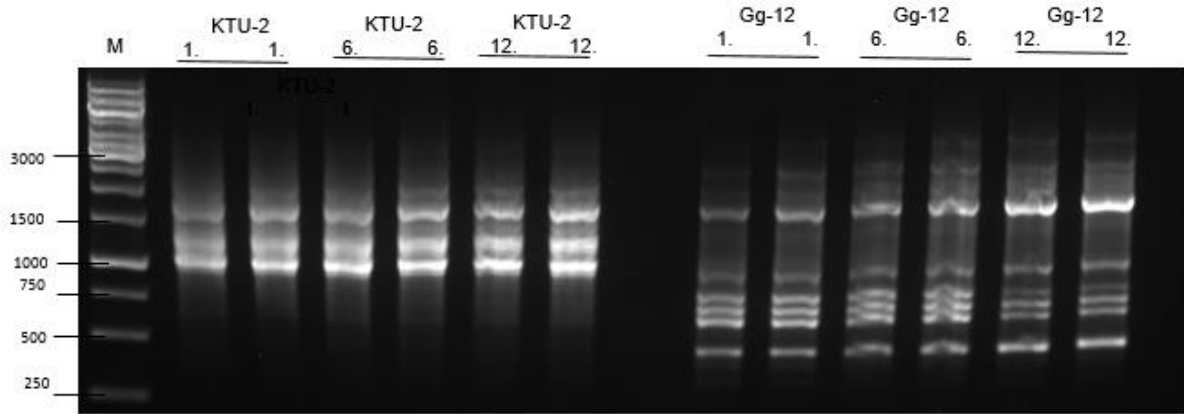


Şekil 17. KTU-60 izolatına ait pasajların *G. mellonella* larvalarına karşı patojeniteleri ve kadvralar üzerindeki mikozlanma oranları. Ölüm değerleri Abbott formülü (Abbott, 1925) kullanılarak hesaplandı. Sütunların üzerindeki sayılar patojenite değerlerini, barlar ise standart sapmayı göstermektedir.

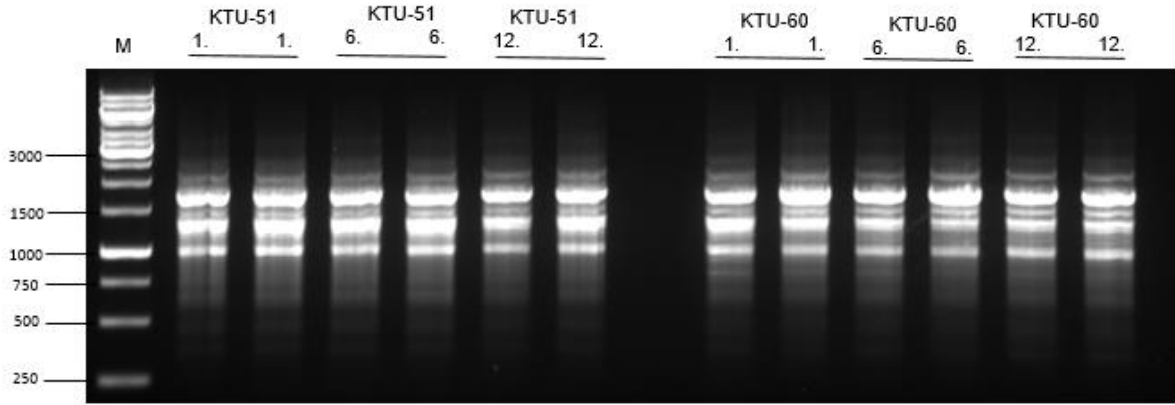
### 3.6. Ardışık Pasajlamanın Genotipik Dejenerasyona Etkisinin Belirlenmesi

#### 3.6.1. RAPD-PCR

Pasajlar arasındaki genotipik değişikliğin varlığının tespit edilmesi amacıyla 5 farklı primer ile yapılan RAPD-PCR sonuçlarından elde edilen bant profillerine göre, virulansı yüksek olan suşların pasajları arasında herhangi bir farklılığın olup olmadığı incelenmiştir. KTU-2 izolatının, OPA-3 primeri ile muamele edilmesi sonucunda 1., 6. ve 12. pasajlardan 4 farklı bant profili elde edilmiş ve bu bantlar tüm pasajlarda 1000,1200,1500 ve 2000 bp uzunluğundadır(Şekil 18a). Gg-12 suşunda ise 9 farklı bant profili görülmekle birlikte bu profillerin tüm pasajlarda farklılık göstermediği sonucuna varılmıştır (Şekil 18a). KTU- 51 izolatı aynı primer ile PCR işlemine tabi tutulduğunda yine 11 farklı uzunlukta bağlanmanın gerçekleştiği görülmektedir (Şekil 18b). Ancak, bu profiller tüm pasajlarda beklenildiği gibi farklılık göstermemektedir. Virulansı yüksek olan Gg-60 izolatında ise yine 11 farklı bağlanma görülmekle birlikte bu bağlanmalar yine üç pasajda da aynı uzunluklara tekabül etmektedir (Şekil 18b).

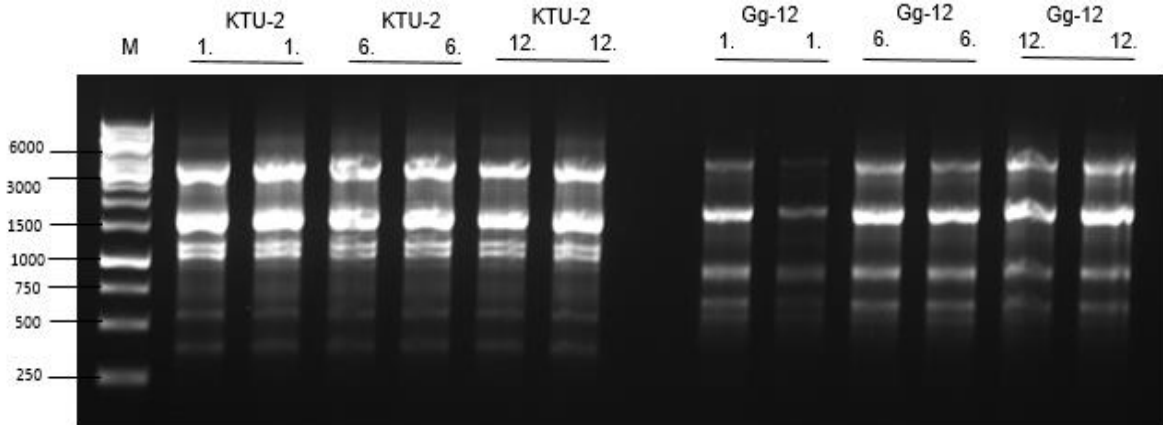


Şekil 18a. İzolatlardan elde edilen pasajların OPA-3 bölgesinin RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılması. M: 1000 bp DNA ladder, 1: 1. pasaj, 6: 6. pasaj, 12: 12. pasaj.



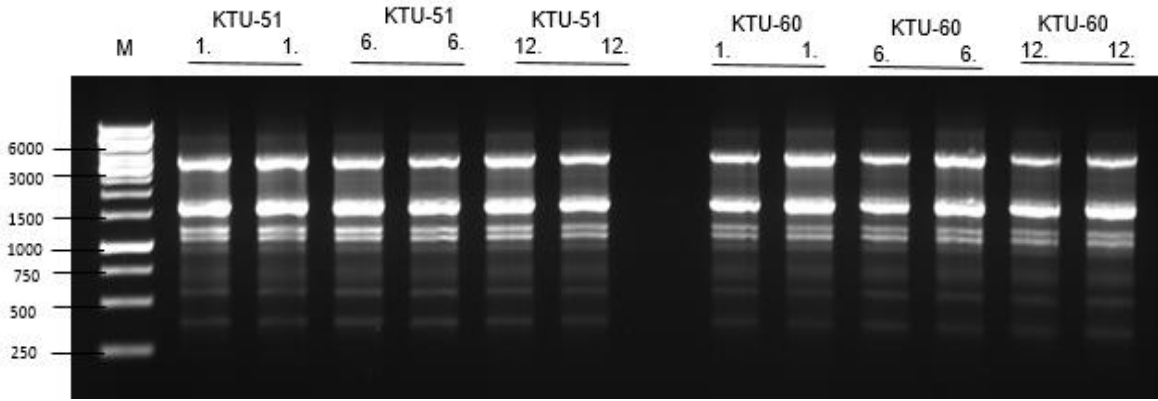
Şekil 18b. İzolatlardan elde edilen pasajların OPA-3 bölgesinin RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılması. M: 1000 bp DNA ladder, 1: 1. pasaj, 6: 6. pasaj, 12: 12. pasaj.

RAPD-PCR işleminde kullanılan OPA-8 primeri ile izolatlara ait DNA'ların bağlanmaları incelendiğinde KTU-2 izolatı bu kez 9 farklı uzunlukta fragment oluşturmuştur. Ancak pasajlar arasında oluşan bu fragmetler beklenildiği gibi farklılık göstermemektedir. Gg-12 suşuna bakıldığında, oluşan 5 farklı uzunlukta bant üç pasajın tümünde de değişiklik göstermemektedir (Şekil 19a).



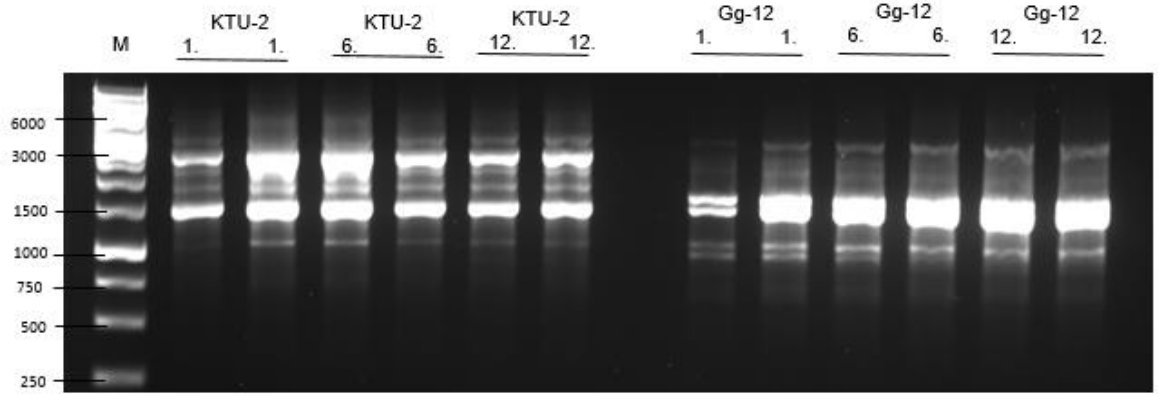
Şekil 19a. İzolatlardan elde edilen pasajların OPA-8 bölgesinin RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılması. M: 1000 bp DNA ladder, 1: 1. pasaj, 6: 6. pasaj, 12: 12. Pasaj.

KTU-51 izolatına ait DNA'lar OPA-8 primeri ile muamele edildiğinde 9 farklı uzunlukta fragment elde edilmiştir. Bu fragmetler incelendiğinde üç pasajda da uzunluklarının aynı olduğu görülmektedir. Öldürücü etkisi yüksek olan Gg-60 izolatı ise yine aynı primerle üç pasajda da aynı yerlerde 8 farklı uzunlukta bağlanma göstermiştir (Şekil 19b).



Şekil 19b. İzolatlardan elde edilen pasajların OPA-8 bölgesinin RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılması. M: 1000 bp DNA ladder, 1: 1. pasaj, 6: 6. pasaj, 12: 12. pasaj.

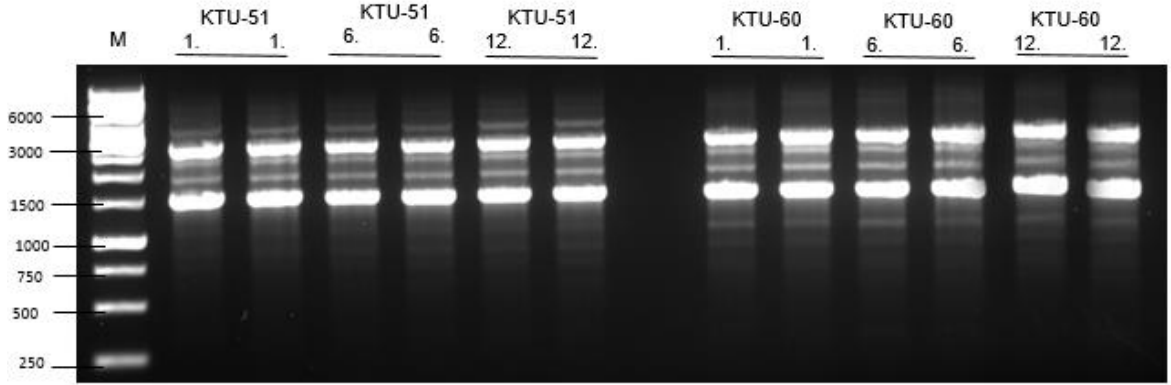
Genotipik dejenerasyonun varlığını tespit etmek amacıyla KTU-2 izolatından izole edilen DNA'lar bu kez OPB-4 primeri ile muamele edilmiş ve oluşan bant profilleri incelenmiştir. Agaroz jel görüntüleri analiz edildiğinde üç pasajda da oluşan fragmentlerin aynı uzunlukta ve sayıda olduğu (7 adet) görülmektedir. Virulansı yüksek olan Gg-12 suşunun pasajlarında da yine beklenen sonuçlar elde edilmiş ve pasajlar arasında herhangi farklı bir bağlanma görülmemektedir (Şekil 20a).



Şekil 20a. İzolatlardan elde edilen pasajların OPB-4 bölgesinin RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılması. M: 1000 bp DNA ladder, 1: 1. pasaj, 6: 6. pasaj, 12: 12. pasaj.

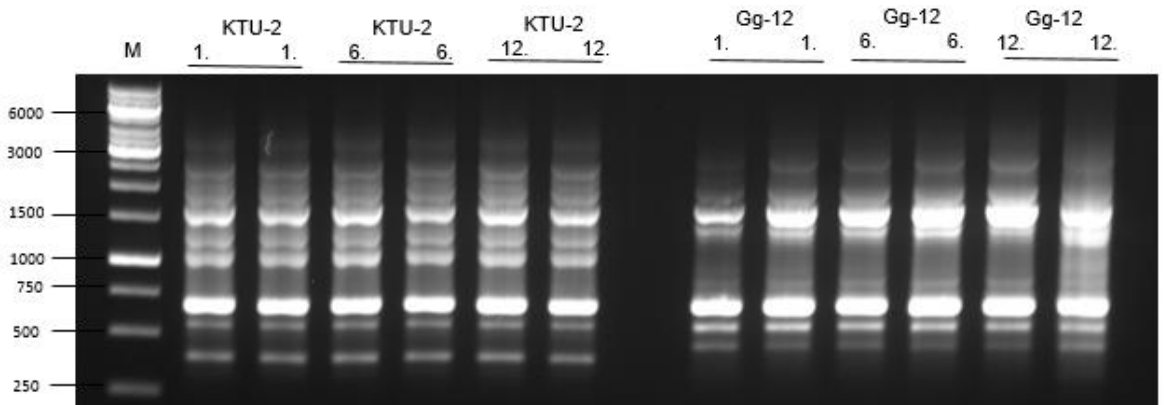
OPB-4 primeri ile muamele edilen diğer *Metarhizium* suşu (KTU-51) incelendiğinde pasajların üçünde de aynı uzunlukta 10 farklı bağlanmanın olduğu görülmektedir. Bu sonuç izolatta herhangi bir genotipik değişikliğin olmadığını doğrulamaktadır. KTU-60 suşunun oluşturduğu fragmentler incelendiğinde 8 farklı

uzunlukta bağlanmanın olduğu görülmektedir. Bu bağlanmalar pasajların üçünde de beklenildiği gibi herhangi bir farklı profil oluşturmamıştır (Şekil 20b).



