

**TÜRKİYE TOPRAKLARINDAN ELDE EDİLEN  
ENTOMOPATOJEN FUNGUSLARIN BİYOLOJİK  
KONTROL AJANI OLARAK KULLANILMASI**

**USING THE ENTOMOPATHOGEN FUNGI OBTAINED  
FROM SOILS OF TURKEY AS BIOLOGICAL CONTROL  
AGENTS**

**YUSUF DOĞAN**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOLOJİ Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2009

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BIYOLOJİ ANABİLİM DALI 'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....  
Prof. Dr. Emir Cansunar

Üye (Danışman) :.....  
Prof. Dr. Nevin Keskin

Üye :.....  
Prof. Dr. Nilüfer Cihangir

Üye :.....  
Prof. Dr. Nurdan Özer

Üye :.....  
Yrd. Doç. Dr. Alev Haliki

ONAY

Bu tez ...../...../2009 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Erdem YAZGAN  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*Sevgili Aileme*

# TÜRKİYE TOPRAKLARINDAN ELDE EDİLEN ENTOMOPATOJEN FUNGUSLARIN BİYOLOJİK KONTROL AJANI OLARAK KULLANILMASI

Yusuf DOĞAN

## ÖZ

Zararlılarla mücadelede kullanılacak olan biyolojik kontrol ajanlarının izolasyonu farklı yöntemler ile yapılabilir. Bu yöntemlerden en hassas olanı böcek tuzak yöntemidir. Ayrıca bir biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılacak entomopatojen fungusların farklı suşlarının, farklı konaklarda değişik etki gösterdikleri bilinmektedir. Bu çalışmada hedef zararlı organizma *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvaları olduğu için böcek tuzak yönteminde bu canlı kullanılmış ve izolasyonlar sonucunda 180 toprak örneğinden 48 *Beauveria bassiana* ve 1 *Beauveria brongniartii* saptanmış olup, *Metarhizium spp.* saptanamamıştır. Ayrıca biyolojik kontrolde kullanılacak entomopatojen fungus suşlarının uygulanacak dozlarının doğru tespit edilmesinin, kontrolün başarısında büyük rol oynadığı bilinmektedir. Bu çalışmada, biyolojik kontrol ajanı olan *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes)'nin ülkemiz topraklarından elde edilen farklı suşlarının ve Danimarka'dan getirilen standart bir suşunun 4'er konsantrasyonu *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvaları üzerinde denenmiştir.

Türkiye topraklarından elde edilen 10 farklı suş ve standart suşun,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  ve  $1 \times 10^7$  konidiya/ml konsantrasyonları *Galleria mellonella* larvaları üzerinde denenmiştir. Bu 11 farklı suşun her konsantrasyonu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ortalama ölüm süreleri ( $LT_{50}$ ) karşılaştırıldığında, her suşun en yüksek konsantrasyonunun en başarılı olduğu bulunmuştur. Ancak yapılan istatistiksel analizlerde izole edilen bu 10 suş ile, standart suş arasında istatistiksel açıdan belirgin bir fark gözlenmemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyolojik kontrol, Entomopatojen fungus, Böcek tuzak yöntemi, *Beauveria spp.*, *Beauveria bassiana*, *Galleria mellonella*.

**Danışmanı:** Prof. Dr. Nevin KESKİN, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü Uygulamalı Biyoloji Anabilim Dalı, Beytepe-Ankara

# USING THE ENTOMOPATHOGEN FUNGI OBTAINED FROM SOILS OF TURKEY AS BIOLOGICAL CONTROL AGENTS

Yusuf DOĞAN

## ABSTRACT

Isolation of biological control agents which would be used with pests control could be done with different methods. The most sensitive of these methods is the insect bite method. Besides, it is known that the effects of different entomopathogen fungi isolates, which would be used as biological control agents varies in different hosts. In this study, since the target pest organism is the larval period of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), this pest is used for insect bite method and as a result of isolation from 180 soil samples, 48 *Beauveria bassiana* and 1 *Beauveria brongniartii* was detected but *Metarhizium spp.* wasn't detected. Furthermore, it is known that the precise determination of the entomopathogen fungi isolates, plays a crucial role in the success of a biological control program. In this study, as biological control agent, four concentrations of different isolates of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), which were obtained from soils of our country and a standard strain from Denmark were applied to *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae.

Concentrations ( $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  and  $1 \times 10^7$  conidia/ml) of ten different isolates from Turkey and standard isolate were applied to *Galleria mellonella* larvae. Each of the concentrations in all the eleven isolates gave significantly different values compared to the controls. When Lethal times ( $LT_{50}$ ) compared, it was found that the highest concentration of each isolates was also the most effective one. However there wasn't any significant difference between the ten isolates and the standard isolate.

**Key Words:** Biological control, Entomopathogen fungi, Insect bite method, *Beauveria spp.*, *Beauveria bassiana*, *Galleria mellonella*.

**Advisor:** Prof. Dr. Nevin KESKİN, Hacettepe University, Biology Department Applied Biology Section, Beytepe-Ankara

## TEŞEKKÜR

Beni bu konuda çalışmaya teşvik eden, çalıŐmanın yapılabilmesi için her t¼rl¼ desteği sağlayan ve gerekli ortamı yaratan hocam **Prof. Dr. Nevin Keskin'e**, fungus örneklerinin teşhis edilmesinde bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Ege Üniversitesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi **Yrd. Doç. Dr. Alev Haliki** ve **ArŐ. Gör. Özlem Abacı**'ya, elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde yardımcı olan H.Ü İstatistik Bölümü Öğretim Üyesi **Yrd. Doç. Dr. Mehmet Uysal**'a, laboratuvar çalışmalarında ve teorik konulardaki büyük yardımları için **ArŐ. Gör. Canan Hazır**'a, toprak örnekleri toplamamda bana yardımcı olan **ArŐ. Gör. Arda Cem Kuyucu, Fatih Doğan, İsmail Doğan, Levent Biler** ve **Yusuf Hüsamoğlu**'na teŐekk¼r ederim.

Ayrıca çalıŐmalarım boyunca bana her t¼rl¼ desteği veren sevgili annem **Deniz Doğan**'a, babam **Medeni Doğan**'a ve kardeŐim **Kenan Doğan**'a Ő¼kranlarımı sunarım.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZ .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	xi
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
2.1. Pestisitler .....	4
2.2. Pestisitlere Alternatif Zararlılarla Mücadele Yöntemleri .....	5
2.2.1. Entegre mücadele (Integrated Pest Management ) .....	5
2.2.1.1. Kültürel kontrol .....	7
2.2.1.2. Genetik kontrol .....	7
2.2.1.3. Biyolojik kontrol .....	8
2.3. Biyolojik Kontrol Stratejileri .....	10
2.3.1. Klasik biyolojik kontrol .....	10
2.3.2. İnokülatif biyolojik kontrol .....	11
2.3.3. İnundatif biyolojik kontrol .....	12
2.3.4. Koruma (Conservation) biyolojik kontrol .....	13
2.4. Biyolojik Kontrol Ajanlarının Yaşam Döngüsü .....	14
2.5. Patojeniteyi Etkileyen Faktörler .....	16
2.5.1. Konak faktörleri .....	16
2.5.2. Patojen faktörleri .....	17
2.5.3. Çevresel faktörler .....	18

2.6. Biyolojik Kontrolde Kullanılan Patojenler .....	19
2.6.1. Virüsler .....	19
2.6.2. Bakteriler .....	19
2.6.3. Protozoonlar .....	20
2.6.4. Nematodlar .....	20
2.6.5. Funguslar .....	21
2.7. Fungusların Biyolojik Mücadelede Kullanılmalarının Avantajları .....	25
2.8. Önemli Entomopatojen Fungus Grupları .....	25
2.8.1. Zygomycetes .....	25
2.8.2. Trichomycetes .....	26
2.8.3. Chytridiomycetes .....	26
2.8.4. Oomycetes .....	26
2.8.5. Deuteromycetes .....	26
2.9. Biyolojik Kontrol Ajanı Olarak <i>Beauveria spp.</i> ve <i>Metarhizium spp.</i> ...	29
2.10. Büyük Mum Güvesi <i>Galleria mellonella</i> .....	33
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM .....</b>	<b>36</b>
3.1. Toprak Örneklerinin Toplanması .....	36
3.2. Kullanılan Denek <i>Galleria mellonella</i> ( <i>Lepidoptera</i> ) (Büyük mum Güvesi) .....	36
3.3. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar .....	37
3.3.1. Sabouraud dextrose agar (SDA) .....	37
3.3.1.1. SDA Seçici Besiyeri (Veen's medium) .....	37
3.3.1.2. SDA Seçici Besiyeri .....	37
3.3.1.3. SDA Seçici Besiyeri (Modifiye) .....	37
3.3.2. Potato dextrose agar (PDA) .....	38
3.3.3. Malt extract agar (MEA) .....	38
3.3.4. <i>Galleria mellonella</i> üretiminde kullanılan yapay besi ortamı .....	38
3.3.5. Tween 80 .....	38

3.3.6. Laktofenol .....	39
3.4. İzolasyon .....	39
3.4.1. <i>Galleria</i> tuzak yöntemi ile izolasyon .....	39
3.4.1.1. Saf fungus kültürlerinin elde edilmesi .....	40
3.4.2. Toprak seyreltme yöntemi ile izolasyon .....	40
3.5. Deney Suşlarının Seçilmesi .....	41
3.5.1. Saprofit fungus örneklerinin elimine edilmesi .....	41
3.5.2. Entomopatojen fungus olabilecek örneklerin belirlenmesi .....	41
3.5.3. Preparat hazırlanması ve mikroskopik inceleme .....	41
3.6. Türlerin Teşhisi .....	42
3.7. Kullanılan Deney Suşları .....	42
3.8. Seçilen Deney Suşlarının ve Tip Türün Üretimi .....	44
3.9. Spor Solüsyonlarının Hazırlanması .....	44
3.10. Fungus Suşlarının <i>Galleria mellonella</i> Üzerinde Denenmesi .....	46
3.11. İstatistiksel Yöntemler .....	46
<b>4. SONUÇLAR .....</b>	<b>48</b>
4.1. İzolasyon Sonuçları .....	48
4.2. Tür Teşhisi Sonuçları .....	48
4.3. Ölüm Nedeninden Fungusun Sorumlu Tutulması .....	49
4.4. Deney Sonuçları .....	51
4.4.1. Fungus suşlarının <i>Galleria mellonella</i> üzerinde denenme sonuçları .....	51
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>73</b>
<b>KAYNAKLAR DİZİNİ .....</b>	<b>79</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>91</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Zararlılarla mücadelede biyolojik kontrol ve diğer stratejiler arasındaki ilişkiler .....	10
Şekil 2.2. Klasik biyolojik kontrol .....	11
Şekil 2.3. İnokülatif biyolojik kontrol .....	12
Şekil 2.4. İnundatif biyolojik kontrol .....	13
Şekil 2.5. Koruma(Conservation) biyolojik kontrol .....	13
Şekil 2.6. Biyolojik kontrol ajanlarının yaşam döngüsü .....	14
Şekil 2.7. a) Yatay patojen bulaşımı b) Dikey patojen bulaşımı .....	15
Şekil 2.8. Enfeksiyon yolu .....	27
Şekil 2.9. <i>B.bassiana</i> konidiyajen .....	30
Şekil 2.10 <i>B. bassiana</i> ile enfekte olmuş <i>Galleria</i> larvaları .....	31
Şekil 2.11. a) <i>Galleria mellonella</i> larvası b) Ergin <i>Galleria mellonella</i> .....	35
Şekil 3.1. Neubauer lamı ve spor sayımının yapıldığı alanlar .....	45
Şekil 4.1. <i>Beauveria bassiana</i> konidyafor, sporojen hücre (okun ucundaki) ve konidyalı.....	48
Şekil 4.2. <i>B. bassiana</i> .....	49
Şekil 4.3. <i>B. bassiana</i> ile enfekte olmuş ölmekte olan <i>Galleria</i> larvası.....	49
Şekil 4.4. <i>Galleria</i> larvası üzerinde üremiş <i>B. bassiana</i> sporları.....	50
Şekil 4.5. <i>Galleria</i> üzerinde gözlenen yoğun <i>B. bassiana</i> konidyafor ve konidyalı.....	50
Şekil 4.6. Tüm fungus suşlarının $1 \times 10^7$ doz uygulamalarının ve kontrol grubunun günlere göre % mortalite değerleri .....	60
Şekil 4.7. Tüm fungus suşlarının $1 \times 10^6$ doz uygulamalarının ve kontrol grubunun günlere göre % mortalite değerleri .....	60
Şekil 4.8. Tüm fungus suşlarının $1 \times 10^5$ doz uygulamalarının ve kontrol grubunun günlere göre % mortalite değerleri .....	61
Şekil 4.9. Tüm fungus suşlarının $1 \times 10^4$ doz uygulamalarının ve kontrol grubunun günlere göre % mortalite değerleri .....	61

Şekil 4.10.	DenK1 suşunun <i>Galleria mellonella</i> üzerinde denenen 4 konsantrasyonu ve kontrol grubuna göre mortalite değerleri .....	62
Şekil 4.11.	SB1(b) suşunun <i>Galleria mellonella</i> üzerinde denenen 4 konsantrasyonu ve kontrol grubuna göre mortalite değerleri .....	63
Şekil 4.12.	Ank 12 suşunun <i>Galleria mellonella</i> üzerinde denenen 4 konsantrasyonu ve kontrol grubuna göre mortalite değerleri .....	64
Şekil 4.13.	Lül 5 suşunun <i>Galleria mellonella</i> üzerinde denenen 4 konsantrasyonu ve kontrol grubuna göre mortalite değerleri .....	65
Şekil 4.14.	MerK suşunun <i>Galleria mellonella</i> üzerinde denenen 4 konsantrasyonu ve kontrol grubuna göre mortalite değerleri.....	66
Şekil 4.15.	BarK2 suşunun <i>Galleria mellonella</i> üzerinde denenen 4 konsantrasyonu ve kontrol grubuna göre mortalite değerleri .....	67
Şekil 4.16.	Kon-2 suşunun <i>Galleria mellonella</i> üzerinde denenen 4 konsantrasyonu ve kontrol grubuna göre mortalite değerleri .....	68
Şekil 4.17.	Ordu suşunun <i>Galleria mellonella</i> üzerinde denenen 4 konsantrasyonu ve kontrol grubuna göre mortalite değerleri .....	69
Şekil 4.18.	AyAk suşunun <i>Galleria mellonella</i> üzerinde denenen 4 konsantrasyonu ve kontrol grubuna göre mortalite değerleri .....	70
Şekil 4.19.	Erz suşunun <i>Galleria mellonella</i> üzerinde denenen 4 konsantrasyonu ve kontrol grubuna göre mortalite değerleri .....	71
Şekil 4.20.	KVL 03-129 suşunun <i>Galleria mellonella</i> üzerinde denenen 4 konsantrasyonu ve kontrol grubuna göre mortalite değerleri .....	72

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1. Mikrobiyal kontrol ajanların avantaj ve dezavantajları .....	2
Çizelge 2.1. Biyolojik ve kimyasal temelli entegre mücadele sistemleri .....	7
Çizelge 2.2. Farmasötik önemi olan biyoaktif bileşikler .....	21
Çizelge 2.3. Önemli entomopatojenik fungus cinsleri .....	23
Çizelge 2.4. <i>B. bassiana</i> tarafından üretilen bazı toksinler ve görevleri .....	32
Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan <i>Beauveria bassiana</i> izolatlarının elde edildiği toprak örneklerinin alındığı yerler ve vejetasyon tipleri .....	43
Çizelge 4.1. Frekans değerleri .....	52
Çizelge 4.2. Konsantrasyon karşılaştırmaları .....	53
Çizelge 4.3. Her suş için LD <sub>50</sub> değerleri .....	54
Çizelge 4.4. 1x10 <sup>7</sup> dozunun her suştaki ve kontrol grubundaki LD <sub>50</sub> değerleri.....	55
Çizelge 4.5. 1x10 <sup>6</sup> dozunun her suştaki ve kontrol grubundaki LD <sub>50</sub> değerleri.....	56
Çizelge 4.6. 1x10 <sup>5</sup> dozunun her suştaki ve kontrol grubundaki LD <sub>50</sub> değerleri.....	57
Çizelge 4.7. 1x10 <sup>4</sup> dozunun her suştaki ve kontrol grubundaki LD <sub>50</sub> değerleri.....	58
Çizelge 4.8. DenK1 (Denizli-Kocabey) suşunun <i>Galleria mellonella</i> larvalarına uygulanan konsantrasyonları ve gerçekleştirdikleri ortalama ölüm zamanları.....	62
Çizelge 4.9. SB1(b) (Beytepe) suşunun <i>Galleria mellonella</i> larvalarına uygulanan konsantrasyonları ve gerçekleştirdikleri ortalama ölüm zamanları .....	63
Çizelge 4.10. Ank 12 (Ankara) suşunun <i>Galleria mellonella</i> larvalarına uygulanan konsantrasyonları ve gerçekleştirdikleri ortalama ölüm zamanları .....	64
Çizelge 4.11. Lül 5 (Lüleburgaz) suşunun <i>Galleria mellonella</i> larvalarına uygulanan konsantrasyonları ve gerçekleştirdikleri ortalama ölüm zamanları .....	65

- Çizelge 4.12. MerK (Mersin-Kargıpınar) suşunun *Galleria mellonella* larvalarına uygulanan konsantrasyonları ve gerçekleştirdikleri ortalama ölüm zamanları ..... 66
- Çizelge 4.13. BarK2 (Bartın-Kumluca) suşunun *Galleria mellonella* larvalarına uygulanan konsantrasyonları ve gerçekleştirdikleri ortalama ölüm zamanları ..... 67
- Çizelge 4.14. Kon-2 (Konya) suşunun *Galleria mellonella* larvalarına uygulanan konsantrasyonları ve gerçekleştirdikleri ortalama ölüm zamanları .. 68
- Çizelge 4.15. Ordu suşunun *Galleria mellonella* larvalarına uygulanan konsantrasyonları ve gerçekleştirdikleri ortalama ölüm zamanları .. 69
- Çizelge 4.16. AyAk (Aydın-Akbük) suşunun *Galleria mellonella* larvalarına uygulanan konsantrasyonları ve gerçekleştirdikleri ortalama ölüm zamanları ..... 70
- Çizelge 4.17. Erz (Erzincan) suşunun *Galleria mellonella* larvalarına uygulanan konsantrasyonları ve gerçekleştirdikleri ortalama ölüm zamanları..... 71
- Çizelge 4.18. KVL 03-129 (standart suş) suşunun *Galleria mellonella* larvalarına uygulanan konsantrasyonları ve gerçekleştirdikleri ortalama ölüm zamanları ..... 72

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

<i>B. bassiana</i>	: <i>Beauveria bassiana</i>
<i>B. brongniartii</i>	: <i>Beauveria brongniartii</i>
<i>M. anisopliae</i>	: <i>Metarhizium anisopliae</i>
<i>G. mellonella</i>	: <i>Galleria mellonella</i>
IPM	: Integrated Pest Management
SDA	: Sabouraud Dextrose Agar
SDAY	: Sabouraud Dextrose + Yeast Agar
PDA	: Potato Dextrose Agar
MEA	: Malt Extract Agar
°C	: Santigrat derece
LD <sub>50</sub>	: Deneklerin %50'sini öldüren doz
LT <sub>50</sub>	: Deneklerin %50'sinin ölmesi için geçen süre
atm	: Atmosfer
ml	: Mililitre
mm <sup>2</sup>	: Milimetrekare
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre

## 1. GİRİŞ

Giderek artan dünya nüfusu nedeniyle doğal ekosistemler insan kullanımı adına daha fazla tarımsal alan elde etmek için hızlı bir şekilde değiştirilmektedir. Bu yüzden ormanlar, doğal bitki örtüsü ve hayvanlar yok edilmektedir. Yeterli miktarda besin üretimi için kullanılan ticari ve kalıcı çiftçilik sistemi yüksek düzeyde verimli ayrıca sürdürülebilir olmalı ve çevre kirliliğine yol açmamalıdır. Diğer yandan doğal hayatın gelecek için korunması gerekmektedir. Her iki hedefin gerçekleştirilmesi 21. yüzyılın en önemli sorunlarından biridir. Bu çözümlerden birisi ise biyolojik kontroldür (Van Driesche and Bellows, 1996).