Şekil 20b. İzolatlardan elde edilen pasajların OPB-4 bölgesinin RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılması. M: 1000 bp DNA ladder, 1:KTU-2, 2:Gg-12, 3:KTU-51, 4:KTU-60.

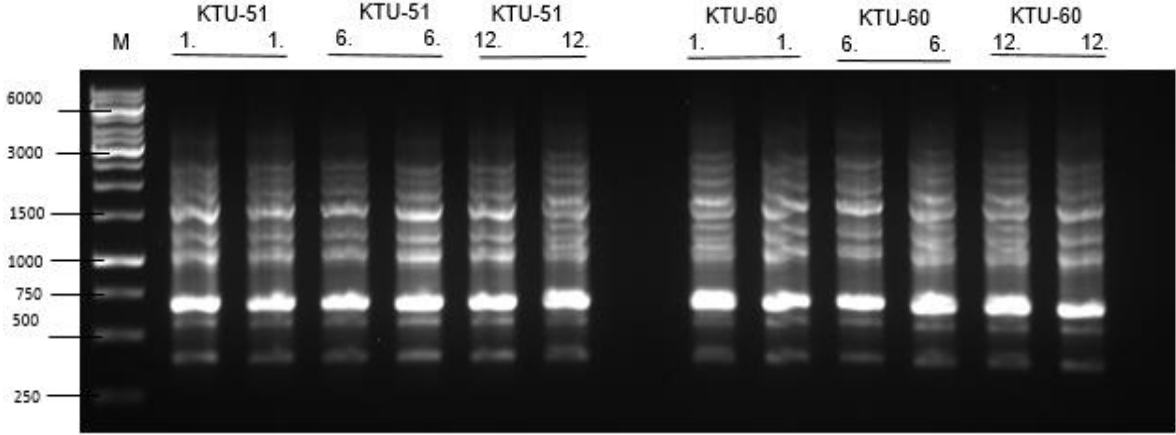
İzolatların RAPD-PCR işlemine tabii tutulduğu dördüncü primer OPB-7 primeridir. KTU-2 suşunun bu primerle oluşturduğu bağlanmalar incelendiğinde 9 farklı uzunlukta bağlanmanın olduğu görülmektedir. Yapılan iki tekrarlı çalışmada da bu bağlanmaların üç pasajda da aynı uzunlukta olduğu görülmektedir. Gg-12 izolatı ise yine aynı primerle 8 farklı bağlanma yapmış, sonuç beklenildiği gibi pasajlar arasında herhangi farklı bir uzunlukta fragment elde edilmemiştir (Şekil 21a).



Şekil 21a. İzolatlardan elde edilen pasajların OPB-7 bölgesinin RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılması. M: 1000 bp DNA ladder, 1: 1. pasaj, 6: 6. pasaj, 12: 12. pasaj.

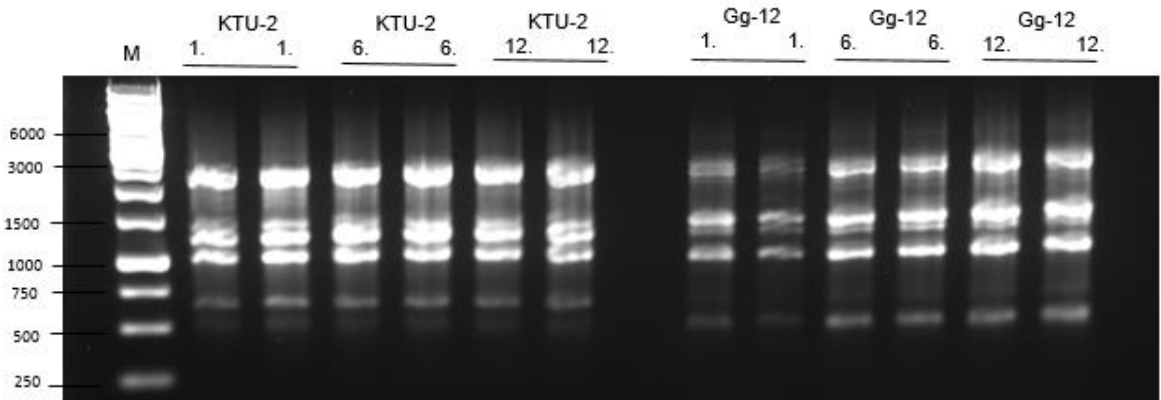
Aynı primerle muamele edilen KTU-51 izolatına ait DNA'ların oluşturduğu bant profilleri incelendiğinde üç pasajın üçünde aynı uzunlukta 10 farklı bağlanmanın meydana

geldiği görülmektedir. Son *Metarhizium* suşu (KTU-60), KTU-51 izolatına benzer şekilde 10 farklı uzunlukta fragment oluşturmuş ve oluşan bu fragmentlerin tamamı pasajların tamamında aynı uzunlukta (Şekil 21b).



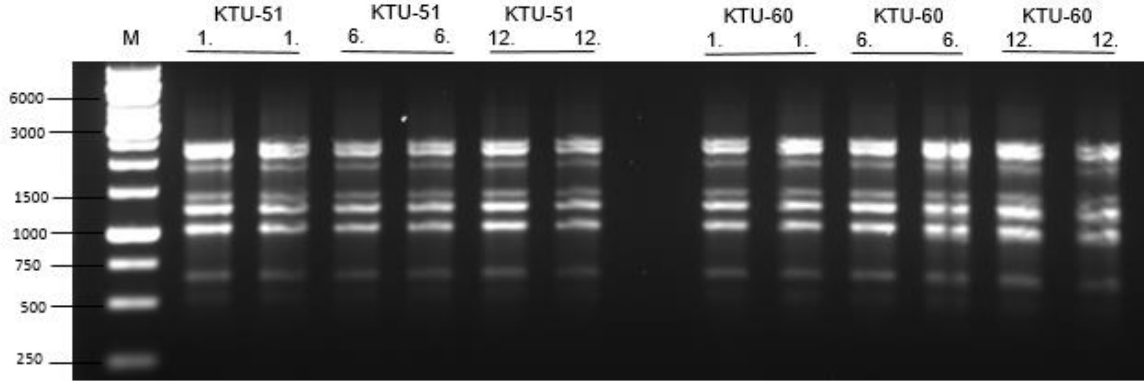
Şekil 21b. İzolatlardan elde edilen pasajların OPB-7 bölgesinin RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılması. M: 1000 bp DNA ladder, 1: 1. pasaj, 6: 6. pasaj, 12: 12. pasaj.

Virulansı yüksek izolatların pasajlandıkça genotiplerinin kararlı olduklarının belirlenmesinde kullanılan son primerle (OPE-1) PCR işlemine tabii tutulan KTU-2 suşunun oluşturduğu bant profilleri incelendiğinde agaroz jel üzerinde 6 farklı fragment görülmektedir. Bu fragmentler tekrarlanan pasajlar arasında tamamen aynı olup, herhangi bir farklılık görülmemektedir. Gg-12 izolatı ise aynı primerle 7 farklı uzunlukta fragment oluşturmuş ve bu fragmentlerin tamamının üç pasajın tümünde de aynı uzunlukta olduğu tespit edilmiştir (Şekil 22a).



Şekil 22a. İzolatlardan elde edilen pasajların OPE-1 bölgesinin RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılması. M: 1000 bp DNA ladder, 1: 1. pasaj, 6: 6. pasaj, 12: 12. pasaj.

KTU-51 izolatının aynı primerle oluşturduğu bant profilleri incelendiğinde bu izolatta yine ardışık pasajların tamamında 8 farklı uzunlukta fragment elde edilmiştir. Yani izolatın genotipinde herhangi bir değişiklik söz konusu değildir. KTU-60 suşu ise KTU-51 izolatına benzer şekilde 8 farklı uzunlukta bağlanma oluşturmuş ve oluşan bu bantların tamamının ardışık pasajların üçünde de aynı büyüklükte olduğu görülmüştür (Şekil 22b).



Şekil 22b. İzolatlardan elde edilen pasajların OPE-1 bölgesinin RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılması. M: 1000 bp DNA ladder, 1: 1. pasaj, 6: 6. pasaj, 12: 12. pasaj.

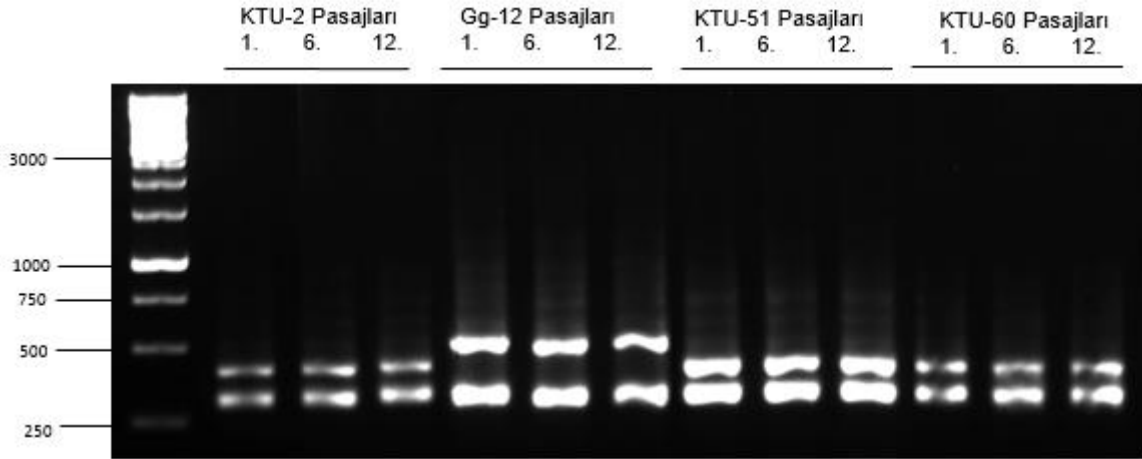
RAPD-PCR işlemi sonuçlarının tamamı incelendiğinde izolatların tamamının ardışık pasajlarında herhangi bir farklı bant profili elde edilmemiştir. Bu durum virulansının yüksek olduğu bilinen 4 farklı *Metarhizium* suşunun genotipinde değişiklik olmadığını göstermektedir. Bu durumu doğrulamak amacıyla PCR işlemine tabi tutulan pasajlar, 10<sup>3</sup>lu tekrarlarından rastgele seçilerek, 2 kez tekrar edilmiştir.

### 3.6.2. Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesim

*Rsa* I, *Hpa* II ve *Dde* I restriksiyon endonükleaz enzimleri, 4 farklı *Metarhizium* izolatından elde edilen *Pr1* geninde herhangi bir polimorfizmin varlığını belirlemek amacıyla kullanıldı. Reaksiyon sonucunda yüksek derecede polimorfizm varlığını belirlemeye yarayan 3 farklı enziminde Nested PCR yöntemi ile çoğaltılan *Pr1* gen bölgesini kestiği belirlendi. Reaksiyon 10 tekrarlı yapılan pasajlardan rastgele seçilen örneklerle, farklı zamanlarda yapılarak 2 kez tekrar edildi. Kesim reaksiyonu sonucunda izolatlar arasında 6 farklı profil tipi oluştuğu belirlendi.

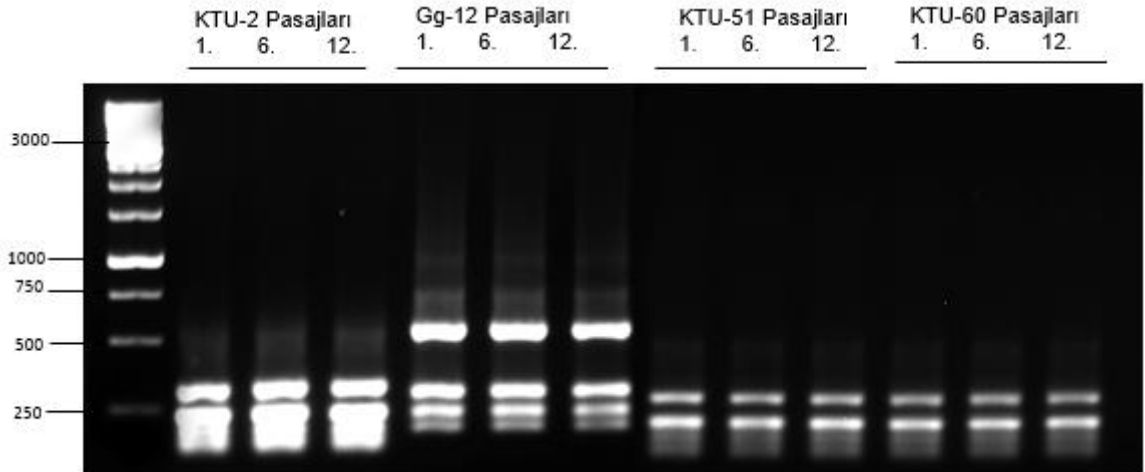


Enzimler tek başına incelendiğinde, *Rsa* I endonükleaz enzimi KTU-2, KTU-51 ve KTU-60 izolatları ile muamele edildiğinde 250-500 bp arasında iki farklı fragmentin olduğu görülmektedir. İzolatların tümünde, ardışık pasajların üçünde de bu fragmentlerin aynı uzunlukta olup farklılık gözlenmemiştir. Gg-12 suşu ise 250-750 bp arasına denk gelen uzunlukta iki farklı fragment oluşturmuş, oluşan bu fragmentler beklenildiği gibi pasajlar arasında herhangi farklılık göstermemiştir (Şekil 23).