Böcekler, tarım ve ormancılıkta büyük zararlara neden olmaktadır. Bunlarla mücadele çeşitli yöntemlerle yapılmakla birlikte, özellikle sentetik kimyasallar ve biyolojik kökenli ajanların kullanımları zararlılarla mücadelede önemli yer tutmaktadır.

Birçok zararlı böceğin kontrolünde kimyasal pestisitler kullanılmaktadır. Pestisitler birçok durumda etkili olduklarını kanıtlamışlardır. Özellikle de yabancı ot ve bitki hastalıklarının kontrolünde etkilidirler. Ancak bazı böceklerde, örneğin ipek böceklerinin kontrolünde etkisizdirler (Bottrell and Adkisson, 1977). Kullanılan kimyasallara karşı direnç geliştirmeleri, ayrıca çevrenin kontaminasyonuna ve insan sağlığına zararları yüzünden çevreye daha az zararlı yöntemler geliştirilmiştir (Van Driesche and Bellows, 1996; Wekesa et al., 2005; Monzon et al., 2008). Bu aşamada biyolojik kontrol fikri doğmuş, ve çeşitli canlı organizmalar kullanılarak zararlıların önüne geçilmeye çalışılmıştır. Biyolojik mücadelede en küçük mikroorganizmadan, omurgalılara kadar çeşitli canlı gruplar kullanılmaktadır. Bakteriler, funguslar, nematodlar, kuşlar ve böcekler biyolojik mücadelede önemli yere sahiptir (Oğurlu, 2000; Hansoylu, 2003).

Mikrobiyal biyolojik kontrol ajanları, zararlı böceklerle başa çıkabilmek için etkili, çevreye zararsız ve uzun vadede daha ucuz ekonomik yöntemler sunmaktadır (Kamp and Bidochka, 2002).

Çizelge 1.1. Mikrobiyal kontrol ajanların avantaj ve dezavantajları (Van Den Bosch et al., 1982; Deacon, 2005).

Avantajlar	Dezavantajlar
1.Tür özgüllüğü	1.Birbiriyle yakından ilişkili zararlı böceklerin karışık enfeksiyonunda tür özgüllüğü gereğinden fazla olabilir
2.Çevreye zararsız	2.Sınırlı alanlarda fazla maliyetli olması
3.Hedef böceğe yüksek virülans	3.Üretiminde ve uygulamada teknik ve lojistik problemler
4.Diğer kontrol tiplerine uygunluk	4.Fiziksel faktörlere duyarlı olması
5.Doğal kaynaklardan elde edilebilirliği ve doğal epizootik oluşturulmasında kontrol edilebilir olması	

Entomopatojen funguslar da bu konuda sahip oldukları birçok avantaj nedeniyle (Çizelge 1.1) tercih edilip, diğer organizmalarla birlikte kullanılmaya başlanılmışlardır. Funguslar potansiyel olarak çok yönlü entomopatojen olup, uygun ortam koşulları sağlandığında böcek popülasyonunun doğal kontrolünde başarılı olabilmektedir (Hansoylu, 2003).

Zararlı böceklerin kontrolünde sayısız entomopatojenik fungus kullanılmaktadır (Trudel et al., 2007). *Beauveria bassiana* ve *Metarhizium anisopliae* en fazla çalışılmış entomopatojen fungus türleri olup, her ikisi de çok geniş konak aralığına (De Melo et al., 2008) ve geniş coğrafik dağılıma sahiptirler (Kamp and Bidochka, 2002).

*Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Orthoptera*, ve *Hemiptera* takımlarını içeren 200 böcek türünden izole edilmiştir (Sookar et al., 2008).

*Beauveria bassiana* ile başarıyla yapılmış sayısız biyolojik kontrol deneyleri bulunmaktadır (Eken et al., 2006). Bu türün 200 den fazla böcek türünü enfekte edebildiği bilinmektedir. Ayrıca kışı atlatabilen toprak böceklerine karşı en yaygın ve en etkili fungus olduğu belirtilmiştir (Hicks et al., 2001).

Farklı bölgelerden elde edilen izolatların değişik konaklardaki etkilerinin farklı olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca fungusun uygulanacağı konsantrasyonun doğru saptanması kontrol ajanı olarak başarısını etkileyen önemli bir faktördür. Birçok çalışmada uygulanacak alandan elde edilen entomopatojen fungusun o alanda dışarıdan ithal edilene göre daha başarılı olacağı belirtilmiştir (Beron and Diaz, 2005). Bu nedenle bu konudaki birçok araştırmada deney hayvanı olarak tercih edilen *Galleria mellonella* larvaları kullanılarak *Beauveria bassiana* ve *Metarhizium anisopliae*'nin farklı suş ve konsantrasyonlarının etkilerini araştırmak amacıyla bu çalışma tasarlanmıştır. Ancak yapılan izolasyon çalışmalarında *Metarhizium anisopliae* türüne rastlanılmadığından, çalışmalar *Beauveria bassiana* suşları üzerinden yürütülmüştür.

Çalışmada Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden izole edilen *Beauveria bassiana*'nın 10 farklı izolatu ile etkisi kanıtlanmış standart bir suşun *Galleria mellonella* (*Lepidoptera*: Pyralidae) larvaları üzerinde 4'er farklı konsantrasyonu denenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Günümüzde gelişmiş ülkelerde tarım ve ormancılıkta kalitenin ve ürün miktarının artırılmasına yönelik; çok sayıda çalışma mevcuttur. Şüphesiz, bunların en önemlileri zararlı böceklerin, zararlarının ortadan kaldırılması veya en aza indirilmesine yönelik yapılan mücadele çalışmalarıdır. Şu ana kadar uygulanan kimyasal yöntemlerin çevre üzerinde olumsuz etkiler meydana getirdiği çok iyi bilinmektedir.

Kimyasal mücadele zaman içerisinde hızla gelişmiş ve yaygınlaşmıştır. Ancak, kimyasal bileşiklerin hem çevre ve insan sağlığına zarar verdiği hem de zararlıların bunlara karşı direnç geliştirdiği anlaşılınca zararlılarla mücadelede kimyasal maddelerin kullanımında tereddütler oluşmaya başlamış ve araştırmacılar dikkatlerini ekolojik dengeyi bozmayacak mücadele tekniklerine ve özellikle biyolojik mücadeleye çevirmiştir (Oğurlu, 2000; Floate et al., 2002).

Biyolojik kontrol, zararlı böceklerin yapmış olduğu zararları en aza indirmek için bu böceklerin doğal düşmanlarını kullanma olarak tanımlanabilir. Doğal düşman terimi, parazitler ve predatörlerle birlikte hastalık oluşturan organizmaları da kapsar (Yaman ve Demirbağ, 1998). Biyolojik kontrol, geçen yüzyılda oldukça ilgi görmüş günümüzde ise entegre mücadelenin önemli bir bileşeni olduğu kabul edilmiştir (Waage and Greathead, 1988; Kogan, 1998; Hansoylu, 2003).

### 2.1. Pestisitler

İnsektisitler ve genel kapsamda pestisitler, insanlar tarafından kullanılan çok önemli kimyasal maddelerdir. Pestisitler, tarımsal üretimde pek çok sistem içerisinde bulunan genel bileşiklerdir. Pestisitlerin kullanımı, 1940'lardan itibaren modern sentetik zehirlerin üretilmesinden bu yana, devamlı artış göstererek 1980'li yıllarda en tepe noktasına ulaşmıştır. Bu dönemden itibaren yeni aktif madde üretiminin azalması ve entegre mücadele tekniklerinin daha yaygın oranda kullanılmaya başlaması sonucu azalışa geçmiş ve gelecekte de azalacağı yönünde belirtiler ortaya çıkmaya başlamıştır (Georghiou, 1986; Floate et al., 2002; Kuyucu, 2007).

İnsektisitler; mevcut problemi bir kaç gün içerisinde çözmesi ve kısa sürede etki göstermesi kimyasal mücadeleyi diğer zararlı mücadele tekniklerine göre daha ekonomik yapar (Çağlar, 1991; Floate et al., 2002; Kuyucu, 2007). Kullanımının kolay oluşu ve uzun süreç alan özgü bir eğitim gerektirmemesi, pek çok tarımsal aktivite yanında diğer zararlılara karşı da insektisit kullanımını yaygınlaştırmıştır (Dent, 2000).

Ancak bu ve bunun gibi avantajlarına karşın, insektisit kullanımının çok önemli dezavantajları da vardır. Ürün sistemlerinin kendi içerisinde kullanım sıklığının artması bazı problemleri ortaya çıkarır. İnsektisit direnci; zararlıların yeniden ortaya çıkışı bu bileşiklerin daha fazla miktarda kullanılmaları sonucunu doğurur. Bu nedenle insektisitlerin kullanımıyla artan oranda bir etkisizlik durumu ortaya çıkar. Aşırı oranda ve tekrarlayan kullanım, çevresel kontaminasyonu ve hedef olmayan canlıların üzerinde negatif etkileri de beraberinde getirir. Özellikle balırsı, balık ve ürün kaldırılan bölge içinde ya da dışındaki doğal yaşam olumsuz yönde etkilenir. Çevresel kontaminasyon ve doğal hayatın etkilenmesi genellikle fiyat/fayda oranına eklenmez. İnsektisitlerin diğer bir dezavantajı da kullanıcılar için risk oluşturmasıdır. Pek çok insektisit yüksek oranda toksik olup, uygun şekilde kullanılmadığı durumlarda ya da kaza sonucu insanlarda zarar oluşturabilir hatta ölüme neden olabilir (Çağlar, 1991; Pedigo, 1996; Kuyucu, 2007). İnsektisitlerin bu dezavantajları araştırmacıları çevreye daha az zararlı yöntemleri bulmaya itmiştir (Floate et al., 2002).

## **2.2. Pestisitlere Alternatif Zararlılarla Mücadele Yöntemleri**

### **2.2.1. Entegre mücadele (Integrated Pest Management )**

Entegre mücadele (IPM) kavramı kullanılmaya ve uygulanmaya başlamadan önce, bazı basit taktikler böceklerin bitkiler üzerinde olan yıkıcı etkilerini azaltmak amacıyla kullanılmaktaydı. Pestisitlerin gücünün henüz keşfedilmediği 18. yüzyılın başlarından 19. yüzyılın sonlarına kadar olan dönemde bitki korumacılar, böcek biyolojisine bakarak ve kültürel bazı yöntemleri uygulayarak çoklu kontrol taktikleri geliştirmiş ve bazı açılardan günümüzdeki modern IPM'in temellerini atmışlardır. 20. yüzyılın ilk yarısında ekonomik entomoloji zararlı böcek türleri üzerinde araştırma yapıp, bu türlerin neden olduğu ekonomik

zararları belirleme ile ilgilenmekteydi. " Zararlı Kontrolü " kavramı evcil hayvanlar ya da tarım ürünleri üzerinde zararlıların etkilerini önlemek, azaltmak ya da geciktirmek olarak anlaşılıyordu. Bu durum, koruma uzmanlarının böcek biyolojisini zarara uğratan kimyasallar üzerinde çalışmaya odaklandıkları ve organosentetik insektisitlerin bulunduğu 1940'lı yılların sonuna kadar sürdü. 1940'lı yılların sonlarından 1960'lı yılların ortalarına kadar olan periyot zararlı kontrolünün karanlık çağları olarak adlandırılmıştır. Ama yine de 1950'li yılların sonuna doğru insektisitlerin fazla miktarda kullanımının riskli olduğu şeklindeki uyarıların sayısı artmaya başladı (Kogan, 1998; Jaglan and Singh, 2007).

Organosentetik kimyasalların etkisinin giderek düşmeye başladığının anlaşılması, böceklerde dayanıklılığın artması, primer zararlı türlerin yeniden ortaya çıkması, sekonder zararlıların sayısının artması ve kimyasallar yüzünden meydana gelen aşırı çevre kirlenmesi " Entegre Kontrol " kavramının popülaritesinin hızla artmasını sağladı (Kogan, 1998; Jaglan and Singh, 2007).

Entegre kontrolü için yapılan en kapsamlı tanım, " zararlı türlerin populasyon dinamikleri ve çevre ile ilişkileri bağlamında bütün uygun teknik ve metodları mümkün olduğu derecede bir arada kullanan ve zararlı populasyonlarını ekonomik zarar seviyesinin altında tutan bir yönetim sistemi " olarak kabul edilmiştir (Kogan, 1998; Bajwa and Kogan 2002; Jaglan and Singh, 2007).

Entegre mücadele biyolojik, kimyasal, genetik ve kültürel kontrol gibi çeşitli yöntemlerin bir arada ve uygun koşullarda değerlendirilmesidir. Bu kontrolde çeşitli stratejilerin kombinasyonu sonucunda yeni bir ekolojik denge yaratılmaktadır (Çizelge 2.1)(Van Driesche and Bellows, 1996).

Çizelge 2.1. Biyolojik ve kimyasal temelli entegre mücadele sistemleri (Van Driesche and Bellows, 1996). Soldaki; Doğal düşman zararlı böcek ilişkisine dayanan biyolojik temelli entegre mücadele sistemi, Sağdaki; Pestisitlerle müdahale temeline dayanan kimyasal temelli entegre mücadele sistemi.

Kültürel Kontrol	Genetik Kontrol	Kimyasal Kontrol
Biyolojik Kontrol		

Kültürel Kontrol	Genetik Kontrol	Biyolojik Kontrol
Kimyasal Kontrol		

#### 2.2.1.1. Kültürel kontrol

Tarımsal alanın değiştirilmesi yani alanın tarımsal bitkiler için ideal ancak zararlı böcekler için uygunsuz hale getirilmesidir. Bu yöntemde yapılan işlemler ise sanitasyon yani ortamdaki bitki kalıntılarının temizlenmesi, ekim programlarının değiştirilmesi, ekin rotasyonu (farklı ürün ekimi), birkaç farklı bitki türünün ekilmesi ile biyolojik çeşitlilik sağlanması ve tuzak bitkiler kullanarak zararlı böceklerin ilgisinin bu bitkilere çekilmesidir (Van Den Bosch et al., 1973; DeBach and Rosen, 1991; Hajek, 2004).

#### 2.2.1.2. Genetik kontrol

Genetik kontrol kapsamında, zararlı böceklerin kontrolü genetik yapılarının değiştirilmesiyle (radyasyon, kimyasallar ile) güçsüz ve doğurgan olmayan bireylerin oluşturulması (kısır erkek tekniği), ayrıca bitki türlerinin aşılama, melezleştirme ya da genetik işlemler ile kendilerine zararlı olabilecek türlere karşı direnç kazandırılması sağlanılır (Van Den Bosch et al., 1973; DeBach and Rosen, 1991; Oğurlu, 2000).

### 2.2.1.3. Biyolojik kontrol

Biyolojik kontrol, tarım ürünlerine ya da eğlence bölgelerindeki bitkilere olabilecek ekonomik zararlardan kaçınmak için kullanılan yöntemlerden biridir (Eilenberg, 2006).

Biyolojik kontrolün tarihi insan tarihi kadar eskidir. Biyolojik kontrolünün ilk kayıtlarında habitat manipülasyonu, doğal düşman popülasyonunun artırılması olarak tarif edilmiştir. M.Ö 324' te Çin' de insanlar *Oecophylla smaragdina* adlı karınca türünü turunçgillere ait ağaçlara vererek ağaçların tırtıllardan korunmasını sağlamışlardır. Bu yöntem çağlar boyunca kullanılmış, modern zamanda bile turunçgil yetiştiricileri bu yöntemi kullanmaya devam etmiş ve hatta bazen bu avcı karınca kolonilerini satın alarak yaprakla beslenen böcekleri azaltmak için portakal ağaçlarına vermişlerdir (Van Den Bosch, 1973; Hajek, 2004).

Tarım ve ormancılıkta daha fazla ürün elde etmek için yapılan gelişmeler beraberinde zararlı böcek ve bitki sorunlarını da getirmiştir. Bu zararlılara karşı mücadelede tüm dünya sentetik kimyasal pestisitleri, özellikle de 1942 yıllarında DDT (Dikloro Difenol Trikloroethan) ve bir herbisit olan 2,4-D (2,4-Diklorofenoasetik asit) kimyasallarını kullanmıştır. Doğal düşmanların keşfi ve tanımlanmaları bu pestisitlerden daha önce olmasına rağmen doğal düşmanların biyolojik mücadelede kullanılmasındaki gelişmeler, pestisitlerin zararlarının anlaşılmasından sonra artmış ve gelişmiştir. Kimyasal pestisitlerin kullanılmasından daha önce zararlılarla mücadelede doğal düşmanların kullanılması düşünülmüştür. Rene Reamur'un 1734 yılında afid yiyen sineklere ait yumurtaları, seralara salarak bitkilere zarar veren afidleri kontrol altına alması bilimsel anlamda yapılan ilk biyolojik mücadele çalışması olarak bilinmektedir (Demirbağ, 2008). Linnaeus 1752 yılında zararlı böceklerin kontrolünde avcı böceklerin kullanımını önermiştir (Hajek, 2004).

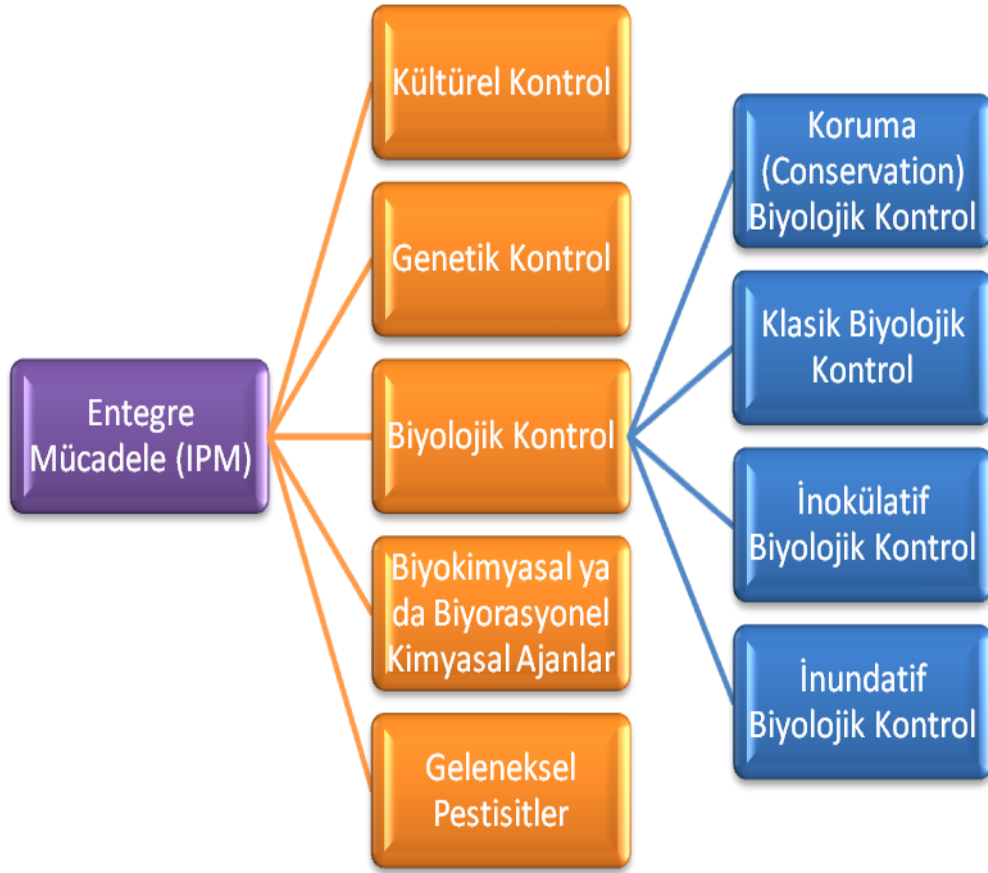
Tüm canlı organizma popülasyonları bir dereceye kadar avcılarının, parazitlerinin, antagonistlerinin ve hastalıklarının doğal etkileriyle azaltılır. Buna doğal kontrol denilir ama kontrol edilenler zararlılar (böcekler vs.) olunca bu ifade biyolojik kontrol (diğer bir ifadeyle biyokontrol) olarak adlandırılır. Biyolojik

kontrol ajanları olarak kullanılanlar ise zararlıların doğal düşmanlarıdır (Hajek, 2004). Biyolojik kontrol bugüne kadar birçok kez tanımlanmıştır. Eilenberg ve arkadaşları tarafından yapılan son tanıma göre ise biyolojik kontrol, "canlı organizmalar kullanılarak zararlı organizmaların daha az sayıda olmalarını ve daha az zarar vermelerini sağlamak" olarak ifade edilmiştir (Eilenberg et al., 2001).

Tanımdan da anlaşılacağı üzere biyolojik kontrolde canlı organizmalar kullanılmaktadır (Eilenberg, 2006). Bu canlılar (doğal düşmanlar) predatör ve parazitler olmak üzere iki kategoride gözlemlenir. Predatörler konaklarıyla karşılaştırıldığında nispeten büyüktür ve onları ya vücut sıvılarını emerek ya da yiyerek tüketirler. Parazitoid ise gelişmemiş döneminde her zaman parazittir ve tek bir konağın üstünde ya da içinde gelişimini tamamlar (Van Den Bosch et al., 1973). Yaklaşık 2300 parazitoid ve predatör, 600 farklı artropodun zararlı kontrolü için 1890'lı yıllardan 1960'lı yıllara kadar uygulanmıştır. Biyolojik kontrolde en küçük mikroorganizmadan, omurgalılara kadar çeşitli biyolojik gruplar kullanılmaktadır. Virüsler, bakteriler, protozoonlar, funguslar, nematodlar, böcekler ve kuşlar biyolojik kontrolde önemli yer tutar. Biyolojik kontrol ilk olarak böcekleri, keneleri ve yabancı otları kontrol etmek için kullanılmıştır. Zamanla uygulama metodları çoğaldıkça diğer omurgasızlar, bitki patojenleri ve hatta bazı omurgalılar bile hedef organizmalar olarak değerlendirilmiştir (Van Driesche and Bellows, 1996; Oğurlu, 2000; Demirbağ, 2008).

Zararlılarla mücadelede biyolojik kontrolün kullanımı, kimyasal pestisitlerin kullanımına göre zararlı biyolojisi ve ekolojisi hakkında çok daha fazla bilgi gerektirmektedir. Tüm ekolojik kontrol tiplerinde doğal düşmanların zararlılar üzerinde etkinliğinin olup olmadığının gösterilmesi gereklidir (Hajek, 2004).

Bugünlerde biyolojik kontrol, zararlı böceklerin kontrolünde arzu edilen bir yöntem olarak düşünülmektedir. Çünkü çevreye zararsızdır ve vektörlerde direnç oluşumunu engellemektedir (Moazami, 2002; Torrado-Leon et al., 2006).



Şekil 2.1. Zararlılarla mücadelede biyolojik kontrol ve diğer stratejiler arasındaki ilişkiler (Eilenberg et al., 2001).

### 2.3. Biyolojik Kontrol Stratejileri

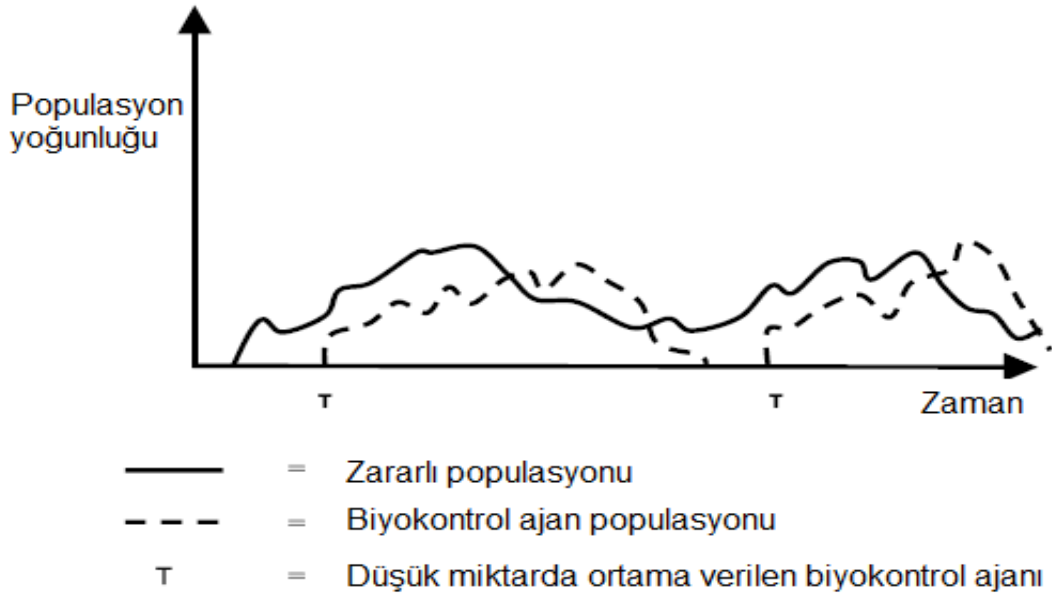
Entegre mücadelede biyolojik kontrol stratejilerinin yeri Şekil 2.1’de gösterilmiştir.

#### 2.3.1. Klasik biyolojik kontrol

Klasik biyolojik kontrol, genellikle doğal düşmanı ile ortak evrimleşmiş bir egzotik biyolojik kontrol ajanının, sürekli yerleşimi ve uzun süreli zararlı kontrolü için bilerek ortama verilmesi olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.2) (Eilenberg et al., 2001).

Daha önceden bulunmadığı bir ortama kasıtlı ya da kazara bir organizma girdiğinde bazen bu organizma yüksek populasyon yoğunluğuna ulaşır ve ciddi zararlara sebep olur. Bu artış ortamda doğal düşmanlarının olmayışındandır. Klasik biyolojik kontrolde ise bu zararlının orijinal bölgesindeki doğal düşmanları toplanır ve zararlının olduğu bölgeye biyolojik kontrol ajanı olarak bırakılır. Doğal



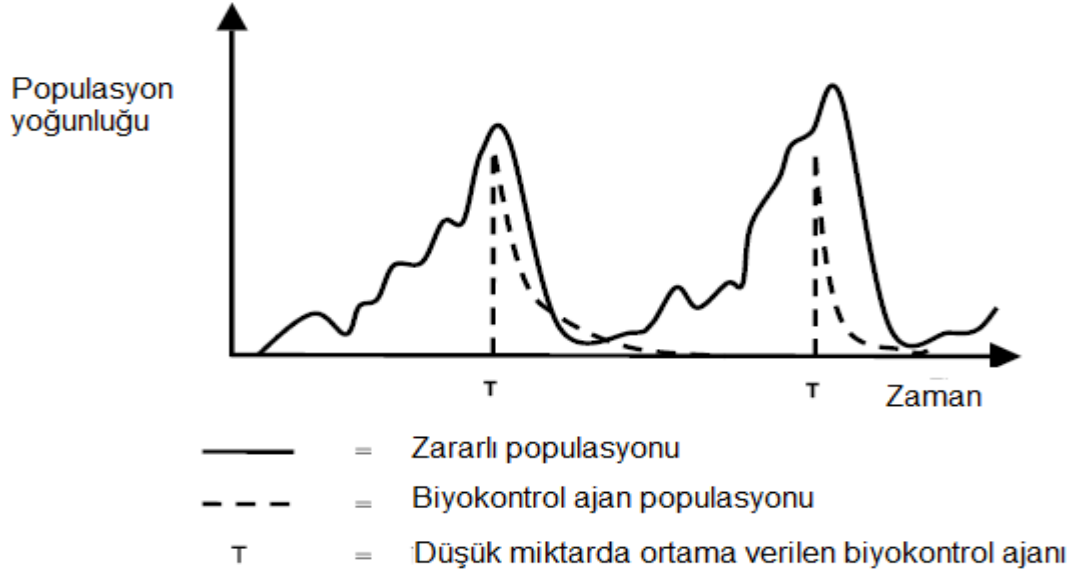


Şekil 2.3. İnokülatif biyolojik kontrol (Eilenberg, 2006).

### 2.3.3. İnundatif biyolojik kontrol

Bu metod kısa süre içerisinde zararlıların kontrolü için geliştirilmiştir. Ortama verilmiş biyolojik kontrol ajanlarının yüksek miktarda zararlı popülasyonunu öldürmesi ya da diğer bir deyişle kontrolün sağlanması için zarar seviyesinin düşürülmesi gerektirmektedir. Bu yüzden de hızlı bir kontrol için yüksek miktarda ajanın ortama verilmesi önemlidir (Hajek, 2004).

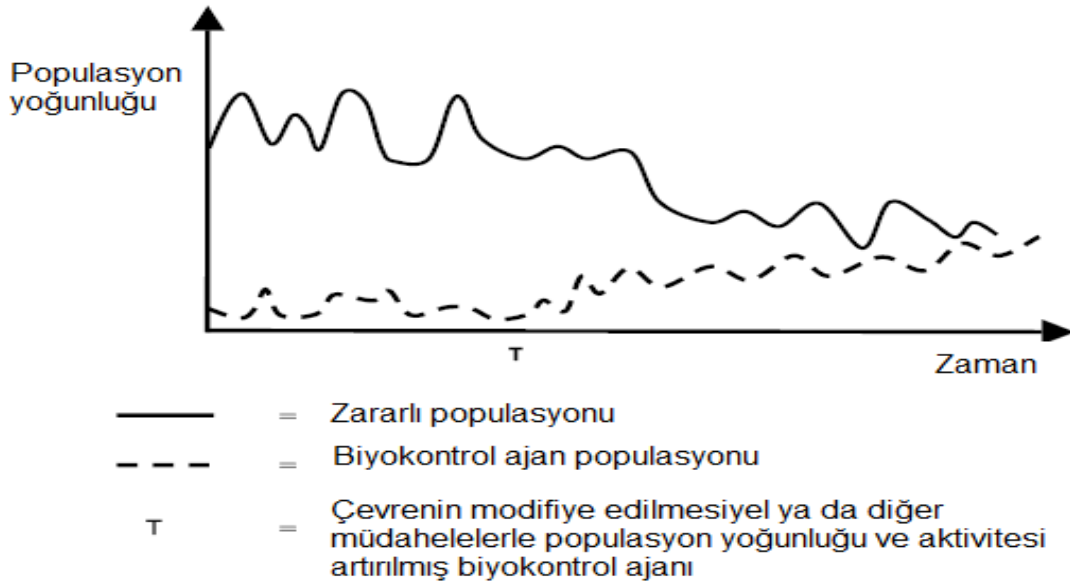
Zararlı popülasyonu belli bir zaman içinde arttığında ortama yüksek miktarlarda biyolojik kontrol ajanı verilir. Zararlıların kontrolü hızlıca olur ve hem zararlıların popülasyon yoğunluğu hem de biyolojik kontrol ajanının popülasyon yoğunluğu zaman içerisinde azalır. Bir süre sonra zararlıların popülasyon yoğunluğu yeniden artar ve biyolojik kontrol ajanının tekrar uygulanması gerekir (Şekil 2.4) (Eilenberg, 2006).



Şekil 2.4. İnundatif biyolojik kontrol (Eilenberg, 2006).

#### 2.3.4. Koruma (Conservation) biyolojik kontrol

Çevrenin ya da biyolojik kontrol yöntemlerinin modifiye edilmesiyle zararlıların etkisini azaltılmak için zaten o ortamda var olan özel düşmanların ya da diğer organizmaların çoğaltılması ve korunmasıdır (Şekil 2.5)(Eilenberg et al., 2001).



Şekil 2.5. Koruma (Conservation) biyolojik kontrol (Eilenberg, 2006).

Bu yöntem diğerlerinden farklıdır. Çünkü herhangi bir biyolojik kontrol ajanının salınımı söz konusu değildir. Sadece daha önceden ortama verilmiş organizmaların popülasyon büyüklüklerinin artırılmasıyla korunma sağlanır (Eilenberg, 2006).

#### 2.4. Biyolojik Kontrol Ajanlarının Yaşam Döngüsü

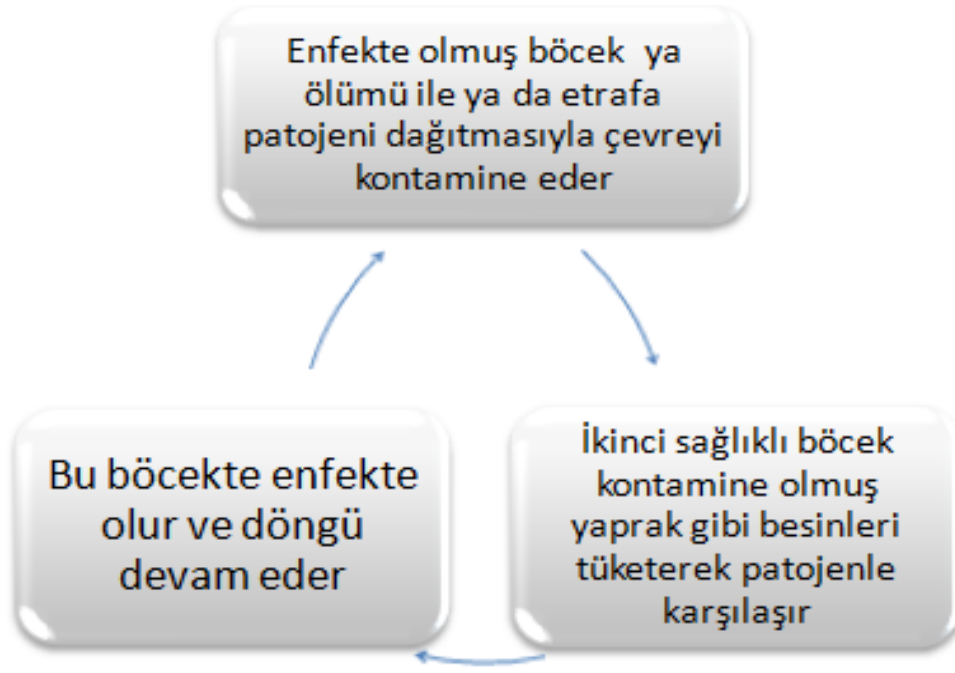
Biyolojik kontrol ajanlarının yaşam döngüleri şematize edilerek Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Biyolojik kontrol ajanlarının yaşam döngüsü.

Predatör ve parazitoidlerin yanı sıra birçok böcek patojeni hareketli dönemden yoksundur. Dolayısıyla konakla temas aktif bir arama işlemi yerine, pasif bir şekilde dağılan enfektif patojen birimlerinin (fungal sporların rüzgarla, yağmurla ya da diğer organizmalarla dağılımı gibi) konaklarıyla teması şansı ile olur. Ancak bazı nematod ve akuatik fungus türleri konaklarına doğru hareket edebilirler (Van Driesche and Bellows, 1996). Patojenlerin hastalık bulaştırmaları iki şekilde olur. Bunlar yatay patojen bulaşımı ve dikey patojen bulaşımı'dır (Şekil 4.7).

A)



B)



Şekil 2.7. a) Yatay patojen bulaşımı b) Dikey patojen bulaşımı (Van Driesche and Bellows, 1996).

Birçok bakteri, virüs ve protozoa böcekler tarafından yenildikten sonra kitinize olmamış ince orta bağırsak duvarından böceğin dokularına girer (Jones, 2000; Hajek, 2004). Nematodlar ya orta bağırsak yolu ile ya da böceğin yaralarından, solunum sistemine açılan delikçiklerden sahip oldukları stilet gibi yapılarla böceğin kutikul tabakasını delerek girerler (Hajek, 2004; Griffin et al., 2005). Funguslar böceğe kutikula yolundan sporun çimlenmesi ile girerler (Van Driesche and Bellows, 1996).

Vücuda giren patojenler konağın ya tüm dokularına ya da bazı dokularına yayılarak ürerler. Örneğin *Oryctes* virüsleri böceğin yağ dokusu hücrelerinde ve orta bağırsak epitelyumunda ürerler. Konağın vücudu içerisinde patojenin üremesini takiben yeni neslin patojenite döngüsünü tamamlaması için kadavradan ayrılması gereklidir. Konaktan ayrılmaları konağın parçalanmasıyla, konağın dışkılmasıyla ve konağın kutikula yüzeyinden sporların üremesiyle gerçekleşir (Van Driesche and Bellows, 1996; Hajek, 2004).

## **2.5. Patojeniteyi Etkileyen Faktörler**

### **2.5.1. Konak faktörleri**

Epizootik gelişimi etkileyen konak faktörlerin içerisinde konak yoğunluğu, dağılımı, konağın sağlığı, yaşı, deri değiştirme dönemi ve konak davranışı vardır (Van Driesche and Bellows, 1996; Inglis et al., 2001; Klingen and Haukeland, 2006 ).

Konak yoğunluğunun fazla olması patojenin konağıyla karşılaşma şansını artırır. Konak sağlığı bir patojenin bulaşma oranını etkileyen önemli faktörlerden biridir. Çünkü başka patojenler tarafından baskılanmış konaklar, zayıf beslenme ve kötü fiziksel kondüsyon durumundan dolayı diğer patojen saldırılarına karşı daha dirençsiz kalır. Aynı zamanda yaş ve deri değiştirme dönemlerinde de hedef canlılar patojenlere karşı duyarlıdır. Örneğin genç tırtıllar, bir bakteri türü olan *Bacillus thuringiensis* ve virüslere daha duyarlıdır. Ayrıca yeni deri değiştirmiş böcekler derilerinin ince olması nedeniyle o dönemde fungal patojenlere karşı daha duyarlıdır (Van Driesche and Bellows, 1996; Inglis et al., 2001; Klingen and Haukeland, 2006).

Çeşitli konak davranışları böcek popülasyonu içerisinde bir hastalığın bulaşma oranını etkileyebilir (Langewald et al., 2003). Böceklerin kümelenme şekilleri, aktivite düzeyi ve enfekte olmayanlar tarafından enfekte olanların ortadan kaldırılması örnek olarak verilebilir. Hastalanmış böceklerin anormal davranışları enfektif patojen birimlerinin dağılımını artırır. Kanibalizm buna örnek olarak verilebilir (Fuxa, 1987; Van Driesche and Bellows, 1996; Inglis et al., 2001).

### **2.5.2. Patojen faktörleri**

Konak popülasyonu içerisinde hastalık oranını etkileyen birçok patojen karakteri vardır. Bunlar bulaşıcılık, virulans, toksinlerin üretimi, patojenin yaşam döngüsünün doğası, patojen yoğunluğu, dağılımı ve kalıcılığıdır (Van Driesche, 1996; Inglis et al., 2001).

Belirli bir patojen türünün genotipi o patojenin belirli bir konağa karşı bulaşıcılığını ve virulansını kuvvetlice etkiler. Bulaşıcılık bir patojenin konağının vücuduna giriş yeteneği, virulans ise patojenin konağında hastalığa neden olma yeteneğidir. Funguslarda penetrasyon hifi bulaşıcılığını konağa göre değiştirerek üreteceği enzimlerin düzeyini değiştirebilirler. *B. thuringiensis* izolatları ürettikleri toksinlerin miktarı ve çeşitliliği açısından birbirinden farklıdır. Toksinlerdeki bu farklılık ise farklı konak gruplarının hangi bakteri izolatları tarafından etkileneceğini belirtir (Van Driesche, 1996; Inglis et al., 2001).

Patojenlerin yaşam döngüsü basit olduğu gibi karmaşık olanları da vardır. Ancak karmaşık yaşam döngüsü patojenin bulaşmasında sınırlayıcı etken olabilir. Ancak ortamda alternatif konakların varlığı bu durumun atlatılmasına yardımcı olur. Örneğin, *Coelomomyces* cinsine ait fungal patojenlerin bir sonraki uygulamaları için aralıksız üremeleri ortama copepod ya da ostracodlar gibi alternatif konakların verilmesiyle mümkün olur (Van Driesche and Bellows, 1996; Daecon, 2005).