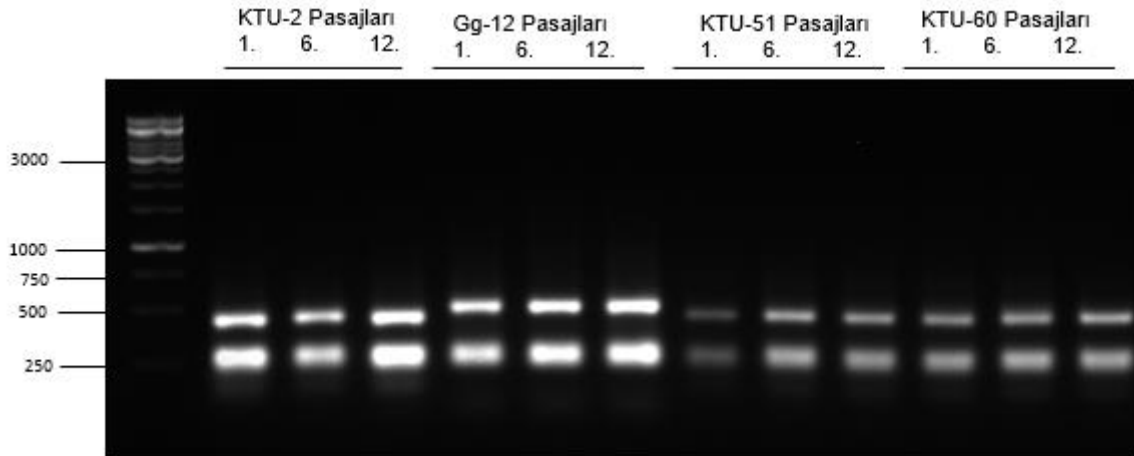
Şekil 23. İzolatlardan elde edilen pasajların, Nested-PCR yöntemi ile çoğaltılmış *Pr1* gen bölgesinin *Rsa* I endonükleaz enzimi ile kesimi. M: 1000 bp DNA ladder, 1: 1. pasaj, 6: 6. pasaj, 12: 12. pasaj.

*Hpa* II endonükleaz enzimi ile kesim reaksiyonu sonucunda oluşan bant profilleri incelendiğinde KTU-2, KTU-51 ve KTU-60 izolatlarının dört farklı bölgeden kesildiği görülmektedir. Oluşan fragmentlerden ikisi 250 bp'den küçük, biri 250 bp uzunluğunda, diğeri ise 250-500 bp arasına denk gelmektedir. Bu fragmentler tekrarlanan pasajların tümünde değişiklik göstermemekle birlikte beklenen sonuçla örtüşmektedir. *Hpa* II enzimi Gg-12 suşunun PCR ürününü yine dört farklı bölgeden kesmiş ve oluşan fragmentlerin biri 250 bp'den küçük, bir tanesi 250 bp uzunluğunda, diğeri ikisi ise 250-750 bp arasına denk gelmektedir. Ancak oluşan fragmentler ardışık pasajların tümünde değişiklik göstermemektedir (Şekil 24).



Şekil 24. İzolatlardan elde edilen pasajların, Nested-PCR yöntemi ile çoğaltılmış *Pr1* gen bölgesinin *Hpa* II endonükleaz enzimi ile kesimi. M: 1000 bp DNA ladder, 1: 1. pasaj, 6: 6. pasaj, 12: 12. pasaj.

Polimorfizmin belirlenmesi amacıyla tercih edilen *Dde* I endonükleaz enzimi, kararlılık testine tabii tutulan KTU-2, Gg-12, KTU-51 ve KTU-60 izolatlarının tümünde aynı tip bant profili oluştururmuştur. Agaroz jel görüntüsü incelendiğinde oluşan fragmentlerin pasajların tümünde 250-500 bp arasında olup değişiklik göstermedikleri anlaşılmaktadır (Şekil 25).



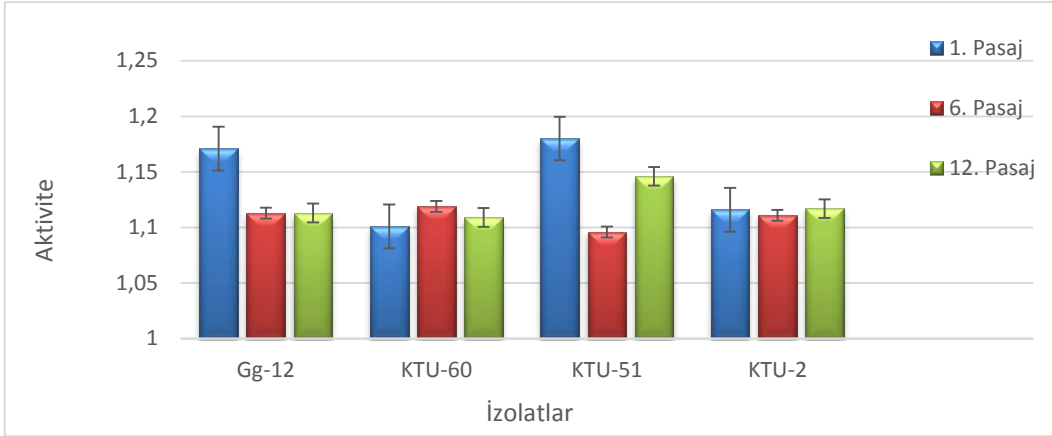
Şekil 25. İzolatlardan elde edilen pasajların, Nested-PCR yöntemi ile çoğaltılmış *Pr1* gen bölgesinin *Dde* I endonükleaz enzimi ile kesimi. M: 1000 bp DNA ladder, 1: 1. pasaj, 6: 6. pasaj, 12: 12. pasaj.

### 3.7. Ardışık Pasajlamanın Biyokimyasal Dejenerasyona Etkisinin Belirlenmesi

#### 3.7.1. Proteolitik Aktivitenin Belirlenmesi

*Metarhizium* suşlarının ardışık pasajlarına ait *Pr1* geninin aktivitesini belirlemek amacıyla, 1., 6. ve 12. pasajları 2.6.1’de belirtilen minimal besiyerinde büyütüldü. Doksan altı saatlik inkübasyonun ardından besiyeri 10000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek, elde edilen süpernetandaki protein içeriği Bradford metodu ile belirlendi. Protein içerikleri aynı oranda seyreltildikten sonra 2.6.2’de belirtilen miktarlarda N-succinly-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA substratı ile muamele edildi. Deney pasajların 10’lu tekrarlarından rastgele 2 farklı petri seçilerek, iki kez tekrar edildi.

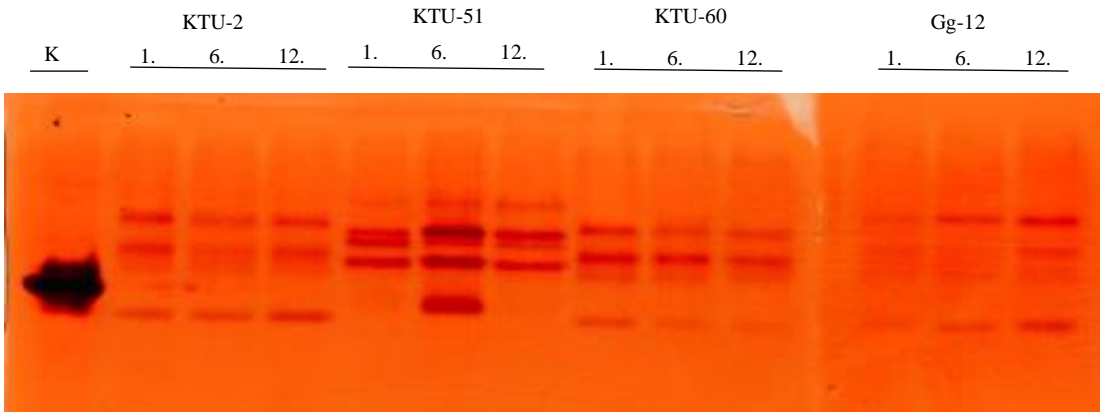
İzolatların ardışık pasajları arasındaki biyokimyasal kararlılığın belirlenmesi amacıyla yapılan proteolitik aktivite deneyinde *Metarhizium* suşları tek tek incelendiğinde, Gg-12 suşunun 1. pasajda aktivitesi yüksek seviyelerdeyken, 6. ve 12. pasajda ani bir düşüş göstermiştir. Bu durum izolatın ilk pasajın akabindeki pasajlarında substratı parçalama aktivitesinde kararsız olduğunu göstermektedir. KTU-60 izolatı en yüksek aktivitesini 6. pasajında göstermiş, 1. pasajda bu aktivite daha düşük, 12. pasajda ise 1. pasajdan yüksek, 6. pasajdan düşüktür. Bu izolatta aktiviteler birbirinden farklı olmakla birlikte, sayısal değerler önemli derecede farklılık göstermemektedir. KTU-51 izolatının aktivite değerleri ele alındığında, bu izolatın en yüksek aktivite değerinin 1. pasajdan elde edildiği görülmektedir. 6. pasajda aktivitenin hızla düştüğü, 12. pasajda değer tekrar arttığı görülmektedir. KTU-2 izolatı ise diğer *Metarhizium* suşlarına göre daha düşük aktivite göstermesine rağmen pasajları arasında iniş çıkışlar göstermemiştir. Bu durum seçilen türün ardışık pasajları arasında aktivite açısından da kararlı olduğunu doğrulamaktadır (Şekil 26).



Şekil 26. *Metarhizium* izolatlarının ardışık pasajlarının N-succinly-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA substratı ile muamele edilmesi sonucu gösterdiği enzim aktiviteleri. Barlar standart sapmayı göstermektedir.

### 3.7.2. Esteraz Profillerinin Belirlenmesi

*Metarhizium* suşlarından elde edilen pasajların aktif enzim profillerini belirlemek amacıyla yapılan bu deneyde KTU-2 izolatına ait ardışık pasajların benzer bant profilleri incelendiğinde, proteaz aktivitesi sonuçlarında olduğu gibi, izolatın aktif proteinleri açısından da kararlı suş olduğu görülmektedir. KTU-51 suşu incelendiğinde izolatın 1. ve 12. pasajdaki aktivitesinin, 6. pasajdaki aktivitesine oranla daha düşük olduğu görülmektedir. KTU-60 izolatında ise aynı enzimin üç pasajda da aktif olduğu ancak 1. pasajdaki aktivitenin 6. ve 12. pasajlara oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Gg-12 izolatının 6. ve 12. pasajda aktif görünen bir enzimi, ilk pasajda elde edilen silik bant profillerine göre azalmanın olduğunu gösterdiğinden aktivitesinin kararsız olduğu şeklinde yorumlanabilir (Şekil 27).



Şekil 27. *Metarhizium* izolatlarının ardışık pasajlarının NATİVE-PAGE üzerindeki aktif enzim profilleri. K: Pozitif kontrol, 1: 1. pasaj, 6: 6. pasaj, 12: 12. pasaj.

### 3.8. Fungal Konidilerin Kuru Formülasyonu

Bifazik kültür sistemine göre iki farklı *Metarhizium* suşuna ait 1., 6. ve 12. pasajlara ait konidilerin katı substrat (pirinç) üzerinde büyütülmesi işlemi gerçekleştirildi. Pasajlara ait üretilen pirinç formülasyonları birbirleri arasında kıyaslandığında KTU-2 izolatına ait 1. ve 12. pasajdan elde edilen pirinç formülasyonunun 6. pasaja oranla daha yüksek oranda çimlendiği görülmektedir (Şekil 28-A). KTU-60 izolatının pasajlarına ait formülasyonlar incelendiğinde ise 1. pasajdaki çimlenme oranının 6. ve 12. pasajda da görülebilmesi için bu pasajlara ait kültür kaplarının daha uzun süre inkübasyona ihtiyacı olduğu söylenebilir (Şekil 28-B).



Şekil 28. *Metarhizium* izolatlarına ait ardışık pasajların kuru formülasyonları A: KTU-2, B:KTU-60.

#### 4. TARTIŞMA

*Metarhizium anisopliae* oldukça yaygın ve toprak orjinli bir entomopatojen fungus olup, zararlılarla entegre mücadelede orman ve tarım alanlarında güvenle kullanılmaktadır. Türün sınırlı bir konak aralığına sahip olması ve hedef olmayan organizmalara zarar vermemesi biyopestisit çalışmalarında önem arz etmektedir. Farklı zararlılar üzerinde etkili olan *M. anisopliae* suşuna ait pek çok ticari preperat bulunmaktadır (Faria ve Wraight 2007). Biyolojik mücadele açısından, fungusların ticari preperat haline getirilmesi noktasında, izolatların yerel tür çeşitliliği ve dağılımının bilinmesi, entomopatojenik fungusların yerel popülasyonlarının bir ekosistemde böcek popülasyonlarıyla mücadeleyi sağlamak için kullanılması durumunda önem teşkil etmektedir (Meyling ve Eilenberg, 2006). Son yıllarda, fungal biyolojik mücadele etmenleri yeterli nem ve uygun sıcaklığın olmayışı gibi çevresel yetersizliklerden dolayı tutarsızlıklar sergilemektedir (Jackson vd., 2000). Bununla birlikte, yerel izolatlar yabancı izolatlarla karşılaştırıldıklarında zararlı böcekler ile ekolojik uygunluğa sahip olabilmeleri bunların hedef dışı organizmalar üzerindeki olumsuz etkilerini de önemli derecede azaltmaktadır (Gulsar vd., 2004; Takatsuka, 2007). Bu bilgiler doğrultusunda, tez kapsamında kullanılan izolatlar, başarılı bir biyopestisit üretimi gerçekleştirmek adına bölgenin iklimsel koşulları da dikkate alındığında tamamen yerel popülasyonlardan seçilmiştir.

Geniş ölçekli fungal biyopestisit üretiminde seçilen suşun in-vitro ortamda kararlılığı en önemli husustur. Suşun biyopestisit halinde virulansını sürdürebilmesi elzemdir ancak *M. anisopliae* birçok zararlı üzerinde yüksek öldürücü etkiye sahip olmasına rağmen, yapay besiyeri üzerindeki ardışık pasajlarında virulansını düşürmeye meyillidir (Shah ve Butt, 2005, Lösch vd., 2010). Şimdiye kadar bu sorun, ardışık pasajlama işleminden önce ana konağa enfeksiyonun ardından virulansın restorasyonu sağlanarak giderilmeye çalışılıyordu. Ancak, bu yöntem zaman alıcı ve yüksek kontaminasyon riski barındırmaktadır. Halen fungal türlerin yapay besiyeri üzerinde pasajlandıklarında neden virulanslarını yitirdikleri hakkında kesin bilgi olmamakla birlikte bazı türlerin diğerlerine göre daha hızlı virulanslarını düşürdükleri bilinmektedir (Hutwimmer vd., 2008). Kararlı suşların birkaç nesil boyunca virulanslarını koruduğu bilinmektedir, oysaki kararlı olmayan suşlar genellikle birkaç pasaj sonrasında virulanslarını kaybetmeye meyillidir. Tüm bu sebeplerden

dolayı fungal bir suştan başarılı ve verimli bir biyopestisit geliştirebilmek için kararlı suşun seçimi en önemli basamaktır.