Bir patojenin dağılımı, yoğunluğu ve kalıcılığı patojenin konak popülasyonunda ortaya çıkma oranını, hastalığın frekansını ve epizootik yoğunluğunu belirlemede önemlidir. Ayrıca patojenlerin enfektif birimlerinin dağılımları doğanın etkisine bağlı olarak değişir. Rüzgarla savrulan fungal

sporlar virüslere göre daha fazla dağılırlar (Van Driesche and Bellows, 1996; Inglis et al., 2001).

### **2.5.3. Çevresel faktörler**

Birçok biyotik ve abiyotik faktör patojenite düzeyini etkiler. Bunların içerisinde sıcaklık, nem, kuraklık, ışık, toprak özelliği ve patojen yayılımına yardımcı olan diğer organizmalar yer alır (Inglis et al., 2001; Deacon, 2005; Klingen and Haukeland, 2006; Zimmermann, 2007a).

Sıcaklık farklılıkları hem patojeni hem de konağı etkileyebilir. Ama patojenite oranına etkisi diğer faktörler (örneğin davranış, gelişim, hareket gibi) göz önüne alındığında sıcaklığın konak-patojen üzerindeki etkisi anlaşılabilir. Patojenin konağa giriş yolu buna örnek olarak verilebilir. Funguslar konaklarına kutikula yoluyla girerler. Bunu gerçekleştirmeleri ise sıcaklığın uygun derecede olması ile spor çimlenir ve hifal gelişim olur (Van Driesche and Bellows, 1996; Griffin et al., 2005; Klingen and Haukeland, 2006; Zimmermann, 2007a).

Nem ve kuraklık patojenite açısından önemlidir. Yüksek nem oranı fungusların lehine; hem sporların çimlenmesini hem de enfekte olmuş kadavradan sporların oluşumunu tetikler. Yüksek nem ve toprak nem düzeyi nematod epizootiğinde de önemlidir (Zimmermann, 2007a). Bakteri, virüs ve protozoon patojenlerinin neden olduğu hastalıklar nemden fazla etkilenmez. Diğer yandan kuraklık nematod, bakteri ve protozoa gibi birçok patojen tipleri için ölümcül bir faktördür (Griffin et al., 2005; Klingen and Haukeland, 2006). Çoğu patojen bu dönemi atlatmak için özel bir evreye sahiptir (Van Driesche and Bellows, 1996).

Güneş ışığının diğer bir deyişle UV ışınlarının, fungal sporlar üzerinde olumsuz etkisi vardır. Ancak sahip oldukları ışık emici pigmentler sayesinde korunabilirler. Toprak; fungus, nematod ve bakteri gibi patojenlerin dinlenme evrelerinde hayatta kalmaları için mükemmel bir ortam sağlar (Van Driesche and Bellows, 1996; Zimmermann, 2007a).

## 2.6. Biyolojik Kontrolde Kullanılan Patojenler

### 2.6.1. Virüsler

Virüsler bütün canlılarda olduğu gibi böceklerde de hastalık etmeni olarak bulunurlar. İpek böceği veya balarısı gibi faydalı böceklerde virüsler hastalık oluşturup ekonomik kayıplara neden olurken, aynı zamanda zararlı böceklerde de enfeksiyon oluşturarak böceğin zararlı etkisinin ortadan kalkmasına olanak sağlarlar. Zirai mücadelede zararlı böceklere karşı kullanılan mikrobiyal insektisitlerin bir grubunu oluşturan virüsler en çok gelecek vadeden biyolojik mücadele ajanıdır. Böcekleri enfekte eden 11 virüs ailesi ve diğer virüs grupları tanımlanmıştır. Bu gruplar içerisinde kontrol ajanı olarak en çok kullanılanı *Baculavirüs* familyasıdır. İnsanlara zarar vermemeleri, duyarlı olan böceklere yüksek patojenite göstermeleri ve hedef dışı böceklere enfektif olmayışları nedeniyle biyolojik mücadelede dikkatleri üzerine çekmiştir (Jones, 2000; Hajek, 2004; Nalçacıoğlu, 2008).

Böcek patojeni virüslerinin *Lepidoptera*, *Orthoptera*, *Coleoptera* ve *Diptera* gibi dünyanın en önemli tarımsal zararlılarını içeren takımlarından hastalık etmeni olarak izole edilmeleri, bu virüsleri çok önemli kılmaktadır (Nalçacıoğlu, 2008).

### 2.6.2. Bakteriler

Biyolojik mücadele uygulamalarında gram pozitif bakteriler gram negatiflere göre daha fazla kullanılmaktadır ve mikrobiyolojik insektisitlerin temelini oluşturmaktadırlar. Böceklere karşı zirai mücadele de *Bacillus* ve *Serratia* cinsine ait bakteriler kullanılmaktadır. *Bacillus* cinsine ait türler en önemli mikrobiyal pestisitlerdendir (Jackson and Saville, 2000; Katı, 2008).

Böceklere önemli zararlar veren bakteriler, daha çok spor meydana getiren grupta yer alır. Araştırmalar, sporların kuraklık ve yüksek ısıya karşı dayanıklı olduğunu göstermiştir. Spor oluşturmeyen bakteri, oldukça dayanıksız ve hassastır. Bu nedenle, genellikle böceklere karşı yapılan mücadelelerde, spor oluşturan ve fakültatif aerob bakterilerin kristal taşıyanları kullanılmaktadır (Katı, 2008).

Entomopatojen bakteriler, günümüzde zararlı böceklere karşı en fazla kullanılan mikroorganizmalardır (Navon, 2000). Bunlar içerisinde en fazla çalışılanı *B. thuringiensis*'tir. Bu bakteri türü başta *Lepidoptera* olmak üzere *Diptera* ve *Coleoptera* türlerine karşı da kullanılmaktadır (Cote, 2007). *Bacillus thuringiensis*'in zirai ürünleri, biyopestisit pazarının % 95' ini oluşturmaktadır (Katı, 2008).

### 2.6.3. Protozoonlar

Entomopatojenik protozoonlar Zoomastigina, Apikompleksa, Mikrosporidia ve Siliifora olmak üzere 4 filumda yer alırlar (Klingen and Haukeland, 2006). Bu filumlara ait türlerin yaşam döngüleri; kompleks ve hem yatay hem de dikey yayılım gösterir (Ertürk, 2008). En önemli entomopatojenik protozoonlar *Microsporida* ordosunda yer alır. *Lepidoptera* ve *Diptera* ordolarına oldukça patojendirler (Klingen and Haukeland, 2006).

### 2.6.4. Nematodlar

Doğada kullanılan kimyasal pestisidlerin olumsuz etkisi olarak karşımıza çıkan, hedef zararlının yeniden daha dirençli bir şekilde ikinci bir salgın yapması, biyolojik mücadele ekosistemindeki mikrobiyal mücadele önlemlerine olan ilgiyi hayli artırmıştır. Böyle bir mücadele için entomopatojenik nematodlar zararlı böceklere karşı çok umut vericidir. Çünkü entomopatojenik nematodlar böcekler için öldürücü bitki ve hayvanlar için zararsız olduğu gibi, kalıntı ve yer altısuyu kontaminasyonuna neden olmazlar (Smart, 1995; Akhurst and Smith, 2002; Ehlers, 2005; Sezen, 2008).

Böceklere patojen olan 30'dan fazla nematod ailesi bilinmektedir. Entomopatojen nematod aileleri içerisinde üzerinde en fazla çalışılan *Heterorhabditidae* ve *Steinernematidae* familyalarıdır. Bu nematodlar zararlı böcekleri aktif bir şekilde bulup, enfekte edip öldürürler. Her iki nematod ailesinde de enfektif formlar üçüncü evredeki juvenil nematodlardır. Konağa böceğin doğal açıklıklarından (ağız, anüs ve spirakl) ya da bazı durumlarda doğrudan böceğin kutikulasını delerek girerler. Konaklarının ölümü ise nematodlarda simbiyotik yaşam süren bakterilerin toksinleriyle gerçekleşir (Glazer and Lewis, 2000; Stock and Hunt, 2005).

Nematodların, son zamanlarda böyle yoğun ilgi oluşturmasının en önemli sebebi, konak spektrumlarının çok geniş olmasıdır (Hazır et al., 2003b; Ramos-Rodríguez et al., 2007). Özellikle larva ve pupa evrelerini toprakta geçiren böcekler üzerinde yüksek patojeniteye sahiptir (Sezen, 2008).

### 2.6.5. Funguslar

Entomopatojen funguslara ilgi çok eski dönemlere dayanır. Lepidoptera larvalarını enfekte eden *Cordyceps* ilk olarak eski Çin’de belirlenmiştir. Funguslar tarihi süreçte Mısır, Roma, Yunan, Çin gibi eski medeniyetlerde tıbbi ve beslenme amaçlı kullanılmıştır (Demir, 2008). şimdilerde dahi entomopatojenik funguslardan tıbbi bileşikler izole edilip kullanılmaktadır (izelge 2.2)(Butt et al., 2001).

Çizelge 2.2. Farmasötik nemi olan biyoaktif bileşikler (Butt et al., 2001).

Bileşik	Kaynak	İşlevi
Swainsione	<i>M. anisopliae</i>	Metastas ve tümör büyümesini engeller
Cytochalsin C	<i>M. anisopliae</i>	Sitokinleri inhibe eder
SN-C (protein bağlayıcı polisakkarit)	<i>Cordyceps</i>	Antitümör aktivitesi vardır
Bassiatin	<i>B.bassiana</i>	Damar içinde trombosit birikimini engeller
Viridifungins	<i>Trichoderma viride</i>	Squalene synthetase aktivitesini inhibe eder
Zearalenone	<i>Fusarium spp.</i>	strojenik
Cyclosporin	<i>Tolypocladium spp.</i>	İmmnospresan

Böceklerdeki fungal hastalıklar, İtalyan Agostino Bassi' nin ipek böceklerindeki beyaz muskardin hastalığının fungal doğasını 1834-1835 yıllarında aydınlatmasından bu yana bilinmektedir (Hall and Papierok, 1982; Hansoylu, 2003; Zimmermann, 2007a).

Funguslar diğer böcek patojenlerine göre farklı bir özelliğe sahiptir. Doğrudan böceklerin kutikular bariyerlerinden girerler ve yenilmeye ihtiyaç duymazlar (Langewald et al., 2003; Shapiro-Ilan et al., 2003). Uygun çevresel koşullar verildiğinde funguslar zararlı böceklere karşı mükemmel biyolojik kontrol sağlarlar ama epizootik genelde zararlı populasyon yoğunluğu fazla olduğunda olur (Hall and Papierok, 1982; Hajek, 2004).

Entomopatojen funguslar, diğer patojenlere nazaran daha geniş böcek gruplarını enfekte ederler. Bunlar *Lepidoptera*, *Homoptera*, *Hymenoptera*, *Coleoptera* ve *Diptera* ordolarına dahil oldukça yaygın böceklerdir. Bu yüzden bazı funguslar dünyanın hemen her tarafına yayılmışlardır. *B. bassiana*, *M. anisopliae* ve *V. lecanii* adlı türler oldukça yaygındırlar (Deacon, 2005). Fakat bazı funguslar ise özel konak tiplerine sahiptirler. *Hirsutella thompsonii* sadece mite'lere enfektifdir (Demir, 2008). 400'den fazla entomopatojenik fungus türü bulunmaktadır (Hall and Papierok, 1982). Çizelge 2.3'de bazı önemli entomopatojen fungus cinsleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Önemli entomopatojenik fungus cinsleri (Demir, 2008)(Bu tablo entomopatojen fungusların tümünü içermez).

<b>Filum</b>	<b>Sınıf</b>	<b>Takım</b>	<b>Cins</b>
<b>Oomycota</b>	Oomycetes	Lagenidiales	<i>Lagenidium</i>
		Saprolengiales	<i>Atkinsiella</i> <i>Leptolegnia</i>
<b>Chytridiomycota</b>	Chytridiomycetes	Blastocladales	<i>Coelomomyces</i> <i>Catenaria</i>
		Chytridiales	<i>Myriophagus</i>
<b>Zygomycota</b>	Zygomycetes	Entomophthorales	<i>Basidiobolus</i> <i>Entomophaga</i> <i>Entomophthora</i> <i>Neozygites</i> <i>Sporodiniella</i>
	Trichomycetes	Amoebidiales	<i>Amoebidium</i>
<b>Deuteromycota</b>	Hyphomycetes	Moniliales	<i>Aspergillus</i> <i>Beauveria</i> <i>Fusarium</i> <i>Hirsutella</i> <i>Metarhizium</i> <i>Nomuraea</i> <i>Paecilomyces</i> <i>Verticillium</i>

Entomopatojen funguslar doğadan izole edilirken doğrudan enfekte olmuş bir kadavranın yüzeyinden spor örneklerinin alınmasıyla yapılabilir. Eğer sporulasyon ya da kutikula dışı hifal büyüme henüz olmamışsa, enfekte olmuş böcek, içerisinde nemli filtre kağıdı olan bir petri kabı içerisine alınır ve fungusun spor oluşturması beklenilir. Sporulasyon olduğunda böcek tamamen ya da üzerinden bir miktar örnek alınarak seçici besiyerlerine yerleştirilir (Butt and Goettel, 2000). Bazı entomopatojenik fungusların dolaylı yoldan topraktan izolasyonu ise ya canlı bir böceğin yem olarak kullanılmasıyla (*Galleria* tuzak yöntemi) ya da toprağın su ile seyreltilerek seçici besiyerlerine ekilmesi ile yapılabilir (Langewald et al., 2003; Meyling, 2007). Entomopatojenik fungusların

kültürasyonunda en çok kullanılan besiyeri Sabouraud's Dekstroz Agar (SDA)'dır. Ayrıca çeşitli vitamin, tuz, protein, lipid, farklı şeker ve maya ekstresi gibi katkı maddeleri ilave edilerek daha zengin içerikli besiyerleri de oluşturulmaktadır. Fungusların büyütülmesi için Malt Ekstrakt Agar (MEA), Patates Dekstroz Agar (PDA) ve bunlardan başka birçok farklı besiyeri de kullanılır (Abebe, 2002; Ali-Shtayeh et al., 2002). Birçok seçici besiyerine fungusit ve/veya antibiyotik eklenerek entomopatojen fungusların üremesi teşvik edilirken, diğer saprofitik fungusların ve bakterilerin üremesi engellenmiş olur (Butt and Goettel, 2000; Demir, 2008).

İzole edilmiş funguslar seri transfer, mineral yağ ve distile su altında saklama, silika jel, liyofilizasyon gibi tekniklerle saklanılabilir (Butt and Goettel, 2000; Demir, 2008).

Birçok entomopatojenik fungusun böcek hemosölüne girişi, hidrolitik enzimlerinin kombinasyonu ve mekanik gücün kullanılmasıyla gerçekleşir. Ancak bunu etkileyen birçok biyotik ve abiyotik faktör vardır. Bunlar arasında kuraklık, UV ışını, konak davranışı, sıcaklık, patojen özelliği, yaş vardır (Butt and Goettel, 2000; Demir, 2008; Zimmermann, 2007a; Zimmermann, 2007b).

Entegre kontrol sisteminde genelde konak özgüllüğü tercih edilmektedir. Konak özgüllüğü, bazı tür ve suşlarda özellikle *Beauveria bassiana* ve *Metarrhizium anisopliae*'de yüksek oranda gözlenmiştir (Hall and Papierok, 1982, Hansoylu, 2003).

Fungal patojenlerin virülansı ve ölçümü tartışmalıdır, laboratuvardaki ölçüm sistemlerinin arazide başarılı olmadığı bilinmektedir. Etkili doz düzeyleri genellikle yüksektir ve bazı deneylerin düşük dozlarla kurulması başarısızlıkların nedeni olarak gösterilmektedir. Böceğe bağlı değişmekle birlikte, etkili dozun 1 hektara  $10^{12}$ - $10^{14}$  konidiya olduğu belirtilmiştir (Wraight et al., 2001; Hansoylu, 2003).

Deuteromycet'lerin üretimi çok daha ucuzdur. Çok geniş konak spektrumuna sahiptir ve pek çok genel besiyeri üzerinde üreyebilirler. Bu özellikleri kitlesel üretimlerini oldukça kolaylaştırır. Günümüzde en yaygın olarak kullanılan fungal insektisit *Beauveria bassiana*'dır. Ayrıca *Metarrhizium* cinsi altında kayıtlı iki

fungus insektisit bulunmaktadır, bunlar; *M. anisopliae* ve *M. flavoviride*'dir (Padjama, 2001; Deacon, 2005; Demir, 2008).

## 2.7. Fungusların Biyolojik Mücadelede Kullanılmalarının Avantajları

- Bazı fungus patojenler çok geniş konak spektrumuna sahiptirler,
- Birçok böcek bir veya daha fazla fungus tarafından etkilenebilir ve bazı durumlarda funguslar yegane mikrobiyal kontrol ajanlarıdır,
- Funguslar genellikle konaklarının tüm gelişme fazlarını enfekte ederler ve bu nedenle herhangi bir uygun fazda kullanılabilirler,
- İnokülüm üretimi ve saklama problemlerinin üstesinden gelinebilir,
- Biyolojik mücadelede kullanılan funguslar, genellikle insan ve diğer omurgalılar için sağlık tehdidi oluşturmazlar,
- Fazla sporlanmayı takiben, konaklarının hızlı ölümlerine neden olurlar, bu nedenle uygun koşullarda çok zararlı epizootiklere neden olabilirler,
- Funguslar genel itibarıyla insektisitlerle birlikte kullanılırlar ve bazı hallerde onlarla sinerjistik olarak hareket ederler.

Ancak bu avantajların yanı sıra fungusların ciddi dezavantajları da vardır. UV ışınının ve desikasyonun fungus sporlarının üzerinde olumsuz etkileri vardır (Klingen and Haukeland, 2006). Fungusların neden olduğu epizootikler çevresel faktörlerden (sıcaklık, nem gibi) etkilenir (Santoro et al., 2008). Bitki hastalıklarının kontrolünde yaygın olarak kullanılan fungusitlere duyarlıdırlar (Demir, 2008).

## 2.8. Önemli Entomopatojen Fungus Grupları

### 2.8.1. Zygomycetes

Bu grup içerisinde en fazla böcek patojeni içeren takım *Entomophthorales* olup, yaklaşık 200 kadar tür içermektedir (Hall and Papierok, 1982; Scholte et al., 2004). Bu takım içerisinde de *Entomophthoraceae* ve *Neozygiteae* en önemli ailelerdir. Daha çok bitki üzerindeki böceklerde yaygın, konak aralıkları dar, bazı

istisna türler dışında sporlarının konaktan dağılması aktif ve virülanslarını az miktardaki konidiya ile gerçekleştirirler (Pell et al., 2001).

*Orthoptera*, *Homoptera*, *Dermaptera*, *Diptera* ve tropik bölgelerdeki *Hymenoptera*'ya patojendirler. Ayrıca *Entomophthorales*'in 20'den fazla türü tıbbi açıdan önemi olan böcekleri enfekte edebilmektedir (Hall and Papierok, 1982; Hansoylu, 2003).

### **2.8.2. Trichomycetes**

Zygomycota'ya ait olan bu sınıf 4 takım içerir. Sadece *Harpellales* takımında *Smittium* cinsi entomopatojen fungus içerir. Bu cinsteki funguslar sivrisineklere patojendir (Scholte et al., 2004). Trichomycetes Antartika dışında dünyanın tüm kıtalarında ve nerdeyse tüm habitatlarda gözlemlenmiştir (White et al., 2006).

### **2.8.3. Oomycetes**

Bu grup çok az entomopatojen fungus içerir. En önemli türü bir sivrisinek patojeni olan *Lagenidium giganteum* çok çalışılmış bir patojendir (Scholte et al., 2004) ve geniş bir coğrafik dağılıma sahiptir. Enfektif birimleri zoospordur. Konaklarına kutikuladan girebildiği gibi oral yoldan da girebilir (Hall and Papierok, 1982; Hansoylu., 2003).

### **2.8.4. Chytridiomycetes**

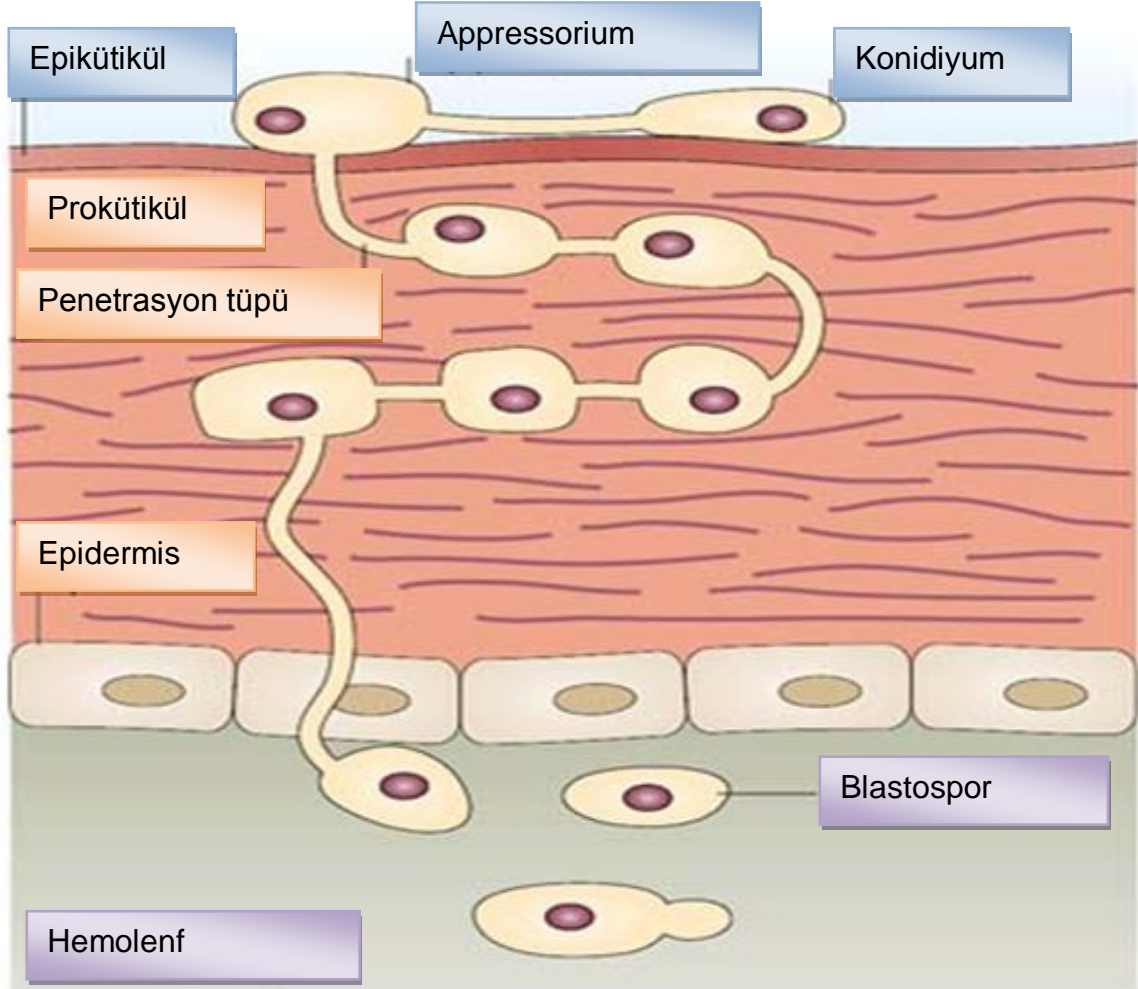
Blastocladales takımının içerisinde sadece bir cins entomopatojenik fungus türlerini içerir. *Coelomomyces* cinsi Antartika dışında tüm kıtalarda bulunur. Konak dağılımları diğer entomopatojen funguslara göre daha dar olup, akuatik Diptera'dan; *Culicidae*, *Psychodidae*, *Chironomidae*, *Simuliidae* ve *Tabanidae* ile sınırlıdır (Scholte et al., 2004).

### **2.8.5. Deuteromycetes**

*Deuteromycetes* (*Deuteromycotina*) içerisinde çok sayıda böcek patojeni vardır. Özellikle *Hyphomycetes* sınıfı içerisindeki *Aspergillus*, *Beauveria*, *Culicinomyces*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces*,

*Tolypocladium* ve *Verticillium* en yaygın olan cinsleridir. Sivrisinekleri de içeren çok geniş konak dağılımına sahiptirler (Inglis et al., 2001; Scholte et al., 2004).

Bu fungusların doğadaki enfektif birimleri konidiasporlardır. *Deuteromyces*'e dahil entomopatojen fungusların yaşam döngüleri karmaşık değildir (Hall and Papierok, 1982; Charnley, 1991; Scholte et al., 2004).



Şekil 2.8. Enfeksiyon yolu (Thomas and Read, 2007).

Bir mikosis hastalığının gelişmesi için önkoşul bir fungal spor ile konağının karşılaşmasıdır. Birçok entomopatojenik fungus ile konağının karşılaşması rastgele olur. Yani şansa bağlıdır. Konakla fungusun karşılaşma şansı çevre koşullarına, çevredeki fungal spor miktarına ve zararlı böcek populasyon yoğunluğuna bağlıdır (Samson et al., 1988).

Fungus sporları uygun bir böcek kutikulası ile karşılaştığında çimlenir ve penetrasyon yapıları oluşturur (germ tüpü, appressorium) (Deacon, 2005). Şekil 2.8'de bir konidiyanın enfeksiyon yolu gösterilmiştir. Ancak bazen sporun çimlenmesi gerçekleşse bile kutikulaya penetrasyon olmayabilir. Uygunsuz çevre koşulları (nem gibi) ve/veya kutikuladaki melanin ya da yağ asidi gibi inhibitörlerin varlığı, çimlenmeyi olumsuz etkiler (Inglis et al., 2001). Çimlenme, patojeniteyi ya da virülansı aktif olarak etkileyen enfeksiyon işleminin ilk adımlarından birisidir. Yüksek virulansa sahip suşlar düşük olanlara nazaran daha hızlı çimlenirler (Xavier-Santos et al., 1999).

Kutikulaya penetrasyon için entomopatojen funguslar enzimlerden ve mekanik etkilerden faydalanırlar. Ekzoproteaz enzimlerinin üretimi *M. anisopliae* ve diğer funguslar için kutikulaya penetrasyonda önemlidir. Bunun yanında endoproteaz, esteraz, lipaz, kitinaz ve kitobiaz gibi enzimler de önemlidir. Fungus birkez hemosöle ulaştığında tek ya da çok hücreli, gerçek bir hücre duvarından yoksun ancak plazma zarının üstünde ince, fibriler bir tabakası olan hifal yapılar olarak gelişir. Funguslar böceğin hemosölünde hızla çoğalmadan önce böceğin bağışıklık sisteminin üstesinden gelmelidir. Böcekler fungal istilaya karşı cevap olarak humoral (fenoloksidaz, lektinler, konak defans proteinleri) ve/veya hücrenel (fagosit ya da sarmalama) cevap verir. Bazı türlerin hifal yapıları (*Nomuraea rileyi* gibi) kendilerini tanımlayan özel yüzey yapılardan yoksundurlar. Dolayısıyla böceğin bağışıklık hücreleri fungusu tanıyamaz. Böceğin ölümü besin depolarının tükenmesi, böcek organlarının tıkanması ve toksikosis ile olur. Böceğin ölümünün ardından fungus kadavra içerisinde saprofitik bir şekilde ürer ve rekabetçi diğer fungusların ve bakterilerin üremesini engellemek için çeşitli metabolitler üretir. Uygun koşullar olduğunda kadavradan hifal yapılar çıkar, konidiyagenesis hücreleri üretilir ve sporulasyon olur. Konidiyaların dağılımı ise pasif bir şekilde rüzgar, yağmur gibi olaylarla olur (Inglis et al., 2001; Deacon, 2005).

*Metarhizium* ve *Beauveria* cinsleri çok geniş coğrafik dağılım ile, ekonomik ve tıbbi önemi olan böcekleri de içeren geniş konak aralığına sahip olmaları yüzünden çok iyi bilinen cinslerdir (Hall and Papierok, 1982; Zimmermann, 2007a; Zimmermann, 2007b).

## 2.9. Biyolojik Kontrol Ajanı Olarak *Beauveria spp.* ve *Metarhizium spp.*

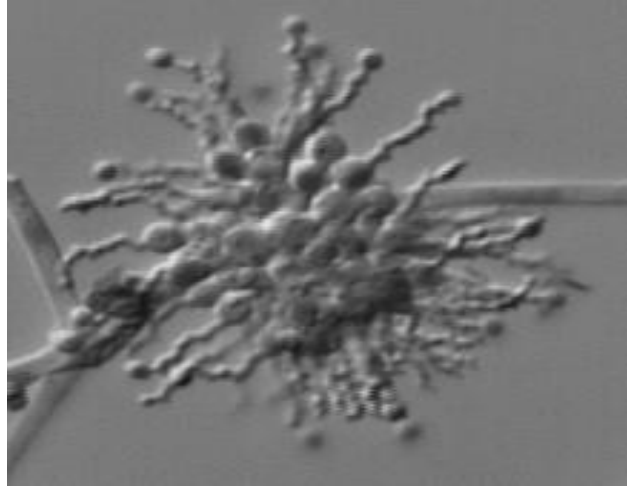
Entomopatojenik fungus türü olan *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin ve *B. brogniartii* (Saccardo) Petch ilk kez sırasıyla 170 ve 110 yıl önce tanımlanmışlardır. O zamandan beri bu iki türün zararlı böceklerin kontrolünde kullanılması her zaman düşünülmüştür. *B. bassiana* ve *B. brogniartii*'nin yanı sıra *M. anisopliae* dünyada en fazla kullanılan mikoinsektisitlerden birisidir (Zimmermann, 2007a).

*B. bassiana*'nın tarihi 1835 yılında başlamıştır (Zimmermann, 2007a). İtalyan araştırmacı Agostino Bassi di Lodi fungusların böceklerde hastalık yapabileceğini göstermiştir (Zimmermann, 2007a; Webster and Weber, 2007). Böylelikle hastalığın germ teorisini açıklamıştır. Beyaz muskardin olarak isimlendirdiği hastalığı bir ipek böceği türü olan *Bombyx mori*'de gözlemlemiş ve ilk enfeksiyon deneylerini başlatmıştır. Bu fungus 1835 yılında ünlü İtalyan doğa bilimcisi Giuseppe Gabriel Balsamo-Crivelli tarafından çalışılmış ve isimlendirilmiştir (Zimmermann, 2007a). *M. anisopliae* böceklerde yeşil muskardin hastalığına sebep olurlar. Üç farklı varyeteye sahiptirler. Bunlar; *M. anisopliae var. anisopliae*, *M. anisopliae var. acridum*, *M. anisopliae var. major*'dur (Webster and Weber, 2007). *M. anisopliae* ilk olarak Metschnikoff (1879) tarafından *Anisoplia austriaca* adlı böcekten izole edilmiş ve *Entomophthora anisopliae* olarak adlandırılmıştır. Daha sonra Sorokin tarafından yeni bir cins olan *Metarhizium*'a transfer edilmiştir (Zimmermann, 2007b).

*B. bassiana* bu cinsin türleri içerisinde en yaygın olanıdır (Zimmermann, 2007a; Webster and Weber, 2007). Dünyanın ılıman ve tropikal bölgelerinin her tarafında enfekte olmuş böceklerin üzerinde bulunurlar. *B. brogniartii*, *B. bassiana*'ya göre daha az yaygındır. *B. bassiana* hemen her yerde olan bir fungus olup farklı takımlardaki çok sayıda böcekten izole edilmiştir. *B. bassiana*, *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Diptera*, *Hemiptera*, *Orthoptera*, *Siphonaptera*, *Isoptera*, *Thysanoptera*, *Mantodea*, *Neuroptera*, *Dermoptera*, *Blattariae* ve *Embioptera*'ya patojendir. *M. anisopliae* arktik bölgelerden tropik bölgelere kadar çok geniş bir coğrafik dağılıma sahiptir. Bu kadar geniş bir dağılıma sahip olduğu gibi enfekte ettiği konak aralığı da fazladır.

Ama *B. bassiana*'ya göre konak aralığı biraz sınırlıdır (Zimmermann, 2007b). *M. anisopliae* var. *anisopliae* geniş bir konak aralığına sahip olup, *Coleoptera*, *Orthoptera*, *Hemiptera* ve *Hymenoptera* ayrıca *Arachnida*'ya patojendir. *M. anisopliae* var. *major*'un ise daha sınırlı bir konak aralığı olup çoğunlukla toprakta yaşayan scarabid böceklerini enfekte ederler (Daecon, 2005; Webster and Weber, 2007).

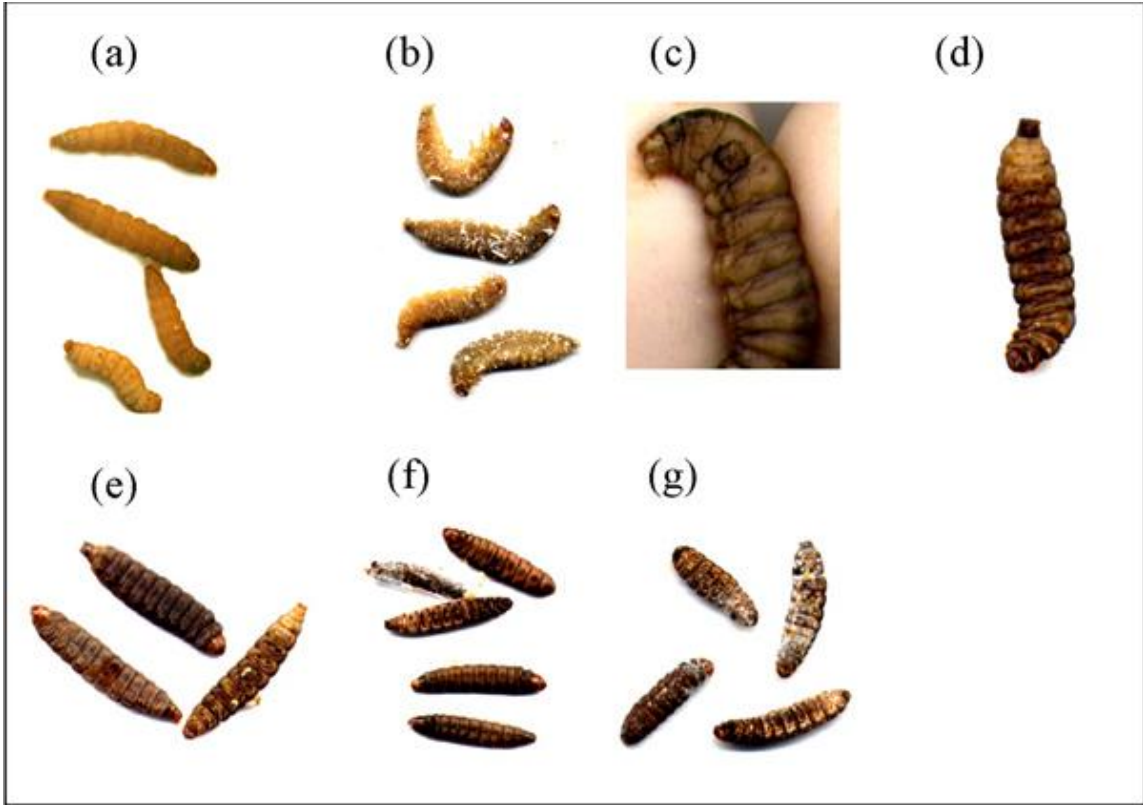
*B. bassiana*, beyaz ardından sarımsı ya da kırmızımsı kolonileriyle karakterize edilir. Koloninin altı ise renksiz ya da sarımsıdan pembemsiye değişir. Konidiyajen hücreleri (Şekil 2.9.)(konidiya üreten hücreler) globoz ya da şişe şeklinde ve çoğunlukla zig-zag'lı bir yapı oluşturan 20 µm uzunluğunda rachis'e sahiptir. Konidiyalar kartopları gibi kümeler halinde oluştururlar (Zimmermann, 2007a).



Şekil 2.9. *B.bassiana* konidiyajen hücreleri  
(<http://arsef.fpsnl.cornell.edu/pictures/beauveria2.gif>)

Beauveria türlerinin enfeksiyon yolu;

1. Sporun kütiküle tutunması,
2. Çimlenme,
3. Kütiküle penetrasyon,
4. Konağın bağışıklık sisteminin üstesinden gelinmesi,
5. Konak içerisinde hifal yapıların ya da blastosporların üretilmesi,
6. Ölü konakta saprofitik üreme ve yeni konidiyaların üretilmesi.



Şekil 2.10 *B. bassiana* ile enfekte olmuş *Galleria* larvaları, a) Sağlıklı larvalar b) etrafları sporla kaplanmış larvalar c) 72 saat sonra ilk enfeksiyon belirtileri (melanizasyon) d) koyulaşmış fakat hala yaşayan larva e), f) 120 ve 144 saat sonraki ölü larvalar g) 2 hafta sonra ölü larva yüzeylerinden çıkmış sporeler (Wojda et al., 2009).

*B. bassiana* ile enfekte olduktan sonra *G. mellonella* larvalarında meydana gelen değişimler Şekil 2.10'da gösterilmiştir.

*M. anisopliae* türündeki enfeksiyon yolu da diğer entomopatojen funguslarda olduğu gibidir. Tutunma konidiya ile konağın kutikulası arasındaki hidrofobisite ilişkileri ile olur. Çimlenme ve başarılı enfeksiyon birkaç faktöre bağlıdır. Bunlar; duyarlı konak, konağın fazı (larva, ergin gibi) ve çevre faktörleridir. Çimlenme ayrıca konağın yüzeyinde bulunan metabolitlerden (protein, yağ asidi gibi) de etkilenir. *B. bassiana*'da çimlenme 20-25 °C'de yaklaşık 10. saatten sonra başlar ve çoğunlukla 20 saat içerisinde tamamlanır. Genellikle penetrasyon kutikulanın daha ince bölgelerinden ya da ağız parçalarından olur. Konaklarının ölümü böceğin besin depolarının tüketilmesinden ve toksinlerinden (Çizelge 2.4) kaynaklanır (Zimmermann, 2007a).

Çizelge 2.4. *B. bassiana* tarafından üretilen bazı toksinler ve görevleri (Deacon, 2005; Demir, 2008).

<b>Toksin</b>	<b>Üretici Fungus</b>	<b>Genel Aktivitesi</b>
Beauverisin	<i>B. bassiana</i> <i>Paecilomyces</i> <i>Fusarium</i>	İyonofor, hücre zarı geçirgenliğini artırır. Bu sayede hücre ve organel fonksiyonları zarar görür.
Bassianolid	<i>B. bassiana</i>	İyonofor
Siklosporin A	<i>B. bassiana</i> <i>Verticillium</i> <i>Fusarium</i>	Böcek savunma hücrelerine baskı yapabilir.
Oosporsin	<i>B. bassiana</i>	Kırmızı pigment, antimikrobiyal

*B. bassiana* için optimum üreme sıcaklığı 23-28 °C, minimum 5-10 °C, maksimum 30-38 °C dir. Çimlenmenin olması için gerekli olan bağıl nem %92-100 arasındadır (Zimmermann, 2007a).

*Beauveria* türlerinin omurgalılara karşı toksik ve bulaşıcı olmadığı kanıtlanmıştır ancak bazı istisnai durumlarda söz konusudur. *B. bassiana*'nın havada doğal olarak bulunduğu bilinmektedir. MacLeod adlı araştırmacının raporuna göre 14 kemirgen hayvanın akciğer dokusunda *B. bassiana*'ya rastlanmış ancak yapılan histolojik incelemeler sonucunda fungusun dokulara patojenik bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. *B. bassiana*'nın insanlarda alerjik reaksiyonlara sebep olduğunu gösteren bazı kayıtlar vardır. Müller-Kögler bu türlerin üretildiği yerlerdeki insanlarda meydana gelen alerjik reaksiyonların bu türlerden kaynaklandığını bahsetmiştir. Aynı zamanda *B. bassiana* insanlarda mikotik keratitis hastalığının nedeni olarak da rapor edilmiştir (Zimmermann, 2007a).