Kimoelastas *Pr1* proteazı *M. anisopliae* tarafından üretilmekte olup, diğer patojenik fungusların entomopatojenitesi için belirleyici bir model oluşturmaktadır (Charnley ve St. Leger, 1991). *Metarhizium* cinsine ait fungusların enfeksiyonu sırasında *Pr1* geni, böcek kutikulasını degrede edebilme yeteneği kadar önemsenir. Kütikular proteinlerin yapısı ile kutikuladan içeri giriş kabiliyeti ikinci derece önemli olup, penetrasyondan önceki yüksek konsantrasyonda ve tutarlı olan kutikular proteinlerin hidrolizi virulansın artmasına yardımcı olur (Goettel vd., 1989; St Leger vd., 1989). Yapılan bir çalışmada *Metarhizium* cinsine ait *Pr1* proteazının antiserumu veya gene spesifik inhibitör kullanıldığında, *Pr1* geni bloklandığı için, genin böcek kutikulasından penetrasyonu mümkün olmadığından enfeksiyon oranında düşüşler gözlenmiştir. Bu sonuçlar genin ekspresyon seviyesinin fungusun hastalık yapma kapasitesi ile doğru orantılı olduğunu ispatlamaktadır (St. Leger vd., 1988). Bu sebeplerden dolayı izolatın patojenitesini analiz etmek için *Pr1* geninin izolasyonu önemli bir basamaktır (St Leger vd., 1992). Bu tez çalışmasında virulansı yüksek olan 9 adet *Metarhizium* suşunda *Pr1* geni taraması yapılmış ve tüm izolatlarda yaklaşık 1200 bp uzunluğundaki bu genin varlığı tespit edilmiştir. Bu basamak virulans için oldukça önemli olup, ileriki aşamada biyopestisit üretiminde önemli rol oynamaktadır.

*Pr1* geni aktif olduğunda fungal sporun böcek kutikulasına penetrasyonun başlangıç aşamasında ve çok sayıda hidrolitik enzimin kutikulaya salınmasında önemli rol oynar (Cherrie-Lee ve Bidochka, 2005; Segers vd., 1995). Bunun dışında konidial germinasyon, kutikula bozuklukları ve sonraki enfeksiyon basamakları için besinlerin salınımını kolaylaştırır (Perinotto vd., 2014). Wang vd., (2002) yaptıkları bir çalışmada *Pr1* geni aktif ve inaktif olan *M. anisopliae* suşuna ait spor süspansiyonunu *Galleria mellonella* larvaları ile muamele etmiş ve *Pr1* geninin inaktif olduğu biyoassay kaplarında oldukça düşük ölüm oranları elde etmiştir. Bu sonuçlar biyopestisit yapımında *Pr1* geninin aktivitesinin oldukça önemli rol oynadığını göstermektedir. Bu bağlamda seçilen 9 adet *Metarhizium* suşunda varlığı teyit edilen kimoelastas (*Pr1*) geninin ekspresyonu ve aktivitesi besiyeri içerisine eklenen kitin varlığında, N-succinly-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA substratı kullanılarak test edildi (Şekil 8). Aktivite testleri enzimin optimum çalışma koşulları ile fungusun büyüme sıcaklığı ve arazi şartları düşünülerek 3 farklı sıcaklıkta 3 tekrarlı yapıldı. 96 gözlü plaklarda yapılan deney sonucunda KTU-2 izolatı 3 farklı sıcaklıkta da en yüksek aktiviteyi gösterdi. Diğer

izolatların da bu sıcaklıklarda farklı oranlarda aktif oldukları belirlendi. Pr1 geninin aynı tür içindeki bu farklı aktivite değerleri şaşırtıcı değildir. *Metarhizium anisoplae* ve *Beauveria bassiana* suşlarına ait proteazların çeşitlilik gösterdiği daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (St Leger vd., 1986; Gillespie vd., 1998). Bunun yanında *M. anisoplae* türüne ait proteazların çoklu izoformları olduğu da bilinmektedir (St Leger 1994).

Entomopatojenik fungusların yapay besiyerinde ardışık pasajlandıklarında morfolojik değişime uğrayarak, virulanslarında düşüş gösterdikleri düşünülmektedir (Butt vd., 2006). Bu durumu açıklamak için ‘fenotipik (soytürel) dejenerasyon’, ‘fenotipik kararsızlık’, ‘fonotipik bozulma’, ‘mutasyon ve ateniasyon’ gibi pek çok terim kullanılmaktadır (Kawakami, 1960; Nagaich, 1973; Ibrahim vd., 2002; Ryan vd., 2001). Dejenere olmuş fungal kültürler üreticilerin en çok endişe duyduğu konudur, çünkü kitle üretiminde spor verimi ve virulanstaki düşüş ürünü ticari açıdan kullanım dışı bırakacaktır (Butt, T., Wang, C., Shah, F., A. ve Hall, R., 2006). Bazı fungal türlerin tek pasajda virulansını kaybettiği bilinmektedir (Butt, T. M., Yayınlanmamış Veri). Nagaich 1973 yılında yaptığı bir çalışmada *Verticillium lecanii* türünün virulansının 2 veya 3 ardışık pasajlamanın ardından düştüğünü göstermiştir. Hajek 1990 yılında yaptığı bir çalışmada, saf kültürlerdeki mutlak zamanın uzunluğu virulansı etkilemezken, virulans üzerine en önemli etkinin pasajlama sayısının olduğunu göstermiştir. Bazı suşlar ise 10-12 kez pasajlandıklarında bile virulanslarında herhangi bir azalma görülmemiştir (Morrow vd., 1988; Hajek vd., 1990). Bazı araştırmacılar da >12 pasajın ardından virulansta herhangi düşüşe rastlamamışlardır (Vandenberg ve Cantone, 2004; Brownbridge vd., 2001; Ignoffo vd., 1992; Hall, 1980). Tez kapsamında bu bilgiler göz önünde tutularak öncelikle seçilen *Metarhizium* izolatları (4 adet) 12 tur pasajlanarak, 1., 6. ve 12. pasajlar *Galleria mellonella* larvaları üzerinde test edildi. Sonuçlar incelendiğinde KTU-2 ve KTU-60 suşlarının virulanslarında önemli derecede azalma olmadığı kaydedildi. Daha önce yapılan çalışmalarla, deney sonuçları karşılaştırıldığında, seçilen izolatların ardışık 12 tur pasajlandıklarında virulanslarını yitirmedikleri ve elde edilen verilerin diğer çalışmalarla örtüştüğünü söylemek mümkündür.

Fungusların biyopestisit olarak geliştirilmesinde doğaya uygulandıklarında gösterdikleri istikrarlı tutum oldukça önemlidir. Bunun için seçilen suşun yapay besiyerinde pasajlandıktan sonra genotipik olarak kararlı olup olmadığı araştırılmalıdır (Ansari ve Butt, 2011). Fungal suşun tüm genomunda pasajlandıktan sonra herhangi bir değişikliğin olup olmadığını tespit etmek için RAPD-PCR yöntemi oldukça ayırt edici bir yöntemdir (Cobb



ve Clarkson, 1993; Leal vd., 1994; Tigano-Milani, 1995). Bu bilgiler doğrultusunda yapılan bu tez çalışmasında daha önceki basamaklarda 9 suştan elenerek seçilen 4 adet *Metarhizium* izolatu 5 farklı primerle muamele edilerek pasajlarda genotipik değişiklik olup olmadığı araştırıldı. Leal-Bertioli vd., (2000)'nin yaptıkları bir çalışmada iki farklı *Metarhizium* suşu 8 farklı primerle muamele edilmiş, yaptıkları RAPD-PCR sonucunda bu kültürlerden izole ettikleri DNA'lar ile primerler arasında farklı uzunlukta bir fragment elde edilmemiştir. Bu çalışmaya benzer olarak, tez kapsamında 4 farklı *Metarhizium* (KTU-2, Gg-12, KTU-51 ve KTU-60) suşuna ait 1., 6., ve 12. pasajlardan elde edilen DNA'lar 5 farklı kısa oligolarla (OPA-03, OPA-08, OPB-04, OPB-07, OPE-01) RAPD-PCR işlemine tabii tutulmuş, oluşan fragmentler agaroz jel üzerinde incelendiğinde herhangi bir farklı bant oluşumuna rastlanılmamıştır (Şekil 10-19). Bu sonuçlar seçilen 4 izolatu da genotipik olarak kararlı olduğunu göstermekle birlikte, biyopestisit yapımı için iddialı adaylar olduğunu göstermektedir.

EPF'ların virulansı germinasyon hızı, sporilasyon oranı, toksin miktarı, ürettikleri metabolitler, ve en önemlisi sahip oldukları hücre dışı, doku parçalayıcı enzimlerle ilişkilidir (Valencia, 2002). Daha önce bahsedildiği gibi *Pr1*, bu enzimlerin içinde öne çıkanlardan biridir. EPF larda bu genin varlığı ve aktif olduğunun teyit edilmesinden sonra ardışık pasajlarında genotipik olarak kararlılığın sürdürülebilir olduğunun test edilmesi gerekmektedir. Birçok genetik mekanizma funguslardaki kararsızlığın sebebi olabilir. Bunların arasında transposabl elementler, DNA metilasyonu, dsRNA virüsleri veya kromozom polimorfizmi sayılabilir (Butt vd., 2006). Biyopestisit yapımında seçilecek suşun kararlılığı oldukça büyük bir önem arz ettiğinden, *Pr1* geninin pasajlarına ait konidialarında herhangi bir genotipik değişiklik istenmeyen bir durumdur. Bu bağlamda, tez kapsamında seçilen 4 adet *Metarhizium* izolatu'nun 12 ardışık pasajından rastgele seçilen 1., 6. ve 12. pasajlarına ait petriyelerden DNA izolasyonu yapılarak, bu DNA'lar, *DdeI*, *RsaI* ve *HpaI* restriksiyon endonükleaz enzimleri (Leal vd., 1994) ile kesim işlemine tabii tutuldu. Leal vd., (1997) yaptıkları bir çalışmada aynı yöntemi kullanarak, aynı enzimlerle farklı *Metarhizium* genomları arasındaki *Pr1* genleri arasındaki polimorfizm varlığını incelemişler ve olumlu sonuçlar elde etmişlerdir. Bu çalışma göz önünde bulundurularak 4 adet *Metarhizium* izolatu'nun pasajlardaki polimorfizm incelendiğinde yine olumlu sonuçlar elde edilmiş, agaroz jel üzerinde herhangi bir farklı uzunlukta fragment elde edilmemiştir. Bu sonuçlar tüm izolatu'nun tüm pasajları için geçerli olmakla birlikte (Şekil 20, 21, 22)

biyopestisit yapımında önemli rol oynayan *Pr1* geninin pasajlandıkça herhangi değişikliğe uğramadığı ve kararlı olduğu sonucuna varılabilir.

Bazı çalışmalar entomopatojenik fungusların ardışık pasajlarında virulansın zayıfladıklarını göstermektedir (Safavi, 2011). Bu virulans kaybının, fungusun yapay besiyerinde pasajlandıkça *Pr1* aktivitesinin düşüşüne bağlı olarak, *Metarhizium anisopliae* (Latch, 1965; Al-Aidroos ve Seifert 1980; Wang vd., 2003; Shah vd., 2005) ve *Beauveria bassiana* (Samsinakowa ve Kalova, 1983) türlerinde görüldüğü daha önce yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Bizim bulgularımız da Gg-12, KTU-60 ile KTU-51'in 6. pasajına kadar bu çalışmalar ile paraleldir. Bu kararsızlık daha çok 6. pasajdan sonra kendini göstermektedir. Ancak, bilinmeyen bir sebepten dolayı KTU-51 izolatının 6. pasajındaki düşüş, 12. pasajda tekrar yükselişe geçmiştir. Ardışık pasajlamanın *Pr1* genine etkisi üzerine literatürde az sayıda araştırma bulunmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda bu genin aktivitesinde yaklaşık ardışık beş kez pasajlandığında önemli derecede düşüş göstermemekle birlikte, 10-15 ardışık pasajları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli derecede düşüşler gözlenmiştir (Safavi 2011). *Pr1* enziminin konidiasyon boyunca salgılandığını, konidial hücre duvarındaki *Pr1* varlığı ıspatlamakla birlikte, genin aktivite düzeyinin de hücredeki transkript miktarı ile doğrudan ilişkili olduğu görülmektedir (Leger vd., 1996). Konidialarda bulunan *Pr1*'in transkriptinin artması, bu enzimin enfeksiyonun erken aşamalarında üretimini hızlandırabilir ve konağa hızlıca nüfuz etmesini sağlayabilir. Bazı araştırmalar gösteriyor ki, *Pr1* enzimi birçok peptidin salgınımına neden olur ve bu durum daha çok *Pr1* yapımını indükler (Paterson vd., 1994). Bu durumda görünüyor ki in-vitro pasajlama *Pr1* geninin hücre duvarındaki transkripsiyonunu düşürerek, konidiaların da böcek kutikulasına tutulumunu yavaşlatmaktadır. Böylece patogenezi ve ölüm yavaşlamakta, istenilen sonuç elde edilememektedir. Çalışma kapsamında bu enzimin pasajlarındaki kararsızlık Gg-12 ve KTU-51 suşlarında görülmekle birlikte, biyopestisit çalışmalarında kullanılması düşünülen KTU-2 suşu, enzim aktivitesi yönünden ardışık 12 pasaja rağmen kararlılığını sürdürmektedir. Bu durumda bu izolat, ürün geliştirme programında oldukça ümit vaat edici görünmektedir.

Biyopestisit yapımına aday suşun pasajlanmadan önce ve pasajlandıktan sonra stabil kaldığını belirlemek için kullanılan bir diğer yöntem esteraz profillerinin belirlenmesidir (Leal-Bertioli vd., 2000). Yapılan son çalışmalar konidialardaki yüksek seviyede *Pr1* ve esteraz aktivitesinin, kutikulayı degrades etmekle sorumlu tüm enzimlerin hızlıca salgınmasına

ve enfeksiyonun başlamasına zemin hazırladığını göstermektedir (Shah vd., 2005; Small ve Bidochka, 2005). Serebrov vd., (2001) yaptıkları bir çalışmada entomopatojen fungus ile enfekte edilmiş *Galleria mellonella* larvalarının kutikula yüzeylerinde oluşan koyu renkli spotların, değişikliğe uğramış non spesifik esterazlarla ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışma sonucunda esterazların virulans için *Pr1* kadar önemli olduğu görülmektedir. Daha önce literatürde ardışık pasajlamanın esteraz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak genin aktivitesi ile ilgili Serebrov vd., (2006) *Galleria mellonella* larvalarının yağ ve intestinal dokularındaki, *Metarhizium anisopliae* konidialarına ait esteraz aktivitelerini test etmişler ve aktivitede herhangi bir düşüş gözlemlenmemişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada *Phaedon cochleariae*, iki farklı *Metarhizium* türü (V245, V208) ile hem ayrı ayrı hem de birlikte enfekte edilmiş ve enfeksiyondan sonraki esteraz bant profilleri arasında farklılık olup olmadığı incelenmiştir. NATİVE-PAGE görüntülerinde ayrı ayrı yapılan enfeksiyon sonrasında herhangi bir farklılık görünmemekle birlikte, iki suşun eş zamanlı enfeksiyonu sonucunda iki farklı bant elde edilmiştir (Leal-Bertioli vd., 2000). Bu durum aynı türün enfeksiyon sonrasında esteraz aktivitesinde herhangi bir değişikliğin olmadığını göstergesidir. Yapılan tez çalışmasında biyopestisit olarak üretilmesi düşünülen izolatlarda önce *Galleria mellonella* larvaları ile enfekte edilerek restorasyonu sağlandı ve ardışık 12 tur pasajlanarak seçilen 4 izolata ait 1., 6. ve 12. pasajların esteraz profilleri incelendi. Yukarıdaki çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda KTU-2 izolatu 3 pasajda da benzer bant profili gösterdiğinden (Şekil 23), enzim aktivitesi oldukça kararlı görünmektedir. Yapılan diğer tüm testlerde de bu izolat için pozitif sonuçlar elde edildiği düşünüldüğünde biyopestisit çalışmalarında kullanılması kaçınılmazdır.