*B. bassiana* ve *M. anisopliae* gibi entomopatojenik fungusların geniş konak dağılımına sahip olmaları, laboratuvar koşullarında üretilmeleri ve çok fazla spor üretmeleri onları zararlı böceklerle mücadelede çekici hale getirmiştir. ABD, Avrupa ve Güney Amerika'da satılan en az üç çeşit *B. bassiana* suşu vardır. *B. bassiana*'nın Rusya'da 70'den fazla mahsul üzerinde kullanıldığı rapor edilmiştir (Daecon, 2005; Demir, 2008).

## **2.10. Büyük Mum Güvesi *Galleria mellonella***

Ülkemizde koloni başına bal verimliliğinin dünya ortalamasından düşük olmasında bal arısı parazit ve zararlıları önemli bir yer tutmaktadır. Genelde üretimin bal ve balmumu üzerine yoğunlaştığı ülkemizde 4.700.000 adete yakın koloniden yaklaşık 75.000 ton bal ve 3.483 ton balmumu üretilmektedir. Arıcıların petek muhafazasında yeterli bilgi ve bilince sahip olmaması, mum işleme teknolojisindeki eksiklikler; kabartılmış peteklerinin yıllarca kullanımına, mum üretiminin düşmesine ve peteklerin korunma sorunlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Ülkemizde özellikle sıcak ve ılıman bölgelerde kabartılmış petek ve balmumunun büyük mum güvesinden korunması önem arz etmektedir. *Galleria mellonella* (Şekil 2.11), bal arılarının (*Apis mellifera* L.) ekonomik zararlılarından olup arıcılık yapılan ve özellikle de düşük rakımlı, ılıman iklim

kuşağında bulunan tüm bölgelere yayılmış durumdadır. Balmumu güvesinin ergin veya diğer evreleri peteklerde bir tahribata neden olmazken larvaları petekler için özellikle de karanlık, sıcak ve havalandırması yetersiz ortamlarda depolanan peteklere büyük zararlar vererek arıcılık sektöründe önemli ekonomik kayıplara neden olurlar. Ülkemizde mevcut 4.700.000 kadar koloninin yaklaşık 600.000 adedinin bu zararlı ile farklı yoğunluklarda bulaşık durumda olduğu bildirilmektedir (Akyol ve Korkmaz, 2008).

Büyük balmumu güvesi (kovan güvesi), *Galleria mellonella* L. Lepidoptera ordosu, Pyralidae familyasına mensup ekonomik yönden zararlı bir türdür (Kalyoncu ve ark., 2005).

Arıcılar tarafından iyi bilinen bu zararlı kelebek, kozmopolit bir türdür ve arı bulunan her yerde yaşar. Dişileri, yumurta bırakmak için, akşam karanlığında arı kovanlarına girerler. Yumurtalarını kovandaki yarık ve çatlaklara bırakır. Yumurtalar pembemsi krem veya beyazımtırak renkte olup, boyu eninden biraz uzun ve yaklaşık 0,5 mm'den biraz küçüktür. Normal koşullarda (24-26 °C) bu yumurtalardan 5-8 gün içerisinde larvalar çıkar. Yeni çıkan larva ipeksi yapıdan oluşan bir tünel içerisinde peteğin taban kısmına doğru ilerlemeye başlar. Sıcaklık ve besin varlığına bağlı olarak 1-5 ay arasında beslenir ve büyür. Larvalar özellikle polen yanında arı larvası gömlekleri ve dışkı ile beslenir. Bu arada bal mumu da yer. Ancak, sadece balmumu ile beslenen larvalar gelişimini tamamlayamazlar. Koyu ve eski petekler pek çok arı larva kalıntısı içerdiğinden büyük mum güvesi zararı açısından oldukça risklidir. Larvanın gelişmesi için en uygun sıcaklık 30-35 °C olup, 4-5 °C arasında beslenme ve gelişme olmaz. Larva uyuşuk uyku halinde kalır. Larva gelişimini takiben bir koza örür. Dişiler kozadan çıktıktan 4-10 gün sonra yumurtlamaya başlar. Bir kerede 100 yumurta yapabilirler. Yaptığı yumurta sayısı 300-600 arasında değişir. Erginler, 3-30 gün yaşarlar. Çiftleşen dişilerin büyük kısmı genellikle 7 gün içinde ölürler (Tutkun ve Boşgelmez, 2003; [www.etae.gov.tr/yayin-ek/ciftci-bro/131-ciftcibro.pdf](http://www.etae.gov.tr/yayin-ek/ciftci-bro/131-ciftcibro.pdf)).

Sağlıklı aktif kolonilerde mum güvesi zararı, işçi arılar tarafından etkili bir şekilde kontrol edilmekte ise de; anasız kolonilerde ve pestisit ya da hastalıklara maruz kalarak zayıflamış kolonilerde, büyük kayıplar meydana getirmektedir. En ağır

kayıplar ise kış ayları süresince depolanmış peteklerde görülmektedir (Kaygın ve Yıldız, 2006).



Şekil 2.11. a) *Galleria mellonella* larvası b) Ergin *Galleria mellonella* (Kaygın ve Yıldız, 2006).

Ekonomik yönden zararlı çeşitli holometabol *Lepidopter* larvalarına karşı kullanılan kimyasal mücadelenin yarattığı ekonomik yük, çevre kirliliği, ekolojik dengenin bozulması gibi sorunlar, bunların verdiği zararları yok etmek için biyolojik mücadele çalışmalarını ön plana çıkarmıştır (Kalyoncu ve ark., 2005). Biyolojik mücadele yöntemi olarak bakteri, fungus ve virüslerden faydalanılabilir (Kaygın ve Yıldız, 2006).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada Türkiye topraklarından toplam 180 toprak örneği alınmış ve bu topraklardan *Galleria* tuzak yöntemi ve toprak seyreltme yöntemleriyle entomopatojen olabileceği düşünülen 49 fungus örneği elde edilmiştir. Bunların arasından *Beauveria spp.* ya da *Metarhizium spp.* olabileceği düşünülen türler seçilerek bu örneklerin tanımlanmaları için çalışmalar yapılmıştır.

#### 3.1. Toprak Örneklerinin Toplanması

Entomopatojen fungus izolasyonunda kullanılacak toprak örnekleri 2007-2008 yılının Mayıs ve Ağustos ayları arasında toplanmıştır. Toprak örneklerinin alındığı noktalar rastgele seçilmiştir (Asensio et al., 2003). Yaklaşık 1 kg'lık toprak örnekleri; ekili alanlardan, çayırılık kesimlerden ve orman zemininden toplanmıştır. Toprak örneklerinin alımında yüzeyden başlayıp 5-20 cm'lik derinliğe kadar olan bölgeler tercih edilmiştir (Stock et al., 1999; Ali-Shtayeh et al., 2002; Keller et al., 2003; Kessler et al., 2004). Örneklerin alınımı esnasında kullanılan alet, her toprak alınımından sonra % 70'lik etil alkol ile steril edilmiştir. Toprak örneklerinin alındığı bölgelerin adı, vejetasyon tipi ve toprak ısı gibi değerlerin kaydedildiği etiketleme işleminin ardından toprakların kurummasını önlemek için örnekler plastik torbalar içine alınmıştır (Hazır et al., 2003a).

#### 3.2. Kullanılan Denek *Galleria mellonella* (Lepidoptera) (Büyük mum Güvesi)

Çalışmada kullanılan *Galleria mellonella* (Lepidoptera) larvalarının üreme ve gelişimleri için uygun ortam olan 27 °C sıcaklık ve karanlığın sağlandığı laboratuvarda, cam kavanozların içerisinde ve yapay besi ortamında gerçekleştirilmiştir. Larvalar yumurtalarından çıkmalarından 4 hafta sonra 4. evre *Galleria* larvaları tuzak yöntemi için kullanılmıştır. Tuzak yöntemi sırasında larvaların pupa yapmalarının engellenmesi için 56 °C'ye kadar ısıtılmış 500 ml'lik su içerisinde bekletilmiş ve inaktivasyonları gerçekleştirilmiştir (Meyling, 2007).

### **3.3. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar**

#### **3.3.1. Sabouraud dextrose agar (SDA+Yeast Extract)**

% 1 oranında maya özütü ilave edilmiş olan SDA (Merc) ortamı (SDAY), 120 °C'de 1 atm basınç şartlarında 20 dakika otoklavda steril edilmiştir (Hansoylu, 2003). Bu besiyeri fungusların spor üretmeleri için kullanılmıştır.

##### **3.3.1.1. SDA Seçici Besiyeri (Veen's medium)**

Entomopatojenik funguslar topraktan izole edilirken toprak bakterilerinin üremesine karşı etkili geniş spektrumlu bir antibiyotik olan Chloramphenicol; 50 µg/ml ve Actidone (cyclohexamide) 250 µg/ml oranında ilave edilerek seçici özellikte bir besi ortamı oluşturulmuştur ve çözelti 120 °C ve 1 atm basınç şartlarında 20 dakika otoklavda steril edilmiştir (Veen and Ferron, 1966; Goettel and Inglis, 1997).

##### **3.3.1.2. SDA Seçici Besiyeri**

*Galleria* tuzak yönteminde entomopatojen olduğu düşünülen funguslarla enfekte olan larvalar yüzeyinden alınan örnekler, içerisinde 1 ml Dodine (9 ml distile su içerisinde 1 g dodine çözülerek hazırlanmış çözülden) ve 500 µl Chloramphenicol (10 ml %96' lık etanol içinde 1 g chloramphenicol çözülerek hazırlanmış çözülden) SDA besiyerine ilave edilerek hazırlanmış ortama ekilmişlerdir (Meyling, 2007).

##### **3.3.1.3. SDA Seçici Besiyeri (Modifiye)**

0,46 g/l Dodine ve 5 mg/l Chlortetracycline SDA besiyerine ilave edilerek *Beauveria* ve *Metarhizium* için seçici ortam oluşturulmuş ve diğer saprofitik fungus örnekleri arasından eliminasyon yapılması amacıyla kullanılmıştır (Chase et al., 1986; Safavi et al., 2007). Bu besiyeri yulaf unu agar besiyerinin modifiye edilmiş halidir. Bu ortama *Galleria* tuzak yönteminde entomopatojen olduğu düşünülen funguslarla enfekte olan larvalar yüzeyinden alınan örnekler ekilmiştir.

### 3.3.2. Potato dextrose agar (PDA)

PDA (Merc) entomopatojen fungusların spor (konidiya) üretmeleri ve izole edilen entomopatojen fungusların saklanması amacıyla kullanılmıştır (Abebe, 2002; Kamp and Bidochka, 2002).

### 3.3.3. Malt extract agar (MEA)

15 g malt özütü ve 15 g agar 500 ml kaynatılmış distile suda çözülmüştür. Daha sonra içerisine bakteriyel üremeyi inhibe etmek için 1 g/l chloramphenicol eklenmiştir. Son çözelti 120 °C'de 1 atm basınç şartlarında 20 dakika otoklavda steril edilmiştir. Bu besiyeri fungusların tür tanımlanmasında kullanılmıştır.

### 3.3.4. *Galleria mellonella* üretiminde kullanılan yapay besi ortamı

- ❖ % 22 buğday kepeği,
- ❖ % 22 buğday unu,
- ❖ % 11 süt tozu,
- ❖ % 5,5 kuru ekmek mayası,
- ❖ % 17,5 bal mumu,
- ❖ % 11 bal,
- ❖ % 11 gliserin

Bu maddeler belirtilen oranlarda karıştırılarak *Galleria mellonella*'nın besi ortamı oluşturulmuştur (Vilcinskas et al., 1997a; Vilcinskas et al., 1997b; Hansoylu, 2003).

### 3.3.5. Tween 80

Spor solüsyonları hazırlanırken ve sporlar suya alınırken Tween 80 (Merc) kullanılmıştır.

### 3.3.6. Laktofenol

Aşağıdaki maddelerin karıştırılmasıyla hazırlanan laktofenol preparat yapımında kullanılmıştır (Humber, 1998).

- ❖ 20 g fenol
- ❖ 20 g laktik asit
- ❖ 40 g gliserol
- ❖ 20 ml distile su

### 3.4. İzolasyon

#### 3.4.1. *Galleria* tuzak yöntemi ile izolasyon

Bu yöntem ilk olarak toprakta bulunan entomopatojen nematodların izolasyonu için geliştirilmiştir ancak bu yöntemle entomopatojen fungusların izolasyonu da sağlanmaktadır (Zimmermann,1986). Bu yöntemde kullanılacak böcekler kolayca üretilen ve funguslara duyarlı böcekler tercih edilmelidir. Bu amaçla kullanılan en önemli böcek türü büyük balmumu güvesi *Galleria mellonella* (*Lepidoptera: Pyralidae*)' dir (Meyling, 2007). Entomopatojen fungusların gözlemlenmesinde, toprak örneklerinin *Galleria* larvalarıyla yemlenmesi çok yaygın bir şekilde kullanan bir araçtır (Chandler et al., 1997; Klingen et al., 2002; Keller et al., 2003; Meyling and Eilenberg, 2006).

Araziden elde edilen toprak örnekleri çok fazla bekletilmeden 250 ml hacimli plastik kaplar içerisine alınmıştır. Kuru toprak örneklerine; entomopatojen fungusların nemli koşullarda daha iyi enfekte ettiği düşünülerek, distile su eklenmiştir. Hazırlanan her bir toprak örneğine 5'er adet inaktive edilmiş 4. evre *Galleria* larvası konulmuş ve plastik kapların ağzı kapatıldıktan sonra larvalar toprağın altında kalacak şekilde ters çevrilmiştir (Mietkiewski et al., 1997; Zimmermann, 1998; Sonia et al .,2005)

Deneye alınan örnekler 20-25 °C'de, oda sıcaklığında tutulmuştur (Hughes et al., 2004). Larvaların enfekte olup olmadığını görmek için 3'er gün arayla toplam 15 gün boyunca topraklar kontrol edilmiştir (Dhoj GC et al., 2008).

Enfekte olduğu düşünölen larvalar topraktan alınmış yüzey sterilizasyonunun sağlanması amacıyla kadavra %1'lik sodyum hipoklorit içerisinde 2-3 dakika süreyle bekletilmiş ardından distile su ile yıkanmıştır (Chandler et al., 1997; Bidochka et al., 1998; Lezama-Gutierrez et al., 2001; Quesada-Moraga et al., 2007). Daha sonra larvalar içerisinde nemli filtre kağıdı konulmuş ve steril petri kaplarına aktarılmıştır (De La Rosa et al., 2000). Her gün yapılan kontrollerle larvaların ölüm nedeninin fungus olup olmadığı araştırılmıştır (Bello et al., 2000). Aynı zamanda entomopatojen fungusların yüksek nem ihtiyacı nedeniyle petrideki filtre kağıdına düzenli aralıklarla distile su eklenmiştir (Vänninen et al., 1989, 1999; Saharayaj and Namasivayam, 2008). Kadavralar üzerinde funguslar sporlanmaya başlayınca, buradan alınan örnekler özeyle entomopatojen funguslar için hazırladığımız seçici besiyerlerine ekilmiştir (Vänninen et al., 1989).

#### **3.4.1.1. Saf fungus kültürlerinin elde edilmesi**

Entomopatojen fungusla enfekte olduğu düşünölen larvalar üzerinden steril öze yardımı ile alınmış sporlar SDA+Dodine+Chloramphenicol ortamına ekilmiş ve 26°C ± 2°C'lik etüvde inkübasyona kaldırılmıştır. 7-14 günlük inkübasyondan sonra toprak bakterilerinden ve saprofitik funguslardan arınmış entomopatojen fungus kültürleri elde edilmiştir (Oudor et al., 2000; Padmaja et al., 2001).

#### **3.4.2. Toprak seyreltme yöntemi ile izolasyon**

Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden toplanan toprak örneklerinden 1'er gram alınarak içinde 10 ml distile su bulunan her bir steril test tüpüne eklenmiştir. Her bir test tüpü 20 saniye çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Ardından karışımdan 1 ml alınarak içerisinde 9 ml distile su bulunan test tüplerine eklenmiştir ve böylece 10 kez seyreltme sağlanmıştır (Hu and Leger, 2002).

Daha sonra her bir test tüpünden alınan 0,5 ml miktarındaki karışım Veen's Medium seçici besiyerine eklenmiş ve steril L cam çubuk yardımı ile yayılmıştır. Besiyerleri 26°C ± 2°C 14 gün boyunca fungal gelişime bırakılmıştır. Daha sonra besiyerlerde üreyen *Beauveria spp.* ve *Metarhizium spp.* olabilecek örnekler SDAY besiyerine ekilerek saf kültür elde edilmeye çalışılmıştır (Shimazu et al., 2002).

### **3.5. Deney Suşlarının Seçilmesi**

Her iki yöntemle izole edilen fungus örnekleri; ilk aşamada SDAY besi ortamındaki koloni özelliklerine göre seçilmeye çalışılmıştır. Bu besiyerinde üreyen *Beauveria bassiana* ve *Metarhizium anisopliae* olabilecek türlerin koloni özellikleri göz önüne alınarak bu özellikleri sağlamayan örnekler elimine edilmiştir. *Beauveria bassiana* kolonilerinin rengi önce beyaz sonra sarımsı pembemsi (Hasenekoğlu, 1991; Zimmermann, 2007a), *Metarhizium anisopliae* kolonilerinin rengi ise sarıdan yeşile ya da koyu bitki yeşilinden pembeye doğrudur (Abebe, 2002).

#### **3.5.1. Saprotik fungus örneklerinin elimine edilmesi**

Seçilmiş olan örnekler arasından entomopatojen olanların ayırt edilebilmesi için funguslar PDA içeren petrilere ekilmiştir. Kültürler spor üretebilmeleri için 14 gün süreyle 27 °C' de inkübe edilmiştir (Kamp and Bidochka, 2002). Ardından bu kültür ortamlarına 5'er adet *Galleria* larvası bırakılmış ve larvaların petrilere belirli bir süre gezinmeleri beklenerek üzerlerine spor almaları sağlanmıştır (Butt and Goettel, 2002). İkinci aşamada bu larvalar kültür ortamından alınarak, içlerine steril filtre kağıtları konulmuş petri kaplarına alınmıştır (Vänninen et al., 1999). Kurutma kağıtları steril distile suyla nemlendirilerek fungus üremesi için gerekli nem sağlanmıştır (Studdert and Kaya, 1990a). Larvaların durumu her gün gözlemlenip ölüm nedeninin fungus olup olmadığı kontrol edilmiştir. Larvaları enfekte eden funguslardan entomopatojen fungus olduğu düşünülenler not edilerek diğerleri elimine edilmiştir.

#### **3.5.2. Entomopatojen fungus olabilecek örneklerin belirlenmesi**

Entomopatojen olabileceği düşünülen funguslar bu kez onlar için geliştirilmiş olan SDA+Dodine+Chlorotetracycline içeren besiyerlerine ekilmiş ve 27 °C' de 7 günlük inkübasyondan sonra entomopatojen fungus olanların üremesi sağlanmıştır (Chase et al., 1986; Goettel and Inglis, 1997).

#### **3.5.3. Preparat hazırlanması ve mikroskopik inceleme**

*Beauveria spp.* ve *Metarhizium spp.* olabileceği düşünülen fungus suşları SDAY ortamına ekilerek inkübe edilmiş ve preparatları yapıp mikroskop incelemesine

alınmıştır (Hasenekoğlu, 1991). Bu incelemede sözü edilen fungusların en belirgin birkaç anahtar özelliği göz önüne alınarak entomopatojen fungus olmayanların elimine edilmesine çalışılmıştır.

Preparat hazırlanırken fungusun üremiş olduğu kültür ortamından steril öze yardımı ile çok az miktarda fungus örneği alınmıştır. Ardından daha önceden hazırlanmış laktofenol solüsyonu lamın üzerine küçük bir damla halinde damlatılmış ve alınmış örnek bunun üzerine bırakılmıştır. Öze ucuna alınmış örnekteki besiyeri parçaları da bek alevi üzerinde çok yaklaştırmadan ısıtılıp besiyerinin erimesi ve fungusun yapısını kaybetmeden lam üzerine yayılması sağlanmış, daha sonra üzerine, bir lamel kapatılarak mikroskopta inceleme yapılmıştır.

Hazırlanan preparatlarda *Beauveria spp.* cinsi için; en karakteristik özellikleri olduğu belirtilen, taban kısmı globoz veya biraz şişe şeklinde şişkin sporojen hücreler, uçlarında uzun ve dar salkımlar ve salkımlarda küçük şeffaf sporların oluşturduğu kümeler, *Metarhizium spp.* cinsi için ise; konidiyaforlar yoğun paketler halinde, tekil olarak genişçe dallanmış, yoğun bir şekilde birbirine geçmiş, konidiya aseptat, silindirik ya da ovoid, konidiyaların oluşturduğu zincirler, silindirik ya da prizmatik diziler halinde gözlenmeye çalışılmıştır (Hasenekoğlu, 1991; Humber, 1998).

### **3.6. Türlerin Teşhisi**

İzole edilen ve seçici ortamda üreyen funguslar arasından *Beauveria spp.* ve *Metarhizium spp.* olabileceği düşünülen örnekler kesin olarak tür teşhislerinin yapılması için ayrılmışlardır. Tür teşhisleri Ege Üniv.'den Yrd. Doç. Dr. Alev Haliki tarafından yapılmıştır.

### **3.7. Kullanılan Deney Suşları**

Yapılan tüm deneyler sonucunda Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden elde edilen entomopatojen fungus türlerinden sadece 48'i *Beauveria bassiana* ve 1'i *Beauveria brongniartii* olarak teşhis edilmiştir. Tip tür ile karşılaştırmak istenen 48 örnek *Galleria* larvalarına uygulanmış etkinliği en iyi olan 10 örnek seçilmiştir.

Bu örneklerin alındığı yerler ve örneklerin alınmış olduğu vejetasyon tipleri Çizelge 3.1’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneyleerde kullanılan *Beauveria bassiana* izolatlarının elde edildiği toprak örneklerinin alındığı yerler ve vejetasyon tipleri.

	<b>Suşun kodu</b>	<b>Örneğin alındığı yer</b>	<b>Örneğin alındığı yerin vejetasyon tipi</b>
<b>1. Suş</b>	DenK1	Denizli-Kocabey	Ekili alan
<b>2. Suş</b>	SB1(b)	Ankara-Beytepe	Çayırılık alan
<b>3. Suş</b>	Ank12	Ankara-Çalış köyü	Ekili alan
<b>4. Suş</b>	Lül 5	Tekirdağ- Lüleburgaz	Ağaç ekili alan
<b>5. Suş</b>	MerK	Mersin-Kargıpınar	Ekili alan
<b>6. Suş</b>	BarK2	Bartın-Kumluca	Ormanlık alan
<b>7. Suş</b>	Kon-2	Konya-Cihanbeyli	Ekili alan
<b>8. Suş</b>	Ordu	Ordu-Merkez	Fındık ağacı bahçeleri
<b>9. Suş</b>	AyAk	Aydın-Akbük	Zeytin Ağacı bahçesi
<b>10. Suş</b>	Erz	Erzincan, Tercan- Aşkale	Çayırılık alan

Yukarıda belirtilen izolatlar dışında, deneyleerde Danimarka Copenhagen Üniversite’sinden getirilmiş olan KVL 03-129 *Beauveria bassiana* 2002 standart suşu kullanılmıştır.

### 3.8. Seçilen Deney Suşlarının ve Tip Türün Üretimi

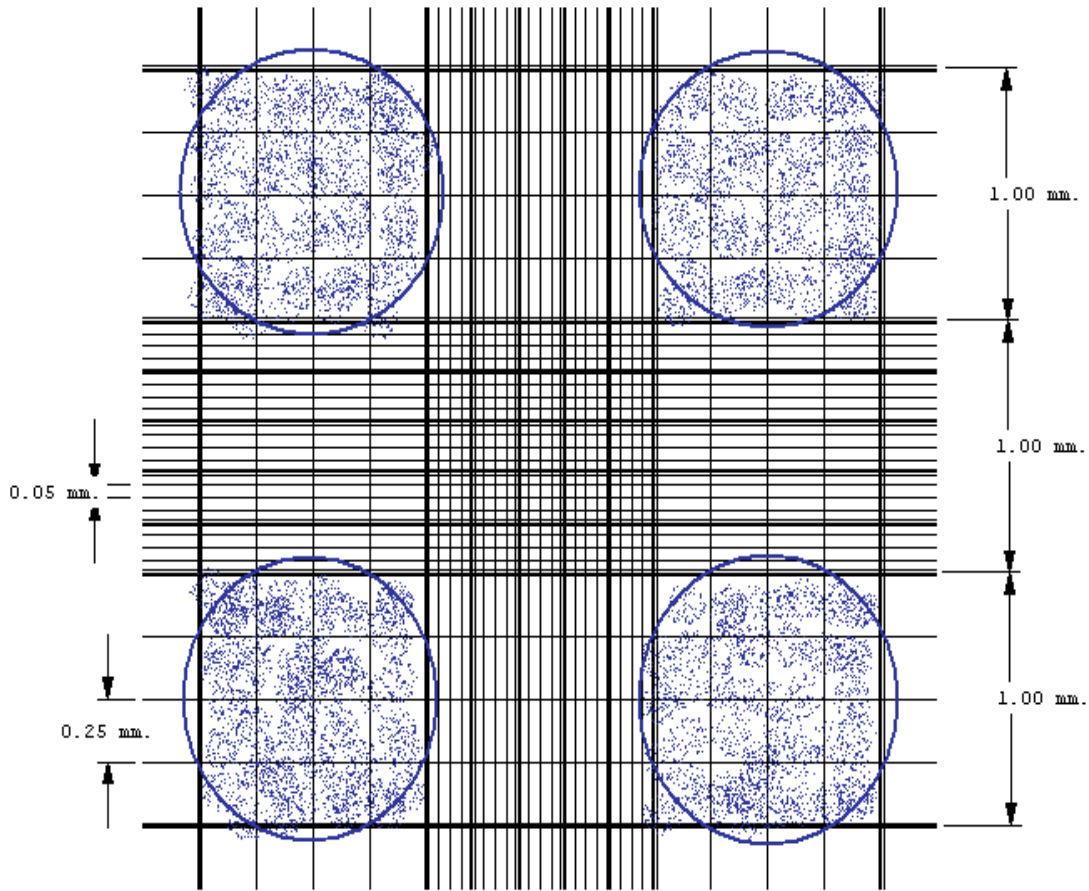
Seçilen suşlar ve orijinal tip tür, yatık olarak hazırlanmış deney tüplerine daldırma ve petrilere 3 nokta ekim tekniği ile ekilmiştir (Kamp and Bidochka, 2002). Kültürleri saklamak için PDA ortamı; spor üretimi için SDAY ortamları kullanılmıştır (Fang et al., 2005). Ekim yapılan tüpler ve petri kapları 27 °C' de inkübasyona alınmış, stok için 7 gün, spor eldesi için ise 14 gün inkübasyonda bekletildikten sonra örnekler +4 °C' ye kaldırılmıştır (Davidson et al., 2003).

Funguslar her 6 haftada bir düzenli olarak pasaj edilerek kültüvasyon sağlanmıştır. 6 aylık periyotlarla da fungusların enfektivitelerini yitirmemeleri için, *Galleria* larvaları funguslar ile enfekte edilmiş ve sporlar, bu ölü larvalardan alınıp pasaj edilmiştir (Hegedus and Kachaturians, 1993)

### 3.9. Spor Solüsyonlarının Hazırlanması

Herbir izolatin spor solüsyonu, deney düzeneği hazırlanmadan önce 50 ml'lik tüplerde, 14 gün boyunca SDAY besiyerinde üremiş kültürlerden hazırlanmıştır. Bu besiyerlerine içerisinde % 1 Tween 80 bulunan 10 ml distile su eklenmiştir (Hansoylu, 2003). Ardından her bir izolatin konidiya süspansiyonu 50 ml hacimli tüplerin içine transfer edilmiş, spor ve misellerin birbirinden ayrılması için 1500 rpm'de 3 dakika karıştırılmıştır (Abebe, 2002). Süspansiyondaki konidial konsantrasyon Neubauer lamı (Şekil 3.1) kullanılarak faz kontrast mikroskobu altında tespit edilmiştir.

Neubauer lamı üzerine 0.1 ml spor solüsyonu konulmuştur. Lamda her biri 1 mm<sup>2</sup> büyüklüğünde olan dört adet büyük kare bulunur (Şekil 3.1). Bu dört kare alanındaki sporların sayımı sonucu bulunan rakam (A), ortalama almak amacıyla 4'e bölünerek 1 mm<sup>3</sup>'teki spor sayısı saptanmıştır, daha sonra bu sayı 10<sup>3</sup> ile çarpılarak 1 ml'deki spor sayısına ulaşılmıştır. Sonucun sulandırma faktörü ile çarpılmasıyla spor sayısı bulunmuştur (Goettel and Inglis, 1997).



Şekil 3.1. Neubauer lamı ve spor sayımının yapıldığı alanlar.

1 ml' deki spor sayısı:  $A/4x[(1x1x1/10)x10^3 \text{xsulandırma faktörü}]$

Çalışmada kullanılan fungusların *Galleria mellonella* üzerinde denenmesi deneylerinde her fungus suşu ve standart suş için 4'er konsantrasyon

hazırlanmış ve kullanılmıştır. Bu konsantrasyonlar  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  ve  $1 \times 10^7$  konidiya/ml'dir (Vu et al., 2007).

### **3.10. Fungus Suşlarının *Galleria mellonella* Üzerinde Denenmesi**

Belirlenen her bir entomopatojen fungus suşu ve konsantrasyonu için steril petri kabına steril filtre kağıdı konmuş ve spor solüsyonundan 1 ml eklenmiştir. Her petriye 10'ar adet inaktive edilmiş 4. evre *Galleria* larvası konulmuştur. Tüm bu işlemler kontaminasyonu önlemek için steril koşullarda gerçekleştirilmiştir (Hansoylu, 2003).

Hazırlanmış deney setindeki her bir suş, grup olarak ayrı ayrı naylon poşetlere konulmuş bu sayede kontaminasyon ve nem kaybı engellenerek, 27 °C ve karanlık koşulların sağlandığı ortama kaldırılmıştır (Hansoylu, 2003).

Kurulan deneyler her gün kontrol edilmiş ve enfekte olduğu tespit edilen ölü larvalar yüzey sterilizasyonunun sağlanması amacıyla % 1'lik sodyum hipoklorit'e 2 dakika süreyle batırılıp sonra distile suyla yıkanmış ve yine steril koşullarda steril filtre kağıdı içeren petri kaplarına aktarılmıştır. Funguslar için gerekli olan nem gereksinimi 1 ml distile su eklenmesiyle sağlanmıştır (Hansoylu, 2003).

Bu petriler de ayrı naylon torbalara konulmuş ve aynı ortamda kadavraların üzerinde fungus gözlenmesi için her gün kontrol edilmiştir. Yine bu petrilerde de funguslar için gerekli olan yüksek nem ortamının sağlanması için steril distile su eklenmiştir (Hansoylu, 2003).

Ayrıca, kurulan deneylerde aynı şekilde kontrol grupları oluşturulmuş, fakat kontrol grubuna spor verilmeyip, içerisine % 1 oranında Tween 80 eklenmiş steril distile su verilmiştir (Vänninen et al., 1999).

### **3.11. İstatistiksel Yöntemler**

Türkiye topraklarından izole edilmiş suşlardan seçilen bu 10 suşun ve tip türün 4 farklı dozu *Galleria* larvaları üzerinde denenmiş ve veriler kaydedilmiştir. Ayrıca bu gruplar için kontrol grubu da oluşturulmuş ve verileri kaydedilmiştir.

Bu 10 suşun patojenite etkileri, doz ve suşun etkisinin olup olmadığı tip türün patojenite etkisine göre Anova ile araştırılmıştır. Gruplar (suşlar) kendi aralarında LSD testi ile karşılaştırılmıştır.

Kümülatif mortalite oranları ve ölüm süresinin ortalama değerleri verilerine dayanılarak yüzde (%) mortalite grafikleri Microsoft Windows Office-Excel programı kullanılarak çizilmiştir. Ayrıca EPA probit analiz programı kullanılarak suşların 5. gündeki öldürme potansiyelleri temel alınarak LD<sub>50</sub> (deneklerin % 50'sinin ölmesi için gerekli olan doz miktarı) ve Kaplan-Meier yöntemine göre LT<sub>50</sub> değerleri yani deneklerin % 50' sinin ölmesi için geçen süre ve standart hata (SE) verileri hesaplanmıştır (Kreutz et al., 2004).

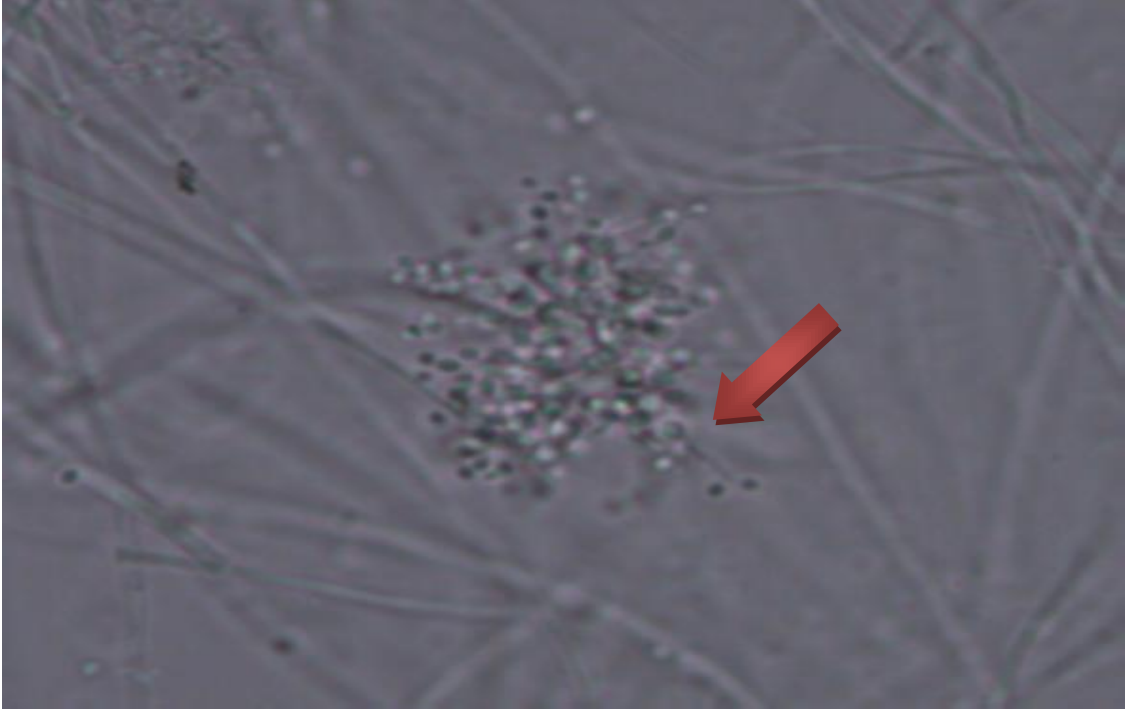
## 4. SONUÇLAR

### 4.1. İzolasyon Sonuçları

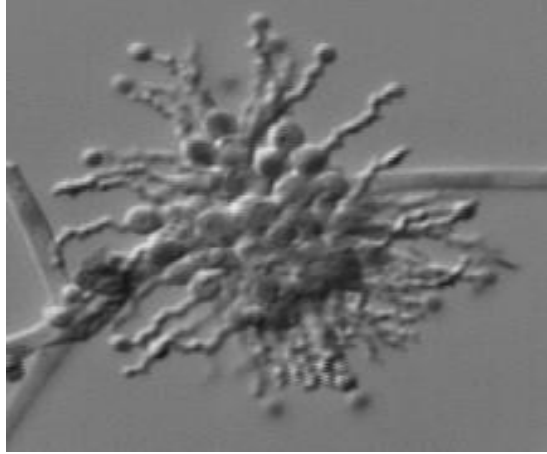
Çalışmada topraktan entomopatojen fungusların izolasyonunda iki yöntem kullanılmıştır. Bunlar *Galleria* tuzak yöntemi ve toprak seyreltme yöntemidir. Her iki yöntemde de entomopatojen fungus izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ancak izole edilen toplam 49 örneğin 47'si *Galleria* tuzak yönteminde, toprak seyreltme yönteminde ise 2 örnek izole edilmiştir. Tüm toprak örnekleri *Galleria* tuzak yönteminde iki kez denenmiştir.

### 4.2. Tür Teşhisi Sonuçları

Laktofenol solüsyonu damlatılmış preparatlarda *Beauveria* cinsinin en karakteristik özellikleri aranmış ve taban kısmı globoz veya şişe şeklinde şişkin sporojen hücreler, uçlarında uzun ve dar salkımlar ve salkımlarda küçük şeffaf sporların meydana getirdiği kümelerin gözlemlendiği örnekler seçilmiştir (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.).



Şekil 4.1. *Beauveria bassiana* konidiyafor, sporojen hücre (okun ucundaki) ve konidiyalar.



Şekil 4.2. *B. bassiana* (<http://arsef.fpsnl.cornell.edu/pictures/beauveria2.gif>).

Ege Üniversitesinde yapılan teşhislerle, Türkiye topraklarından izole edilen 49 örnekten 48 *B. bassiana* ve 1 *B. brongniartii* tanımlanmıştır. Yapılan teşhislerde, izole edilen örneklerde *Metarhizium anisopliae*'ye rastlanılmamıştır.

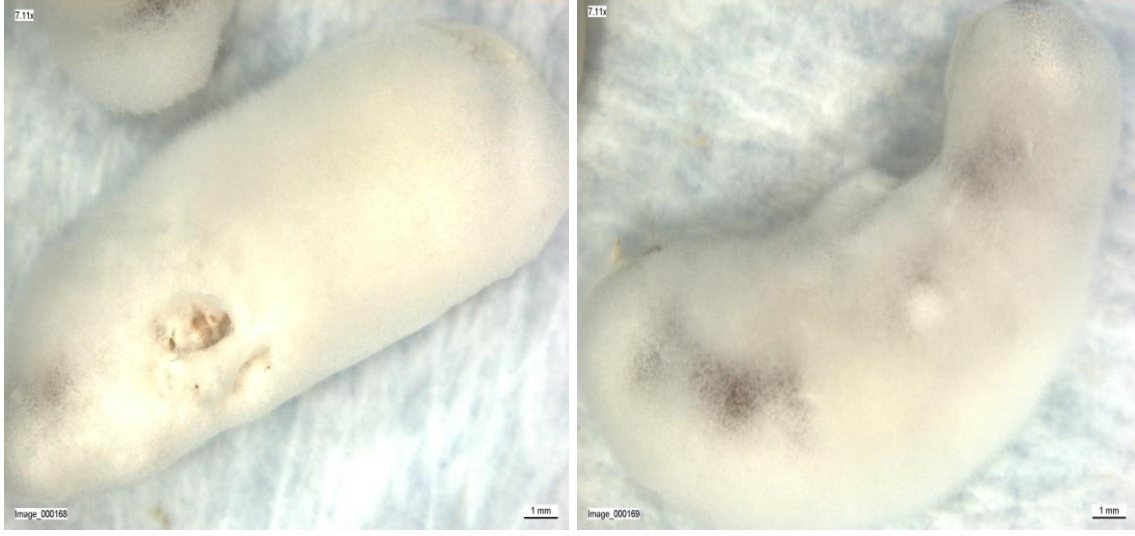
#### 4.3. Ölüm Nedeninden Fungusun Sorumlu Tutulması

*Galleria* tuzak yönteminde ve *Galleria* deneylerinde, larvanın enfekte olmasının ardından ölüm nedeninden fungusun sorumlu tutulabilmesi için larva öldükten sonra 1-2 gün içinde larvanın içinin hifal yapılarla dolması sonucunda sert bir yapı kazanması ve kötü koku oluşturmaması özellikleri beklenmiştir (Şekil 4.3.)