Tez kapsamında kaliteli bir biyopestisit üretimi gerçekleştirebilmek için yapılan farklı deneylerin sonuçları değerlendirilerek stabil suş seçimi yapıldı. Morfolojik ve moleküler çalışmaların sonuçları incelendiğinde KTU-2 ve KTU-60 suşlarının diğerlerine oranla daha kararlı oldukları sonucuna varıldı. Kararlı suş seçiminin ardından bu suşun, üzerinde büyütülerek biyopestisit haline getirileceği substratın belirlenmesi ikinci aşamadır. Bunun için fungusun besinsel gereksinimleri, nem içeriği, uygun pH aralığı, büyüme ve sporlanmaya teşvik edici bir substratın seçimi önemlidir (Hallsworth ve Magan, 1996). Funguslar filamentli yapılarından dolayı katı substratlar üzerinde kolaylıkla büyümeye yatkın olup, böylelikle hücre dışı enzimlerini ve konidiaforlarını daha geniş alanlara

ulaştırabileceklerinden ‘katı fazlı fermantasyon yöntemi’ büyüme aşamasında oldukça verimlidir. (Lee vd., 2003; Arzumanov vd., 2005; Guijarro vd., 2007; Verma vd., 2007). Biyopestisit üretiminde katı fazlı fermantasyon yönteminin kullanılması ucuz ve az malzeme kullanımı ile substrat olarak atık endüstriyel tarımsal tahılların kullanımını avantajını sağlamaktadır (Castilho vd., 2000). Prakash vd., (2008) yaptıkları bir çalışmada nem içeriğinin katı fazlı fermantasyonda önemli rol oynadığını vurgulamışlardır. Bu çalışmada araştırmacılar farklı tahıllar kullanmışlar, ancak optimum nem içeriğinin pirincin bulunduğu deney kaplarında olduğunu kaydetmişlerdir. Yeast extract misellerin büyümesi için katı substratın ihtiva etmesi gereken bir içerik olduğu daha önce yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Im vd,1988). Yine Prakash vd., (2008)’nin yaptıkları çalışmada üç farklı katı substrat üzerindeki gram başına düşen merkezi konidia büyümeleri incelendiğinde maksimum verimin pirinçten elde edildiği görülmektedir. Ye vd. (2006) *Beauveria bassiana* konidialarını tahıl üzerinde büyüttüklerinde benzer sonuçlar elde etmiş, en verimli büyüme oranını pirinç üzerinde gözlemlemişlerdir. Bu veriler pirincin yeterli miktarda Yeast extract ve besinsel içeriğe sahip olduğunu doğrulamaktadır. Ansari ve Butt (2011) yaptıkları bir çalışmada 3 farklı *Metarhizium* suşunun germinasyon hızını test etmişler ve pirincin fungal büyümede SDA’dan daha etkili olduğunu göstermişlerdir. Tüm bu bilgilerin doğrultusunda KTU-2 ve KTU-60 suşlarının büyütülmesi aşamasında, biyopestisit çalışmalarında katı substrat olarak pirinç kullanılmıştır. Seçilen suşlar bifazik kültür sisteminden sonra, pirinç üzerinde büyütme aşamasında katı fazlı fermentasyon yöntemi ile başarılı bir şekilde biyopestisit haline getirilmiştir. Sonraki aşamalarda ürünün virulans testleri yapıp, ticari preperat haline dönüştürülmesi, Türkiye’deki toprak altı zararlılarının kontrol altına alınması için amaçlanan çalışmalardır.

## 5. SONUÇLAR

“Toprak Altı Zararlılarına Karşı Fungal Suşların Seçimi ve Granül Formülasyonun Üretilmesi” başlıklı bu doktora tezinde, biyopestisit üretiminde en önemli basamaklardan biri olan kararlı suşun seçimi ile ilgili birçok farklı çalışma yapılmış ve deney sonuçlarına göre başlangıçtaki 9 *Metarhizium* izolatı (As-1, As-2, As-18, Gg-12, KTU-21, KTU-60, KTU-2, KTU-40, KTU-51) önce 4’e (KTU-2, Gg-12, KTU-51, KTU-60) daha sonra 2 adete (KTU-2, KTU-60) indirilerek, kalan suşlardan granül formda biyopestisit üretimi gerçekleştirildi. Yapılan çalışmada ulaşılan sonuçlar aşağıdaki gibidir.

1. Toprak altı zararlıları hedef alınarak yapılan bu çalışmada, laboratuvar koleksiyonundan seçilen 9 adet *Metarhizium* suşunun *Melolontha melolontha* larvaları üzerindeki virulansı belirlendi. KTU-2, KTU-60, KTU-51 ve Gg-12 suşlarının en yüksek öldürücü aktiviteye sahip olduğu tespit edildi.

2. İzolatların *Pr1* gen içeriklerinin tespit edildi ve taksonomik pozisyonları belirlendi. Laboratuvar koleksiyonundan seçilen 9 adet *Metarhizium* suşunun da bu geni bulundurduğu görüldü.

3. *Pr1* geni içeren suşların uygun substrat varlığında enzim aktiviteleri ölçüldü. Ölçümler sonucunda *Pr1* geninin tüm izolatlarda aktif olduğu sonucuna varıldı.

4. Yukarıdaki deney sonuçlarına göre ilk eleme yapılarak kalan 4 izolat (KTU-2, KTU-60, KTU-51 ve Gg-12), pasajlamanın fungal tür üzerindeki fenotipik, genotipik ve biyokimyasal etkilerinin belirlenmesi amacıyla 12 kez ardışık pasajlandı.

5. Pasajlara ait kültürlerin fenotipik (koloni morfolojileri, renk değişimi, fertil olmayan alan oluşumu, spor üretimi ve sporların UV’ye karşı dirençliliği) kararlılığı belirlendi. Bu deney basamağında gerek koloni morfolojisi, gerekse spor üretim %’si açısından KTU-2, KTU-60 izolatlarının diğerlerine oranla daha kararlı oldukları belirlendi.

6. Pasajların virulans özelliklerinin kararlılıkları test edildi. *G. mellonella* üzerinde yapılan bu çalışmada yine KTU-2 izolatının virulansında anlamlı bir düşüşe rastlanılmamıştır.

7. Seçilen 4 *Metarhizium* izolatının 12 ardışık pasajlanma sürecinin ardından genotipinin stabil olup olmadığını belirlemek için, izolatlardan DNA izolasyonu yapılarak, RAPD-PCR yöntemi kullanıldı. *Pr1* geninin kararlılığının belirlenmesi için de *Rsa I*, *Hpa II* ve *Dde I* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim deneyi yapıldı. Hem RAPD-PCR,

hem de restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim deneyleri sonucunda seçilen 4 suşun da genotipik anlamda herhangi dejenerasyona uğramadıkları sonucuna varıldı.

8. Pasajlardaki *Pr1* geninin aktivitesinin stabilitesini ölçmek için uygun substrat varlığında enzim-substrat testi deneyi yapıldı. KTU-2 ve KTU-60 izolatlarının diğer izolatlara göre aktivite açısından daha kararlı oldukları görüldü.

9. Suşların pasajlarındaki aktif enzimlerin varlığını tespit etmek amacıyla kültürlerden protein izolasyonu yapılarak, NATIVE-PAGE yöntemi ile jel görüntüleri elde edildi. KTU-2 izolatının aktif enzimlerinin pasajlarında da oldukça kararlı olduğu belirlendi

10. Stabil suşun belirlenmesi amacıyla yapılan deneylerin sonucuna göre KTU-2 ve KTU-60 izolatları en kararlı suşlar olarak seçildi.

11. KTU-2 ve KTU-60 izolatları katı fazlı fermantasyon yöntemi kullanılarak pirinç üzerinde büyütülmesi ile granül formda formülasyon haline getirildi.

12. Entomopatojenik funguslardan kararlı suşun farklı yöntemlerle belirlenerek, biyopestisit haline getirilmesi çalışmaları Türkiye’de ilk defa gerçekleştirildi.

## 6. ÖNERİLER

Ülkemizde zararlı böcekler ile mücadele bazı istisnalar dışında tamamen kimyasal ilaçlar kullanılarak yapılmaktadır. Oysa kullanılan bu kimyasal ilaçlar, zararlı böceklerin bu ilaçlara karşı direnç kazanmalarına, çevredeki faydalı böceklerin, bal arılarının, kuşların ve balıkların ölmelerine, besin zinciri yoluyla insanlara ulaşarak birçok kalıcı ya da öldürücü hastalıklara neden olmaktadır. Son yıllarda araştırmalarına ağırlık verilen biyolojik mücadele ile kimyasal mücadelenin yol açabileceği birçok olumsuz etkiler ortadan kaldırılabilir. Gelişmiş ülkelerin hepsinde biyolojik mücadele ön planda tutulmakta ve bu konu üzerindeki çalışmalar daha ileriye götürülmektedir. Kimyasalların mücadele materyali olarak kullanılmamaları Avrupa Birliğinin önemli gündem maddeleri arasında yer almaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda geliştirilen birçok biyolojik mücadele etmeni (özellikle mikrobiyal mücadele etmenleri) birçok ülkede ticari olarak satılmaktadır.

Bu tez çalışmasıyla hedef, ülkemiz için biyopestisit üretimi ve üretim öncesi aşamalar açısından detaylı çalışma yapılmıştır. Çalışma kapsamında kararlı suş seçimi yüksek düzeyde ele alınarak, kaliteli biyopestisit üretimi amaçlanmıştır. Türkiye’de ilk defa üretilen bu ürünün amaç böceklerle karşı daha ayrıntılı çalışmalarının yapılması kaçınılmazdır. Özellikle Doğu Karadeniz Bölgesi’nin iklimsel koşulları dikkate alındığında bu çalışmada elde edilen bu ürünün araziye yönelik çalışmaların yapılması zorunlu bir husus haline gelmiştir. Bu amaç doğrultusunda, (1) bu biyopestisitin kitle üretimlerinin yapılması, (2) özellikle toprak altı zararlılarına doğal ortamında alan uygulamalarının yapılması ve (3) ticari preparat haline getirilmesi planlanan çalışmalar arasında yer almaktadır. Böylece, zararlı böcekler ile yapılan kimyasal mücadelenin olumsuz etkileri ortadan kalkacak ve ülke ekonomisine önemli ölçüde katkıda bulunulacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

- Abbott, W., S., A., 1925. Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide, J. Econ. Entomol., 18, 265-267.
- Ak, K., Uysal, M. ve Tuncer C., 2005. Bark Beetle (Coleoptera: Scolytidae) Species which are Harmful in Hazelnut Orchards, their Short Biology and Densities in Giresun, Ordu and Samsun Provinces of Turkey, J. Fac. Agric., 20, 37-44.
- Al-Aidroos, K. ve Seifert, A., M., 1980. Polysaccharide and Protein Degradation, Germination, and Virulence against Mosquitoes in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*, Journal of Invertebrate Pathology, 36, 29–34.
- AliNiasee, M., T., 1998. Ecology and Management of Hazelnut Pests, Annu. Rev. Entomol., 43, 395-419.
- Ansari, M., A., Shah, F., A., Whittaker, M., Prasad, M. ve Butt, T., M., 2007. Control of western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*) pupae with *Metarhizium anisopliae* in peat and peat alternative growing media, Biol. Control, 40, 293–297.
- Ansari, M., A., Brownbridge, M., Shah, F., A. ve Butt, T., M., 2008. Efficacy of entomopathogenic fungi against soil-dwelling life stages of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) in plant growing media, Entomol. Exp. Appl., 127, 80–87.
- Ansari, M., A., Evans, M. ve Butt, T., M., 2009. Identification of pathogenic strains of entomopathogenic nematodes and fungi for wireworm control, Crop. Prot., 28, 269–272.
- Ansari, M., A. ve Butt T., M., 2011. Effects of successive subculturing on stability, virulence, conidial yield, germination and shelf-life of entomopathogenic fungi, Journal of Applied Microbiology, 110, 1460-1469.
- Arzumanov, T., Jenkins, N. ve Roussos, S., 2005. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, Process Biochemistry, 40, 1037–1042.
- Becker, T., C., A., Chiuchetta, S., J., R., Baptista, F. ve de Castro-Prado, M., A., A., 2003. Increase in mitotic recombination in diploid cells of *Aspergillus nidulans* in response to ethidium bromide, Genet. Mol. Biol., 26, 381–385.
- Bidochka, M., J., Kamp, A., M., Lavender, T., M., Dekoning, J. ve De Croos, J., N., A., 2001. Habitat Association in Two Genetic Groups of the Insect- Pathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*: Uncovering Cryptic Species?, Appl. Environ. Microbiol., 67, 1335-1342.
- Boland, G. ve Bolis, L., 1998. Plant-microbe interactions and biological control, CRC Press, New York.
- Bradford, M., M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding, Annals of Biochemistry, 72, 248–254.



- Brownbridge, M., Costa, S. ve Jaronski, S., T., 2001. Effects of in vitro passage of *Beauveria bassiana* on virulence of *Bemisia argentifolii*, J. Invertebr. Pathol., 77, 280 – 283.
- Burges, H., D., 1981. Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980, London: Academic Press.
- Butt, T., M., Jackson, C. ve Magan, N., 2001. Fungi as biocontrol agents: progress problems and potential, CABI.
- Butt, T., M., 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.
- Castilho, L., R., Polato, C., M., S., Baruque, E., A., Sant Anna Jr., J., L., Freire, D., M., G., 2000. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations, Biochemical Engineering Journal, 4, 239–247.
- Castrillo, L., A., Roberts, D., W. ve Vandenberg, J., D., 2005. The Fungal Past, Present, and Future: Germination, Ramification, and Reproduction, J. Invertebr. Pathol., 89, 46-56.
- Charnley, A. K. ve Leger, R., J., St., 1991. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*, 267-286, Springer US.
- Charudattan, R., 2001. Biological control of weeds by means of plant pathogens: significance for integrated weed management in modern agro-ecology, BioControl, 46, 229–260.
- 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.
- Chu, Y., M., Jeon, J., J., Yea, S., J., Kim, Y., H., Yun, S., H., Lee, Y., W. ve Kim, K., H., 2002. Double-stranded RNA Mycovirus from *Fusarium graminearum*, Appl. Environ. Microbiol., 68, 2529–2534.
- Cobb, B., D. ve Clarkson, J., M., 1993. Detection of molecular variation in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* using RAPD-PCR, FEMS Microbiology Letters, 112, 319-324.
- Cohen, E. ve Tammar, J., 2009. Photostabilization of *Beauveria bassiana* conidia using anionic dyes, Appl. Clay Sci., 42, 569–574.
- Cross, J., V., Solomon, M., G., Chandler, D., Jarret, P., Richardson, P., N., Winstanley, D., Balton, H., Huber, J., Keller, B., Langenruch, G., A. ve Zimmermann, G., 1999. Biocontrol of Pests of Apples and Pears in Northern and Central Europe: 1. Microbial Agents and Nematodes, Biocont. Sci. Technol., 9, 125-149.
- Clarkson, J., M. ve Chamley, A., K., 1996. New Insights into the Mechanisms of Fungal Pathogenesis in Insects, Trends Microbiol., 4, 197-203.
- Çakıcı, F. Ö., Sevim, A., Demirbağ, Z. ve Demir, I., 2014. Investigating internal bacteria of *Spodoptera littoralis* (Boisd.)(Lepidoptera: Noctuidae) larvae and some *Bacillus* strains as biocontrol agents, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 38, 99-110.

- da Silva, W., B., Santi, L., Correa, A., P., F., Silva, L., A., D., Bresciani, F., R., Schrank, A. ve Vainstein, M., H., 2010. The entomopathogen *Metarhizium anisopliae* can modulate the secretion of lipolytic enzymes in response to different substrates including components of arthropod cuticle, Fungal Biology, 114, 911-916.
- Danısmazoglu, M., Demir, I., Sevim, A., Demirbag, Z. ve Nalcacıoğlu, R., 2012. Highly pathogenic bacteria for the control of *Agriotes* sp.(Coleoptera: Elateridae). Crop Protection, 40, 1-7.
- DeBach, P., 1974. Biological Control by Naturel Enemies. Cambridge University Prass, Cambridge, UK.
- Demir, I., Sezen, K. ve Demirbag, Z., 2002. The first study on bacterial flora and biological control agent of *Anoplus roboris* (Sufur., Coleoptera), The Journal of Microbiology, 40, 104-108.
- Demir, İ., 2004. *Hyphantria cunea* nükleopolihedrovirus'ünün *Spodoptera frugiperda* ve *Lymantria dispar* hücre kültürlerinde replikasyonunun karşılaştırılması, Doktora tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Demir, I. ve Demirbag, Z., 2006. A productive replication of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus in *Lymantria dispar* cell line, Journal of Microbiology and Biotechnology, 16, 1485-1490.
- Demir, I., Gürel, N., Nalçacıoğlu, R. ve Demirbağ, Z., 2009a. Comparative susceptibilities of six insect cell lines to infection by *Malacosoma neustria* nucleopolyhedrovirus (ManeNPV), Turkish Journal of Biology, 33, 4, 259-273.
- Demir, I., Gürel, N., Nalçacıoğlu, R., İnce, İ. A. ve Demirbağ, Z., 2009b. Productive replication of *Malacosoma neustria* nucleopolyhedrovirus (ManeNPV) in Md203 cell line, Turkish Journal of Biology, 33, 3, 239-248.
- Demir, I., Eryüzlü, E. ve Demirbağ, Z., 2012. A study on the characterization and pathogenicity of bacteria from *Lymantria dispar* L.(Lepidoptera: Lymantriidae), Turkish Journal of Biology, 36, 4, 459-468.
- Demir, I., Nalçacıoğlu, R., Gholizad, L. M. ve Demirbağ, Z., 2013. Characterization of a new isolate of *Malacosoma neustria* nucleopolyhedrovirus (ManeNPV) from Turkey, Turkish Journal of Biology, 37, 4, 385-391.
- Demir, I., Kocacevik, S., Sonmez, E., Demirbag, Z. ve Sevim, A., 2013. Virulance of entomopathogenic fungi against *Plagioderia versicolora* (Laicharting, 1781) (Coleoptera: Chrysomelidae), Arf. J. Agric. Res., 8, 2016-2021.
- Demir, I., Nalçacıoğlu, R., Gholizad, L. M. ve Demirbağ, Z., 2014. A highly effective nucleopolyhedrovirus against *Malacosoma* spp.(Lepidoptera: Lasiocampidae) from Turkey: isolation, characterization, phylogeny, and virulence, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 38, 4, 462-470.
- Demirbağ, Z., 2008. Entomopatojenler ve Biyolojik Mücadele, Esen Ofset Matbaacılık, Trabzon.

- Demirci, M., Sevim, E., Demir, İ. ve Sevim, A., 2013. Culturable bacterial microbiota of *Plagioderma versicolora* (L.)(Coleoptera: Chrysomelidae) and virulence of the isolated strains, Folia microbiologica, 58, 3, 201-210.
- Ecevit, O., 1988. Zirai Mücadele İlaçları ve Çevreye Olan Etkileri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları, Samsun.
- Eilenberg, J., Hajek, A. ve Lomer, C., 2001. Suggestions for Unifying the Terminology in Biological Control, Biocontrol, 46, 387-400.
- Erbaş, Z., Gökçe, C., Hazir, S., Demirbağ, Z., ve Demir, I., 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, 2, 187-197.
- Eski, A., Çakıcı, F. Ö., Güllü, M., Muratoğlu, H., Demirbağ, Z. ve Demir, I., 2015. Identification and pathogenicity of bacteria in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* Lefebvre (Lepidoptera: Noctuidae), Turkish Journal of Biology, 39, 1, 31-48.
- Fargues, J., 1984. Adhesion of the fungal spore to the insect cuticle in relation to pathogenicity, New York.
- Faria, M. ve Wraight, S., P., 2001. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi, Crop Prot., 20, 767-778.
- Faria, M., R. ve Wraight, S., P., 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types, Biol. Control, 43, 237-256.
- Ferron, P., 1978. Biological Control of Insects by Entomogenous Fungi, Annu. Rev. Entomol., 23, 409-42.
- Fravel, D., R., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol, Ann. Rev. Phytopathol., 43, 337-359.
- Fuxa, J., R., 1987. Ecological Considerations for the Use of Entomopathogens in IPM, Annu. Rev. Entomol., 32, 225-51.
- Gillespie, J., P., Bateman, R., ve Charnley, A., K., 1998. Role of Cuticle-Degrading Proteases in the Virulence of *Metarhizium* spp. for the Desert Locust, *Schistocerca gregaria*, Journal of Invertebrate Pathology, 71, 2, 128-137.
- Gaugler, R., 1997. Alternative Paradigms for Commercializing Biopesticides, Phytoparasitica, 25, 179-182.
- Georgis, R., 1997. Commercial prospects of microbial insecticides in agriculture, BCPC Symposium Proceedings, 68, 243-252.
- Goettel, M., S., St. Leger, R., J., Rizzo, N., W., Staples, R., C. ve Roberts, D., W., 1989. Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle, Microbiology, 135, 2233-2239.

- Goettel, M., S., Eilenberg, J. ve Glare, T., 2005. Entomopathogenic Fungi and Their Role in Regulation of Insect Populations. In: *Comprehensive Molecular Insect Science*, Gilbert, L., I., Iatrou, K. ve Gill, S., 361-405, Amsterdam.
- Gokce, C., Sevim, A., Demirbag, Z. ve Demir, I., 2010. Isolation, characterization and pathogenicity of bacteria from *Rhynchites bacchus* (Coleoptera: Rhynchitidae). *Biocontrol Science and Technology*, 20, 9, 973-982.
- Gokce, C., Yilmaz, H., Erbas, Z., Demirbag, Z. ve Demir, I., 2013. First record of *Steinernema kraussei* (Rhabditida: Steinernematidae) from Turkey and its virulence against *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae), *Journal of Nematology*, 45, 4, 253.
- Gökçe, C., Erbaş, Z., Yılmaz, H., Demirbağ, Z. ve Demir, I., 2015. A new entomopathogenic nematode species from Turkey, *Steinernema websteri* (Rhabditida: Steinernematidae), and its virulence, *Turkish Journal of Biology*, 39, 1, 167-174.
- Guijarro, B., Melgarejo, P. ve Cal, A., D., 2007. Effect of stabilizers on the shelf-life of *Penicillium frequentans* conidia and their efficacy as a biological agent against peach brown rot, *International Journal of Food Microbiology*, 113, 117-124.
- Gulsar Banu, J., Subahasan, K. ve Iyer, R., 2004. Occurrence and Distribution of Entomopathogenic Nematodes in White Grub Endemic Areas of Kerala, *J. Plant Crops*, 32, 333-334.
- Hall, R., A., 1980. Effect of repeated subculturing on agar and passaging through an insect host on pathogenicity, morphology, and growth rate of *Verticillium lecanii*, *J. Invertebrate Pathology*, 36, 216-222.
- Hall, R., A. ve Papierok, B., 1982. Fungi as Biological Control Agents of Arthropods of Agricultural and Medical Importance, *Parasitology*, 84, 205-240.
- Hall, T., A., 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symp.*, 41, 95-98.
- Hallsworth, J., E. ve Magan, N., 1996. Culture, age, temperature and pH effect the polyol and trehalose contents of fungal propagules, *Applied Environmental Microbiology*, 62, 2435-2447.
- Hajek, A., E., Humber, R., A., Elkinton, J., S., May, B., Walsh, S., R., A. ve Silver, J., C., 1990. Allozyme and Restriction Fragment Length Polymorphism Analyses Confirm *Entomophaga maimaiga* Responsible for 1989 Epizootics in North American Gypsy Moth Populations, *Proc. Nati. Acad Sci.*, 87, 6979-6982.
- Hajek, A., E. ve St Leger, R., J., 1994. Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts, *Annu. Rev. Entomol.*, 39, 293-322.
- Hajek, A., E., 1997. Ecology of Terrestrial Fungal Entomopathogens, In "Advanced in Microbial Ecology" (Jones, J. H., Ed.), 15, 193-249, Plenum Press, New York.
- Hajek, A., E. ve Webb, R., E., 1999. Inoculative Augmentation of the Fungal Entomopathogen *Entomophaga maimaiga* as a Homeowner Tactic to Control Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae), *Biol. Cont.*, 14, 11-18.

- Hoffman, M., P. ve Frodsham, A., C., 1993. Naturel Enemies of Vegetable Insect Pests, Cooperative Extension, Cornell University, Ithaca.
- Hutwimmer, S., Wagner, S., Affenzeller, M., Burgstaller, W. ve Strasser, H., 2008. Algorithm-based design of synthetic growth media stimulating virulence properties of *Metarhizium anisopliae* conidia, J. Appl. Microbiol., 105, 2026–2034.
- Ibrahim, L., Butt, T., M. ve Jenkinson, P., 2002. Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*, Mycol. Res., 106, 705-715.
- Ignoffo, C., M., McIntosh, A., H., Garcia, C., Kroha, M. ve Johnson, J., M., 1992. Effective of successive in vitro and in vivo passages on the virulence of the Entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, Entomophaga, 27, 371-378.
- Ignoffo, C., M., Hostetter, D., L., Sikorowski, P., P., Sutter, G. ve Brooks, W., M., 1997. Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus, and protozoan by an ultraviolet light source, Environmental Entomology, 6, 411-415.
- Im, D., J., Aguda, R., M. ve Rombach, M., C., 1988. Effects of nutrients and pH on the growth and sporulation of four entomogenous hyphomycetes fungi (Deuteromycotina), Korean Journal of Applied Entomology, 27, 41–46.
- Ince, I. A., Demir, İ., Demirbağ, Z. ve Nalcacıoğlu, R., 2007. A cytoplasmic polyhedrosis virus isolated from the pine processionary caterpillar, *Thaumetopoea pityocampa*, J. Microbiol. Biotechnol., 17, 632-637.
- Ince, I. A., Katı, H., Yılmaz, H., Demir, I. ve Demirbağ, Z., 2008. Isolation and identification of bacteria from *Thaumetopoea pityocampa* Den. and Schiff. (Lep., Thaumetopoeidae) and determination of their biocontrol potential, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24, 12, 3005-3015.
- Jackson, T., A., Alves, S., B. ve Pereira, R., M., 2000. Success in Biological Control of Soil-Dwelling Insects by Pathogens and Nematodes. In: Biological Control: Measures of success, Gurr, G., Wratten, S. (Ed.), London, 271–296.
- Jaronski, S., T., 1997. New paradigms in formulating mycoinsecticides, ASTM Special Technical Publication, 1328, 99-114.
- Katı, H., İnce, İ. A., Demir, İ. ve Demirbağ, Z., 2010. Brevibacterium pityocampae sp. nov., isolated from caterpillars of *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera, Thaumetopoeidae). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60, 2, 312-316.
- Kaya, H., K. ve Stock, S., P., 1997. Techniques in insect nematology. Manual of Techniques in Insect Pathology, 1, 281-324.
- Kawakami, K., 1960. On the change of characteristics of the silkworm muscardines through successive cultures, Bulletin Sericultural Experiment Station, Japan, 16, 83-99.
- Keller, S. ve Zimmermann, G., 1989. Mycopathogens of soil insects, Insect-fungus interactions, 239-270, Academic Press, San Diego.

- Keller, S., Schweizer, C., Keller, E. ve Brenner, H., 1997. Control of White Grubs (*Melolontha melolontha* L.) by Treating Adults with the Fungus *Beauveria brongniartii*, Biocont. Sci. Technol., 7, 105-116.
- Keller, S., Kessler, P. ve Schweizer, C., 2003. Distribution of Insect Pathogenic Fungi in Switzerland with Special Reference to *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*, Biol. Cont., 48, 307-319.
- Khan, S., Guo, L., Maimaiti, Y., Mijit, M. ve Qiu, D., 2012. Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent, Molecular Plant Breeding, 3,1.
- Kocacevik, S., Sevim, A., Eroglu, M., Demirbag, Z. ve Demir, I., 2015. Molecular characterization, virulence and horizontal transmission of *Beauveria pseudobassiana* from *Dendroctonus micans* (Kug.) (Coleoptera: Curculionidae), J. Appl. Entomol., 139, 381-389.
- Kocacevik, S., Sevim, A., Eroglu, M., Demirbag, Z. ve Demir, I., 2016. Virulence and horizontal transmission of *Beauveria pseudobassiana* S.A. Rehner & Humber on *Ips sexdentatus* and *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae), Turk. J. Agric. For., 40, 241-248.
- Koul, O. ve Dhaliwal, G., S., 2002. Microbial Biopesticides: an Introduction. Taylor & Francis. London and New York.
- 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.
- Lacey, L., A. ve Kaya, H. K. (Eds.), 2000. Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evolution of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests, Kluwer Academic, Dordrecht.
- Lacey, L., A., Frutos, R., Kaya, H., K. ve Vail, P., 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future?, Biol. Control., 21, 230-248.
- Lacey, L., A. ve Shapiro-Ilan, D., I., 2008. Microbial control of insect pests in temperate orchard systems: potential for incorporation into IPM, Ann. Rev. Entomol., 53, 121-144.
- Latch, G., C., M., 1965. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin Strains in New Zealand and Their Possible Use for Controlling Pasture Inhabiting Insects, New Zealand Journal of Agricultural Research, 8, 384-396.
- Lee, H., Song, M. ve Hwang, S., 2003. Optimizing bioconversion of deproteinated cheese whey to mycelia of *Ganoderma lucidum*, Process Biochemistry, 38, 1685-1693.
- Leal, S., C., M., Bertioli, D., J., Butt, T., M. ve Peberdy, J., F., 1994. Characterization of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* by RAPD-PCR. Mycological Research, 98, 1077-1081.
- Leal, S., C., M., Bertioli, D., J., Butt, T., M., Carder, J., H., Burrows, P., R. ve Peberdy, J., F., 1997. Amplification and restriction endonuclease digestion of the *Pr1* gene for the detection and characterization of *Metarhizium* strains, Mycol. Res., 101, 257-265.

- Leal-Bertioli, S., C., M., Butt, T., M., Peberdy, J., F. ve Bertioli, D., J., 2000. Genetic exchange in *Metarhizium anisopliae* strains coinfecting *Phaedon cochleariae* is revealed by molecular markers, Mycol. Res., 104, 409–414.
- Leland, J., E., 2001. Environmental-Stress Tolerant Formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* for Control of African Desert Locust (*Schistocerca gregaria*), Doktora Tezi, Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia.
- Lipa, J., J., 1975. An Outline of Insect Pathology, Translated from Polish and published for the US Department of Agriculture and the National Science Foundation, Washington DC by the Foreign Scientific Publications Department of the National Center for Scientific, Technical and Economic Information, 269, Warsaw, Poland.
- Liu, J., Poinar Jr, G., O. ve Berry, R., E., 2000. Control of insect pests with entomopathogenic nematodes: the impact of molecular biology and phylogenetic reconstruction, Annual Review of Entomology, 45, 287-306.
- Lomer, C., J., Bateman, R., P., Johnson, D., L., Langewald, J. ve Thomas, M., 2001. Biological Control of Locusts and Grasshoppers, Annu. Rev. Entomol., 46, 667-702.
- Lösch, A., Hutwimmer, S. ve Strasser, H., 2010. Carbon utilization pattern as a potential quality control criterion for virulence of *Beauveria brongniartii*, J. Invertebr. Pathol., 104, 58–65.
- Machado, A., C., R., Monteiro, A., C., Almeida, A., M., B., D. ve Martins, M., I., E., G., 2010. Production technology for entomopathogenic fungus using a biphasic culture system, Pesquisa Agropecuária Brasileira, 45, 10, 1157-1163.
- Maddox, J., V., 1987. Protozoan Diseases, In “Epizootiology of Insect Diseases” (Fuxa, J., R. ve Tanada, Y., Eds.), 417-452, Wiley, New York.
- Meyling, N., V. ve Eilenberg, J., 2006. Occurrence and Distribution of Soil Borne Entomopathogenic Fungi within a Single Organic Agroecosystem, Agric. Ecosys. Environ., 113, 336-341.
- Montesinos, E., 2003. Development, Registration and Commercialization of Microbial Pesticides for Plant Protection, Int. Microbiol., 6, 245-252.
- Morrow, B., J. ve Boucias, D., G., 1988. Comparative analysis of the in vitro growth of the hyphal body and mycelial stage of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. Journal of Invertebrate Pathology, 51, 197-206.
- Morrow, B., J., Boucias, D., G. ve Heath, M., A., 1989. Loss of virulence in an isolate of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi* after serial in vitro passage, J. Econ. Entomol., 82, 404–407.
- Milner, R., J., 2000. Current Status of *Metarhizium* as a Mycoinsecticide in Australia, Biocont. News Info., 21, 47-50.
- Muro, M., A., Elliott, S., Moore, D., Parker, B., L., Skinner, M., Reid, W. ve Boussini, M., E., 2005. Molecular Characterization of *Beauveria bassiana* Isolates Obtained from

- Overwintering Sites of Sunn Pests (*Eurygaster* and *Aelia* species), Mycol. Res., 109, 294-306.
- Nagaich, B., B., 1973. *Verticillium* species pathogenic on aphids. Indian Pathol., 26, 163-165.
- Oğurlu, İ., 2000. Biyolojik Mücadele, Süleyman Demirel Üniversitesi, Yayın No: 8, Isparta.
- Ozgen, A., Sezen, K., Demir, I., Demirbag, Z. ve Nalcacioglu, R., 2013. Molecular characterization of chitinase genes from a local isolate of *Serratia marcescens* and their contribution to the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains, Current Microbiology, 67, 4, 499-504.
- Ozsahin, E., Sezen, K., Demir, I. ve Demirbag, Z., 2014. Bacterial isolates from *Palomena prasina* (Hemiptera: Pentatomidae) include potential microbial control agents, Biocontrol Science and Technology, 24, 9, 1039-1051.
- Özman-Sullivan, S., K., 2006. Harmful Mites and Their Economic Importance in Hazelnut Orchards, J. Fac. Agric., 21, 261-264.
- Paterson, I., C., Charnley, A., K., Cooper, R., M. ve Clarkson, J., M., 1994. Specific Induction of a Cuticle-degrading Protease of the Insect Pathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*, Microbiology, 140, 185-189.
- Pell, J., K., Eilenberg, J., Hajek, A., E. ve Steinkraus, D., C., 2001. Biology, ecology and pest management potential of Entomophthorales. Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential, 71-153, CAB International, Wallingford.
- Perinotto, W., M., S., Angelo, I., C., Golo, P., S., Camargo, M., G., Quinelato, S., Santi, L., ve Bittencourt, V., R., E., P., 2014. *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Moniliaceae) *Pr1* activity: biochemical marker of fungal virulence in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae), Biocontrol Science and Technology, 24, 2, 123-132.
- Peter, G., 1984. Plant Pests and Their Control, Fenemore, Butterworth-Heinemann, London.
- Poinar, G. O., 1978. Identification of the Groups of Insect Pathogens, Plenum Press, New York.
- Poinar, G., O., 1979. Nematodes for Biological Control of Insects, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Poinar, G., O., 1990. Taxonomy and Biology of *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*, In "Entomopathogenic Nematodes in Biological Control" (Gaugler, R. ve Kaya, H. K., Eds.), 23-61, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Prakash, G., B., Padmaja, V. ve Kiran, R., S., 2008. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation, Bioresource Technology, 99, 6, 1530-1537.
- Quesada-Moraga, E. ve Vey, A., 2003. Intra-specific Variation in Virulence and In Vitro Production of Macromolecular Toxins Active Against Locust among *Beauveria bassiana* Strains and Effects of In Vivo and In Vitro Passage on These Factors, Biocont. Sci. Technol., 13, 323-340.



- Rath, A., C., 2000. The Use of Entomopathogenic Fungi for Control of Termites, Biocont. Sci. Technol., 10, 563- 581.
- Roberts, D., W., 1989. Word Picture of Biological Control of Insects by Fungi, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 84, 89-100.
- Roy, H., E., Steinkraus, D., C., Eilenberg, J., Hajek, A., E. ve Pell, J., K., 2006. Bizarre Interactions and Endgames: Entomopathogenic Fungi and Their Arthropod Hosts, Annu. Rev. Entomol., 51, 331-57.
- Ryan, M., J., Bridge, P., D., Smith, D. ve Jeffries, P., 2002. Phenotypic degeneration occurs during sector formation in *Metarhizium anisopliae*, J. App. Microbiol., 93, 163-168.
- Safavi, S., A., 2001. Successive subculturing alters spore-bound *Pr1* activity, germination and virulence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, Biocontrol Science and Technology, 21, 8, 883-891.
- Scholte, E., J., Knol, B., G., J., Samson, R., A. ve Takken, W., 2004. Entomopathogenic Fungi for Mosquito Control, J. Insect Sci., 4, 1,19.
- Secil, E., Sevim, A., Demirbag, Z. ve Demir, I., 2012. Isolation, characterization and virulence of bacteria from *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae), Biologia, 67, 4, 767-776.
- Segers, R., Butt, T., M., Keen, J., N., Kerry, B., R., ve Peberdy, J., F., 1995. The subtilisins of the invertebrate mycopathogens *Verticillium chlamyosporium* and *Metarhizium anisopliae* are serologically and functionally related, FEMS Microbiology Letters, 126, 3, 227-231.
- Sevim, A., Demir, I. ve Demirbag, Z., 2010a. Molecular characterization and virulence of *Beauveria* spp. from the pine processionary moth, *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera: Thaumetopoeidae), Mycopathologia, 170, 269-277.
- Sevim, A., Demir, I., Tanyeli, E. ve Demirbag, Z., 2010b. Screening of entomopathogenic fungi against the European Spruce Bark Beetle, *Dendroctonus micans* (Coleoptera: Scolytidae), Biocontrol Sci. Techn., 20, 1, 3-11.
- Sevim, A., 2010. Doğu Karadeniz Bölgesi'nden Entomopatojenik Fungusların İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Virulanslarının Belirlenmesi, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Sevim, A., Gökçe, C., Erbaş, Z. ve Özkan, F., 2012. Bacteria from *Ips sexdentatus* (Coleoptera: Curculionidae) and their biocontrol potential, Journal of Basic Microbiology, 52, 6, 695-704.
- Sevim, A., Demir, I., Sonmez, E., Kocacevik, S. ve Demirbag, Z., 2013. Evaluation of entomopathogenic fungi against the Sycamore lace bug, *Corythucha ciliata* (Say) (Hemiptera: Tingidae), Turk. J. Agric. For., 37, 595-603.
- Sevim, A., Sevim, E. Demir, I. ve Demirbag, Z., 2014. Rhynchites bacchus L. (Coleoptera: Rhynchitidae)'den izole edilen Beauveria bassiana'nın moleküler karakterizasyonu ve patolojisi, Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi, 3, 2, 33-47.

- Sezen, K., Coleoptera Takımına Ait Bazı Fındık Zararlılarında Virüs Tespiti ve Biyolojik Mücadelede Kullanım Potansiyeli, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2004.
- Sezen, K., Demir, I. ve Demirbag, Z., 2004. Study of the bacterial flora as a biological control agent of *Agelastica alni* L.(Coleoptera: Chrysomelidae). Biologia-Bratislava, 59, 3, 327-332.
- Sezen, K., Demir, I., Kati, H. ve Demirbag, Z., 2005. Investigations on bacteria as a potential biological control agent of summer chafer, *Amphimallon solstitiale* L.(Coleoptera: Scarabaeidae), (Seoul, Korea) Journal of Microbiology, 43, 5, 463-468.
- Sezen, K. ve Demirbağ, Z., 2007. Adi Mayıs Böceği (*Melolontha melolontha*, Coleoptera: Scarabaeidae)'nin Biyolojik Kontrol Ajanının Araştırılması, Ekoloji, 16, 34-40.
- Shah, P., A. ve Pell, J., K., 2003. Entomopathogenic Fungi as Biological Control Agents, Appl. Microbiol. Biotechnol., 61, 413-423.
- Shah, F., A. ve Butt, T., M., 2005. Influence of nutrition on the production and physiology of sectors produced by the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, FEMS Microbiol. Lett., 250, 201–207.
- Shah, F., A., Wang, C., S. ve Butt, T., M., 2005. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, FEMS Microbiology Letters, 251, 259-266.
- Shah, F., A., Allen, N., Wright, C., J. ve Butt, T., M., 2007. Repeated in-vitro subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*, FEMS Microbiol. Lett., 276, 60–66.
- Small, C., N. ve Bidochka, M., J., 2005. Up-regulation of *Pr1*, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*, Mycol. Res., 109, 307–313.
- Serebrov, V., V., Alekseev, A., A. ve Glupov, V., V., 2001. Changes in Activity and Pattern of Hemolymph Esterases in Larvae of Wax Moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) during Mycosis, Izv. Akad. Nauk, Ser. Biol., 28, 5, 588–592.
- Serebrov, V., V., Gerber, O., N., Malyarchuk, A., A., Martemyanov, V., V., Alekseev, A., A. ve Glupov, V., V., 2006. Effect of entomopathogenic fungi on detoxification enzyme activity in greater wax moth *Galleria mellonella* L.(Lepidoptera, Pyralidae) and role of detoxification enzymes in development of insect resistance to entomopathogenic fungi, Biology Bulletin, 33, 6, 581-586.
- Sönmez, E., Sevim, A., Demirbağ, Z. ve Demir, İ., 2016. Isolation, characterization and virulence of entomopathogenic fungi from *Gryllotalpa gryllotalpa* (Orthoptera: Gryllotalpidae), Applied Entomology and Zoology, 1-11.
- Sönmez, E., Demirbag, Z. ve Demir, I. (In Press). Pathogenicity of selected entomopathogenic fungal isolates against the oak lace bug, *Corythucha arcuata* Say. (Hemiptera: Tingidae), under controlled conditions, Turk. J. Agric. For., DOI: 10.3906/tar-1412-10.

- Leger, R., J., S., Charnley, A., K. ve Cooper, R., M., 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle, J. Invertebr. Pathol., 48, 85–95.
- Leger, R., J., S., Charnley, A., K. ve Cooper, R., M., 1987. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*, Arch. Biochem. Biophys., 253, 221–232.
- Leger, R. J., S., Durrands, P., K., Charnley, A., K. ve Cooper, R., M., 1988. Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*, Journal of Invertebrate Pathology, 52, 2, 285-293.
- Leger, R., J., S., Butt, T., M., Staples, R., C. ve Roberts, D., W., 1989. Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, Experimental Mycology, 13, 3, 253-262.
- Leger, R., J., S., Frank, D., C., Roberts, D., W. ve Staples, R., C., 1992. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, European Journal of Biochemistry, 204, 3, 991-1001.
- Leger, R., J., S., Bidochka, M., J. ve Roberts, D., W., 1994. Isoforms of the cuticle-degrading *Pr1* proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*, Arch. Biochem. Biophys., 313,1–7.
- Lösch, A., Hutwimmer, S. ve Strasser, H., 2010. Carbon utilization pattern as a potential quality control criterion for virulence of *Beauveria brongniartii*, J. Invertebr. Pathol., 104, 58–65.
- Samsinakova, A. ve Kalalova, S., 1983. The Influence of a Single Spore Isolate and Repeated Subculturing on the Pathogenicity of Conidia of the Entomophagous Fungus *Beauveria bassiana*, Journal of Invertebrate Pathology, 42, 156–161.
- Shah, F., A., Wang, C., S. ve Butt, T., M., 2005. Nutrition Influences Growth and Virulence of the Insect Pathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*, FEMS Microbiology Letters, 251, 259–266.
- Steinhaus, E., A., 1956. Microbial Control: The Emergence of an Idea, J. Agric. Sci., 26, 107-160.
- Strasser, H., Vey, A. ve Butt, T., M., 2000. Are There any Risks in Using Entomopathogenic Fungi for Pest Control, with Particular Reference to the Bioactive Metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species?, Biocont. Sci. Technol., 10, 717-735.
- Takatsuka, J., 2007. Characterization of *Beauveria bassiana* Isolates from Japan Using Intersimple-Sequence Repeat-Anchored Polymerase Chain Reaction (ISSR-PCR) Amplification, Appl. Entomol. Zool., 42, 563-571.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. ve Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, Molecular Biology and Evolution, 28, 10, 2731-2739.

- Tanada, Y. ve Kaya, H. K., 1993. *Insect Pathology*, Academic Press, New York.
- Tanyeli, E., Sevim, A., Demirbag, Z., Eroglu, M. ve Demir, I., 2010. Isolation and virulence of entomopathogenic fungi against the great spruce bark beetle, *Dendroctonus micans* (Kugelann) (Coleoptera: Scolytidae), Biocontrol Sci. Techn., 20, 695-701.
- T.C. Tarım Bakanlığı, 1992. *Struggle with Hazelnut Pests and Diseases*, Ankara.
- T.C. Tarım Bakanlığı, 2007. *Strategy Development Presidency, East Black Sea Regional Agriculture Infinitive Plan*, Ankara.
- T.C. Tarım Bakanlığı, 2011. *Ormanlarımızın Önemli zararlıları ve Mücadele Yöntemleri*, Ankara.
- Tigano-Milani, M., S., Gomes, A., C., M., M. ve Sobral, B., W., S., 1995. Genetic variability among Brazilian isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, 65, 206-210.
- Tuncer, C., Akça, I. ve Saruhan, I., 2001. Integrated Pest Management in Turkish Hazelnut Orchards, *ISHS Acta Horticulturae*, Vth International Congress on Hazelnut, 556.
- Tuncer, C. ve Ecevit, O., 1997. Current Status of Hazelnut Pests in Turkey. *ISHS Acta Horticulturae*, IVth International Symposium on Hazelnut, 445.
- URL-1, <https://www.almstead.com/insect-controls.html>
- URL-2, <http://findikci.net/mbocegi.htm>, Mayıs Böceği
- URL-3, [http://www.stbruno.ca/sites/default/files/images/vers-blancs\\_cycle-hanneton.jpg](http://www.stbruno.ca/sites/default/files/images/vers-blancs_cycle-hanneton.jpg)
- Ünal, G., 1998. *Zirai Mücadele İlaçları Toksikolojisi ve Çevre*, Ankara Zirai Mücadele Enstitüsü Seminer Notları, Ankara.
- Valencia, E., 2002. General and molecular characterization of *Beauveria bassiana* and other fungal isolates for the control of *Bemisia tabaci* whiteflies. PhD thesis, University of Saskatchewan, Saskatoon.
- Vandenberg, J., D. ve Cantone, F., A., 2004. Effect of serial transfer of three strains of *Paecilomyces fumosoroseus* on growth in vitro, virulence and host specificity, J. Invertebr. Pathol., 85, 40-45.
- Van den Bosch, R., Messenger, P., S. ve Gutierrez, A., P., 1982. *An Introduction to Biological Control*, Plenum Press, New York.
- Vega, F., E., Jackson, M., A., McGuire, M., R., 1999. Germination of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* on the cuticle of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*, Mycopathologia, 147, 33-35.
- Vega, F., E., Goettel, M., S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M., A., Keller, S., Koike, M., Maniania, N., K., Monzo'n, A., Ownley, B., H., Pell, J., K., Rangel, D., E., H. ve Roy, H., E., 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology, Fungal Ecol., 2, 149-159.

- Verma, M., Brar, S., K., Tyagi, R., D., Surampalli, R., Y. ve Vale'ro, J., R., 2007. Starch industry wastewater as a substrate for antagonist, *Trichoderma viride* production, Bioresource Technology, 98, 2154–2162.
- Wang, C., Types, M., A. ve Butt, T., M., 2002. Detection and characterisation of *Pr1* virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, FEMS Microbiol. Lett., 213, 251–255.
- Wang, C., S., Skrobek, A. ve Butt, T., M., 2003. Concurrence of Losing a Chromosome and the Ability to Produce Destruxins in a Mutant of *Metarhizium anisopliae*, FEMS Microbiology Letters, 226, 373–378.
- Weiser, J., 1969. An Atlas of Insect Diseases, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague.
- Wilson, M.,J. ve Gaugler, R., 2000. Terrestrial Mollusca Pests, In “Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests” (Lacey, L., A. ve Kaya, H., K., Eds.), 787-804, Kluwer Academic, Dordrecht.
- Wraight, S., P., Jackson, M., A., De Kock, S., L., 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt, T., M., Jackson, C., Magan, N., (eds) *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*, 253–288, CABI Publishing, Wallingford.
- Ye, S., D., Ying, S., H., Chen, C. ve Feng, M., G., 2006. New Solid-state fermentation chamber for bulk production of aerial conidia of fungal biocontrol agents on rice, Biotechnology Letters, 28, 799–804.
- Yilmaz, H., Waeyenberge, L., Demir, İ., Moens, M. ve Demirbağ, Z., 2009. A new entomopathogenic nematode species for Turkey, *Heterorhabditis megidis* Poinar, Jackson & Klein 1987 (Rhabditida: Heterorhabditidae), Turkish journal of Agriculture and Forestry, 33, 4, 385-391.
- Zimmermann, G.,. 2007a. Review on Safety of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*, Biocont. Sci. Technol., 17, 553-596.
- Zimmermann, G., 2007b. Review on Safety of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*, Biocont. Sci. Technol., 17, 879-920.

## 8. EKLER

### Ek 1. *Metarhizium anisopliae* KTU-51'in Pr1 Gen Bölgesinin Baz Sırası

GGGGCCTCTCTCGTACTCCTCAGGCTGAGAGCATCATTGCCGACAAGTATATTG  
TCAAGTTCAAGGATGATATTGCCCGTATCGCTACCGATGACACGGTCAGCGCT  
CTTACCTCCAAAGCCGACTTCGTTTACGAGCACGCCTTCCATGGGTTTGCAGGC  
TCCCTCACCAAGGAGGAGCTGAAGATGCTTCGTGAGCACCCCGGTGTAAGTAC  
CCCCTCCCACCTTACCTAGGTAGTCAAGGGAGACATGTAGGTGTTTGTGCTGAC  
CCGCTGCCCCATAGGTCGATTTTCATTGAGAAGGACGCCGTGATGCGTATCAGC  
GGCATCACTGAGCAGAGCGGTGCTCCCTGGGGTCTTGGGCGCATCTCACACCG  
CCAGAAGGGAAGCACCCACCTATCGCTACGATGATAGTGCCGGTGAGGGTACTT  
GCGTATATATCATTGACACTGGTATTGAGGCCTCCCACCCCGTAAGTTGTGCCG  
CCAAAACCTCCATAGTGCGGAGTAGGAAATTTACCAATATCATCCAGGATTTTG  
GGGGTCGCGCCACTTTTCTTAAGAGCTTCATCAGCGGTCAAACAGTGATGGC  
CACGGCCATGGGACTCACTGCGCTGGTACCATTGGTAGCAAAGCTACGGTGT  
TGCCAAAAGGCTAAGCTCTATGGTGTCAAGGTTCTTGACAACCAGGGCAGTG  
GTTCTACTCCGGTATCATCAGTGGCATGGACTACGTTGCACAGGACTCCAAG  
ACCCGCGGTGCCCATAAGGCGCCATTGCTTCCATGAGCCTGGGAGGTGGCTA  
CTCGGCGTCCGTCAACCAAGGTGCTGCTGCTTTGGTCAATTCTGGTGTCTTCT  
TGCCGTCGCCGCTGGCAACGATAACCGGGATGCCCAGAACACCTCTCCCGCTT  
CCGAGCCTTCTGCCTGCACTGTTGGTGCCACTGATTCAAATGACAACCGATCTT  
CCTTCTCCAACCTACGGCAAAGTTGTGATATTTTCGCTCCTGGTACCGGTGTT  
TTCCACCTGGATTGGTGGCAGCACTGTAAGTATTGTACCTACCTCCATAAGCT  
TAAAAACAGGCTTTTGCTTCAGAACCAGCTCTAACAAGGTTTAGAACACCATC  
TCTGGGACCTCCATGGGTACTCCCAATTCTGGGGGGGGCGCCACTAGAAAAAA  
AAAAAAAATTATTTAAAAAAAACCTGACTCCCCTGCACCTCCCAGCT  
CCCCACCC

### Ek 2. *Metarhizium anisopliae* KTU-60'in Pr1 Gen Bölgesinin Baz Sırası

CGGGCCATCTCTCTACTCGTCAGGCTGAGAGCATCATTGCCGACAAGTATATTG  
TCAAGTTCAAGGATGATATTGCCCGTATCGCTACCGATGACACGGTCAGCGCT  
CTTACCTCCAAAGCCGACTTCGTTTACGAGCACGCCTTCCATGGGTTTGCAGGC  
TCCCTCACCAAGGAGGAGCTGAAGATGCTTCGTGAGCACCCCGGTGTAAGTAC  
CCCCTCCCACCTTACCTAGGTAGTCAAGGGAGACATGTAGGTGTTTGTGCTGAC  
CCGCTGCCCCATAGGTCGATTTTCATTGAGAAGGACGCCGTGATGCGTATCAGC  
GGCATCACTGAGCAGAGCGGTGCTCCCTGGGGTCTTGGGCGCATCTCACACCG  
CCAGAAGGGAAGCACCCACCTATCGCTACGATGATAGTGCCGGTGAGGGTACTT  
GCGTATATATCATTGACACTGGTATTGAGGCCTCCCACCCCGTAAGTTGTGCCG  
CCAAAACCTCCATAGTGCGGAGTAGGAAATTTACCAATATCATCCAGGATTTTG  
GGGGTCGCGCCACTTTTCTTAAGAGCTTCATCAGCGGTCAAACAGTGATGGC  
CACGGCCATGGGACTCACTGCGCTGGTACCATTGGTAGCAAAGCTACGGTGT  
TGCCAAAAGGCTAAGCTCTATGGTGTCAAGGTTCTTGACAACCAGGGCAGTG  
GTTCTACTCCGGTATCATCAGTGGCATGGACTACGTTGCACAGGACTCCAAG

ACCCGCGGCTGCCCTAAAGGCGCCATTGCTTCCATGAGCCTGGGAGGTGGCTA  
 CTCGGCGTCCGTCAACCAAGGTGCTGCTGCTTTGGTCAATTCTGGTGTCTTCCT  
 TGCCGTCGCCGCTGGCAACGATAACCGGGATGCCCAGAACACCTCTCCCGCTT  
 CCGAGCCTTCTGCCTGCACTGTTGGTGCCACTGATTCAAATGACAACCGATCTT  
 CCTTCTCCAACACTACGGCAAAGTTGTCGATATTTTCGCTCCTGGTACCGGTGTT  
 TTTCCACCTGGATTGGTGGCAGCACTGTAAGTATTGTACCTACCTCGATAAGCT  
 TAAAAACAGGCTTTTTGCTTCAAACCAGCTCTAACAAGGTTTAGAACACCAT  
 CTCTGGGACCTCCATGGGTACTCCCAATGCGGTGGGGGGCGCCACTAGAAAAA  
 AAAAAAATCCACCACCTCCCATGCTCCCCTCTC

**Ek 3. *Metarhizium anisopliae* KTU-2'nin Pr1 Gen Bölgesinin Baz Sırası**

GGGCATCTTCGTCATCCTCAGGCTGAGAGCTCATTGCCGACAAGTATATTGTCA  
 AGTTCAAGGATGATATTGCCCGTATCGCTACCGATGACACGGTCAGCGCTCTT  
 ACCTCCAAAGCCGACTTCGTTTACGAGCACGCCTTCCATGGGTTTGCAGGCTCC  
 CTCACCAAGGAGGAGCTGAAGATGCTTCGTGAGCACCCCGGTGTAAGTACCCC  
 CTCCCACCTACCTAGGTAGTCAAGGGAGACATGTAGGTGTTTGTGCTGACCCG  
 CTGCCCCATAGGTCGATTTCAATTGAGAAGGACGCCGTGATGCGTATCAGCGGC  
 ATCACTGAGCAGAGCGGTGCTCCCTGGGGTCTTGGGCGCATCTCACACCGCCA  
 GAAGGAAGCACCACCTATCGCTACGATGATAGTGCCGGTGAGGGTACTTGCG  
 TATATATCATTGACACTGGTATTGAGGCCTCCCACCCCGTAAGTTGTGCCGCCA  
 AAACCTCATAGTGCGGAGTAGGAAATTTACCAATATCATCCAGGATTTTGGGG  
 GTCGCGCCACTTTTCTTAAGAGCTTCATCAGCGGTCAAAACAGTGATGGCCAC  
 GGCCATGGGACTCACTGCGCTGGTACCATTGGTAGCAAAAGCTACGGTGTGTC  
 CAAAAAGGCTAAGCTCTATGGTGTCAAGGTTCTTGACAACCAGGGCAGTGGTT  
 CCTACTCCGGTATCATCAGTGGCATGGACTACGTTGCACAGGACTCCAAGACC  
 CGCGGCTGCCCTAAAGGCGCCATTGCTTCCATGAGCCTGGGAGGTGGCTACTC  
 GCGTCCGTCAACCAAGGTGCTGCTGCTTTGGTCAATTCTGGTGTCTTCCCTTGC  
 CGTCGCCGCTGGCAACGATAACCGGGATGCCCAGAACACCTCTCCCGCTTCCG  
 AGCCTTCTGCCTGCACTGTTGGTGCCACTGATTCAAATGACAACCGATCTTCTC  
 TCTCCAACACTACGGCAAAGTTGTCGATATTTTCGCTCCTGGTACCGGTGTTCTTT  
 CCACCTGGATTGGTGGCAGCACTGTAAGTATTGTACCTACCTCGATAAACTTAA  
 AGACAGGCTTTTTGCTTCAAGAACAGCTCTTAACAAGGTTTAAACACCATCTC  
 TTGGCACTCCCTGGGTACTCCCAATGCGGGGGGGGGGGCCACTAGAATAAAAT  
 AAAAAAACCCAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAACACAAAGCACCTCCCTGCTCCCC  
 ATC

**Ek 4. *Metarhizium anisopliae* Gg-12'nin Pr1 Gen Bölgesinin Baz Sırası**

ATTTTGGGGGGATGCCTTTTTTTTTTTAATTAATTAATAAGCTTTTTCTGCCA  
 ATTATTGGGGCGGGCGCTGAGCCAGTTCCTCTCTTCACTTCTCCAGGTTGAGAG  
 CATCATTGGCGGCAAGTATATTGTCAAGTTCAAGGACGATATTGCCCGTATC  
 GCTACCGATGATACGGTAAGCGCTTTACCTCCAAAGCCGACTTCGTCTACGA  
 GCACGCCTTTCATGGGTTTGCAGGCTCCCTACCAAGGAGGAGCTGAAGATG  
 CTTCTGTGAGCACCCCGGTGTAAGTACCCCTCCCACTTACCTAGGTAGTCAAA





## ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Düzce’de doğdu. İlkokulu Hamidiye İlkokulu’nda, Ortaokulu Kız Meslek Lisesi’nde ve lise eğitimini Arsal Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 2004-2009 Eğitim-Öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2009 yılında bu bölümden üçüncülük derecesi ile Biyoloji Öğretmeni ünvanıyla mezun oldu. Mezun olduktan sonra Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 2012 yılında ‘*Gryllotalpa gryllotalpa*’dan Entomopatojenik Fungusların İzolasyonu ve Karakterizasyonu’ adlı tez ile Yüksek Lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında Doktora eğitimine başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.