Şekil 4.3. *B. bassiana* ile enfekte olmuş ölmekte olan *Galleria* larvası.

Bu belirtilerin gözleendiği larvaların ölüm nedenlerinin entomopatojen fungus olduğu belirtilmiştir (şekil 4.4-4.5).



şekil 4.4. *Galleria* larvası üzerinde üremiş *B. bassiana* sporları.



şekil 4.5. *Galleria* üzerinde gözlenen yoğun *B. bassiana* konidyafor ve konidiaları.

## 4.4. Deney Sonuçları

### 4.4.1. Fungus suşlarının *Galleria mellonella* üzerinde denenme sonuçları

Bu çalışmada; DenK1, SB1(b), Ank 12, Lül 5, MerK, BarK2, Kon-2, Ordu, AyAk, Erz ve KVL 03-129 olarak nitelendirilen suşlar kullanılmıştır.

10 fungus suşunun her birinin, ayrıca standart suş ve kontrol grubunun 4'er farklı dozunun patojenitesi denenmiş ve elde edilen veriler her gün deney düzeneğinin kontrol edilmesiyle ölü sayıları kaydedilmiştir. Her deney düzeneğinde 10 larva kullanılmış ve deneyler 3 kez tekrarlanmıştır. Böylelikle her doz için 30 larva üzerinde denemeler yapılmıştır.

Bu 10 suşun patojenite etkilerinde, doz ve suş etkisinin olup olmadığı standart suşun patojenite etkisine göre Anova ile araştırılmış ve sonuçlara göre bu 2 faktörün de istatistik açıdan önemli olduğu söylenebilmiştir ( $F_{\text{suş}} = 2,06$ ,  $F_{\text{doz}} = 9,30$ ,  $p < 0,05$ )(Çizelge 4.1). Suşlar ise kendi aralarında LSD testi ile karşılaştırılmıştır.

Çalışmada denenilen tüm fungus suşları ve bunların dozlarının, *Galleria mellonella* larvaları üzerinde, kontrol grubu ile karşılaştırılmasıyla yüksek oranda başarılı mortalite elde edilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonuçları da bu sonuçları desteklemiş ve LSD testine göre kontrol grubunun ortalama ölüm süresinin denenilen tüm dozların ortalama ölüm sürelerinden farklı olduğu bulunmuştur ( $p < 0,05$ )(Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.8-4.18).

Fungus suşlarının  $1 \times 10^7$  ve  $1 \times 10^6$  kon/ml konsantrasyon uygulamalarının sonuçları arasında fark olmadığı bulunmuş ( $p > 0,05$ )(Çizelge 4.2) ayrıca  $1 \times 10^6$  ile  $1 \times 10^5$  ve  $1 \times 10^5$  ile  $1 \times 10^4$  kon/ml konsantrasyon uygulamalarında da fark olmadığı bulunmuştur ( $p > 0,05$ )(Çizelge 4.2).  $1 \times 10^7$  kon/ml konsantrasyon uygulamasının  $1 \times 10^5$  ve  $1 \times 10^4$  kon/ml'den farklı olduğu ve  $1 \times 10^6$  kon/ml konsantrasyon uygulamasının  $1 \times 10^4$  kon/ml'den farklı olduğu bulunmuştur ( $p < 0,05$ )(Çizelge 4.2). Buna göre etkinlik açısından etkili dozun (yani en kısa sürede öldüren dozun) uygulanan dozların en yüksek olanı ve doz düştükçe de etkinliğin yüksek doza göre azaldığı bulunmuştur. Bu sonucu da hem grafikler hem de istatistiksel sonuçlar desteklemektedir (Şekil 4.6-4.9)(Çizelge 4.2)

Yapılan bu çalışmada, ortalama ölüm zamanları ve grafiklere göre Erz suşunun diğer suşlara göre en etkili olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.8-4.18)(Şekil 4.6-4.20). Ayrıca Kaplan-Meier testinde elde edilen  $LT_{50}$  değerleri (Çizelge 4.4-4.7) ve EPA probit analiz programıyla elde edilen  $LD_{50}$  değerleri (Çizelge 4.3) de bu sonucu desteklemektedir. İstatiksel analizler de bu suşun; Ank12, MerK ve Kon-2 suşlarından anlamlı bir fark gösterdiğini ( $p<0,05$ ), ancak diğer suşlardan farklı olmadığını göstermiştir ( $p>0,05$ ).

Çizelge 4.1. Frekans değerleri.

	Frekans	Anlamlılık
$F_{suş}$	2,06	0,02
$F_{doz}$	9,30	<0,01

Çizelge 4.2. Konsantrasyon karşılaştırmaları

LSD	(A) Doz	(B) Doz	Ortalama farklılıkları (A-B)	Standart Hata	Sig.	95% Güven Sınırları	
						Alt Sınır	Üst Sınır
	1x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>6</sup>	,7911	,77453	,308	-,7331	2,3153
		1x10 <sup>5</sup>	1,8713 <sup>*</sup>	,73250	,011	,4299	3,3128
		1x10 <sup>4</sup>	2,3107 <sup>*</sup>	,71598	,001	,9018	3,7197
		K	4,6096 <sup>*</sup>	,98726	,000	2,6668	6,5524
	1x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>7</sup>	-,7911	,77453	,308	-2,3153	,7331
		1x10 <sup>5</sup>	1,0802	,70288	,125	-,3030	2,4634
		1x10 <sup>4</sup>	1,5196 <sup>*</sup>	,68565	,027	,1703	2,8689
		K	3,8185 <sup>*</sup>	,96549	,000	1,9185	5,7184
	1x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>7</sup>	-1,8713 <sup>*</sup>	,73250	,011	-3,3128	-,4299
		1x10 <sup>6</sup>	-1,0802	,70288	,125	-2,4634	,3030
		1x10 <sup>4</sup>	,4394	,63779	,491	-,8157	1,6945
		K	2,7382 <sup>*</sup>	,93211	,004	,9039	4,5725
	1x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>7</sup>	-2,3107 <sup>*</sup>	,71598	,001	-3,7197	-,9018
		1x10 <sup>6</sup>	-1,5196 <sup>*</sup>	,68565	,027	-2,8689	-,1703
		1x10 <sup>5</sup>	-,4394	,63779	,491	-1,6945	,8157
		K	2,2989 <sup>*</sup>	,91919	,013	,4900	4,1077
	K	1x10 <sup>7</sup>	-4,6096 <sup>*</sup>	,98726	,000	-6,5524	-2,6668
		1x10 <sup>6</sup>	-3,8185 <sup>*</sup>	,96549	,000	-5,7184	-1,9185
		1x10 <sup>5</sup>	-2,7382 <sup>*</sup>	,93211	,004	-4,5725	-,9039
		1x10 <sup>4</sup>	-2,2989 <sup>*</sup>	,91919	,013	-4,1077	-,4900

Ayrıca EPA probit analiz programı ile kullanılan suşların 5. gündeki öldürme potansiyelleri temel alınarak LD<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Her suş için LD<sub>50</sub> değerleri.

Fungus Suşu	LD <sub>50</sub> (Öldürme dozu)	%95 Güven Sınırları
DenK1	8,6x10 <sup>4</sup>	5,2x10 <sup>4</sup> - 1,4x10 <sup>5</sup>
SB1(b)	1,9x10 <sup>5</sup>	1,1x10 <sup>5</sup> – 3,1x10 <sup>5</sup>
Ank12	2,8x10 <sup>5</sup>	1,4x10 <sup>5</sup> – 5,4x10 <sup>5</sup>
Lül 5	1,8x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup> – 3,3x10 <sup>5</sup>
MerK	1,7x10 <sup>6</sup>	9,2x10 <sup>5</sup> – 3,7x10 <sup>6</sup>
BarK2	3,4x10 <sup>5</sup>	1,5x10 <sup>5</sup> – 6,3x10 <sup>5</sup>
Kon-2	7x10 <sup>5</sup>	3,4x10 <sup>5</sup> – 1,5x10 <sup>6</sup>
Ordu	3,1x10 <sup>5</sup>	1,6x10 <sup>5</sup> – 6,1x10 <sup>5</sup>
AyAk	2x10 <sup>5</sup>	1,1x10 <sup>5</sup> – 3,8x10 <sup>5</sup>
Erz	6,5x10 <sup>2</sup>	0.00 - 4,5x10 <sup>3</sup>
KVL 03-129	8,5x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>4</sup> – 1,4x10 <sup>5</sup>

Çizelge 4.4.  $1 \times 10^7$  dozunun her suştaki ve kontrol grubundaki  $LT_{50}$  değerleri.

Fungus Suşu	$LT_{50}$ (Deneklerin % 50'sinin ölmesi için geçen süre) (Gün)	Standart Hata	% 95 Güven Sınırları	Beyaz Muskardin (%)
DenK1	3	0,15	2,69 - 3,30	96,7
SB1(b)	4	0,22	3,55 - 4,44	96,7
Ank 12	4	0,09	3,81 - 4,18	96,7
Lül 5	4	0,21	3,58 - 4,41	93,3
MerK	5	0,07	4,85 - 5,14	96,7
Bark2	4	0,17	3,65 - 4,34	96,7
Kon-2	4	0,35	3,30 - 4,70	90
Ordu	4	0,17	3,65- 4,34	96,7
AyAK	5	0,08	4,83 - 5,16	96,7
Erz	2	0,11	1,77 - 2,22	96,7
KVL 03-129	4	0,09	3,80 - 4,19	96,7
Kontrol	27	0,31	26,39 - 27,61	0

Çizelge 4.5.  $1 \times 10^6$  dozunun her suştaki ve kontrol grubundaki  $LT_{50}$  değerleri

Fungus Suşu	$LT_{50}$ (Deneklerin % 50'sinin ölmesi için geçen süre) (Gün)	Standart Hata	% 95 Güven Sınırları	Beyaz Muskardin (%)
DenK1	4	0,28	3,43 - 4,56	96,7
SB1(b)	5	0,07	4,85 - 5,14	96,7
Ank 12	5	0,35	4,29 - 5,70	90
Lül 5	5	0,16	4,67 - 5,32	90
MerK	6	0,23	5,53 - 6,46	96,7
Bark2	5	0,17	4,65 - 5,34	96,7
Kon-2	6	0,22	5,56 - 6,43	83,3
Ordu	5	0,12	4,74 - 5,25	96,7
AyAK	5	0,12	4,76 - 5,23	96,7
Erz	3	0,11	2,78 - 3,21	96,7
KVL 03-129	4	0,19	3,62 - 4,37	96,7
Kontrol	27	0,31	26,39 - 27,61	0

Çizelge 4.6.  $1 \times 10^5$  dozunun her suştaki ve kontrol grubundaki  $LT_{50}$  değerleri.

Fungus Suşu	$LT_{50}$ (Deneklerin % 50'sinin ölmesi için geçen süre) (Gün)	Standart Hata	% 95 Güven Sınırları	Beyaz Muskardin (%)
DenK1	6	0,06	5,88 - 6,12	96,7
SB1(b)	6	0,08	5,83 - 6,16	96,7
Ank 12	6	0,20	5,60 - 6,39	86,7
Lül 5	6	0,10	5,80 - 6,19	90
MerK	7	0,17	6,65 - 7,34	96,7
BarK2	6	0,18	5,63 - 6,37	96,7
Kon-2	7	0,28	6,43 - 7,56	93,3
Ordu	6	0,16	5,67 - 6,32	96,7
AyAK	6	0,12	5,75 - 6,24	96,7
Erz	4	0,18	3,63 - 4,36	96,7
KVL 03-129	6	0,10	5,78 - 6,21	96,7
Kontrol	27	0,311	26,39 - 27,61	0

Çizelge 4.7.  $1 \times 10^4$  dozunun her suştaki ve kontrol grubundaki  $LT_{50}$  değerleri.

Fungus Suşu	$LT_{50}$ (Deneklerin % 50'sinin ölmesi için geçen süre) (Gün)	Standart Hata	% 95 Güven Sınırları	Beyaz Muskardin (%)
DenK1	6	0,19	5,62 - 6,37	96,7
SB1(b)	7	0,11	6,77 - 7,22	93,3
Ank 12	7	0,26	6,48 - 7,51	86,7
Lül 5	7	0,31	6,39 - 7,61	96,7
MerK	8	0,13	7,74 - 8,25	96,7
Bark2	9	0,12	8,75 - 9,24	96,7
Kon-2	8	0,29	7,41 - 8,58	94,3
Ordu	7	0,36	6,27 - 7,72	80
AyAK	7	0,26	6,48 - 7,51	86,7
Erz	5	0,15	4,69 - 5,30	96,7
KVL 03-129	7	0,08	6,84 - 7,15	96,7
Kontrol	27	0,31	26,39 - 27,61	0

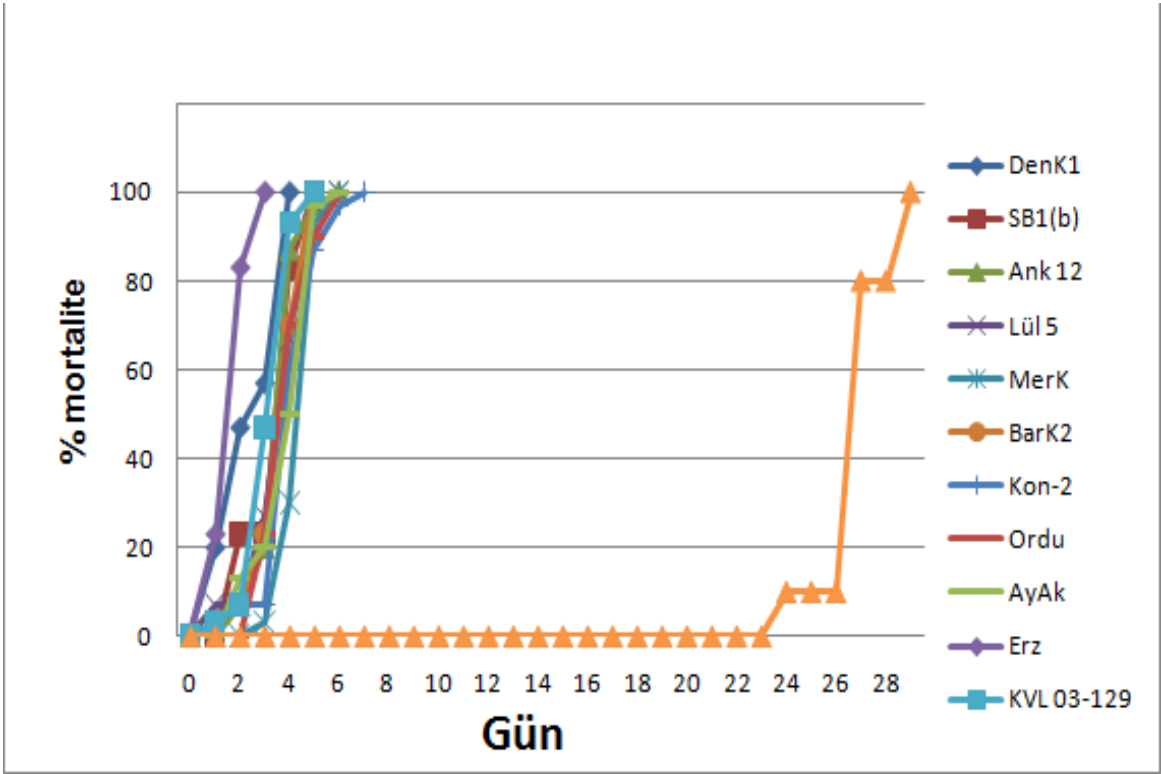
10 gün içerisinde tüm suşlar her dozda yüksek oranda beyaz muskardin hastalığına neden olmuşlardır (Çizelge 4.4-4.7).  $1 \times 10^7$  dozunda Erz ve DenK1 suşunun standart suşa göre  $LT_{50}$  değerleri daha az (yani daha kısa sürede etki göstermiş), MerK ve AyAk suşları  $LT_{50}$  değerleri yüksek bulunmuştur. Fakat hastalık %'leri aynıdır (Çizelge 4.4).

$1 \times 10^6$  dozunda yine Erz suşunun standart suşa göre  $LT_{50}$  değeri düşük bulunmuştur. DenK1 suşu bu dozda standart suşla aynı sürede diğer suşlar ise standart suşa göre daha uzun bir  $LT_{50}$  değerine sahiptirler. Kon-2 suşu bu dozda en düşük  $LT_{50}$  değerine sahip suşlardan birisidir ayrıca hastalık yüzdesi en düşük olanıdır. Bu dozda bu suş en düşük etki göstermiştir (Çizelge 4.5).

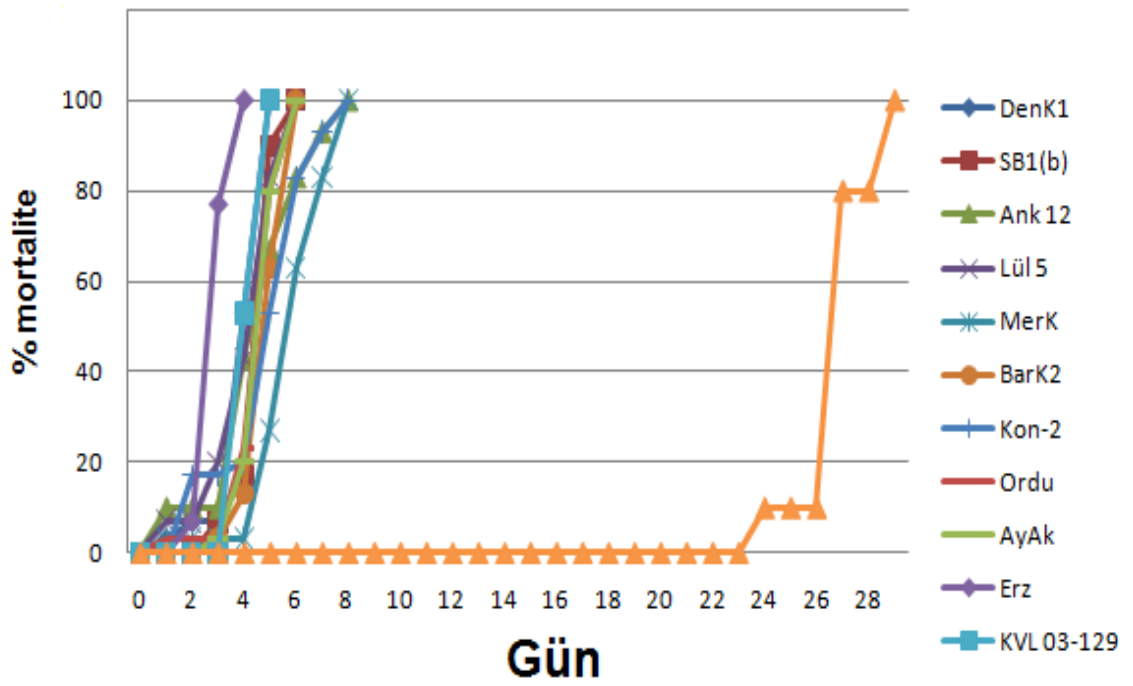
$1 \times 10^5$  dozunda Erz suşunun standart suşa göre  $LT_{50}$  değeri düşük, MerK ve Kon-2 suşunun ise yüksektir. Tüm suşlar larvalarda yüksek oranda hastalık ortaya çıkarmıştır (Çizelge 4.6).

$1 \times 10^4$  dozunda ise Erz ve DenK1 suşunun standart suşa göre  $LT_{50}$  değeri düşük MerK, Bark2 ve Kon-2 suşlarının ise yüksektir. Ordu suşunun standart suşa göre  $LT_{50}$  değeri aynı olmasına rağmen en düşük oranda hastalık ortaya çıkarmıştır (Çizelge 4.7).

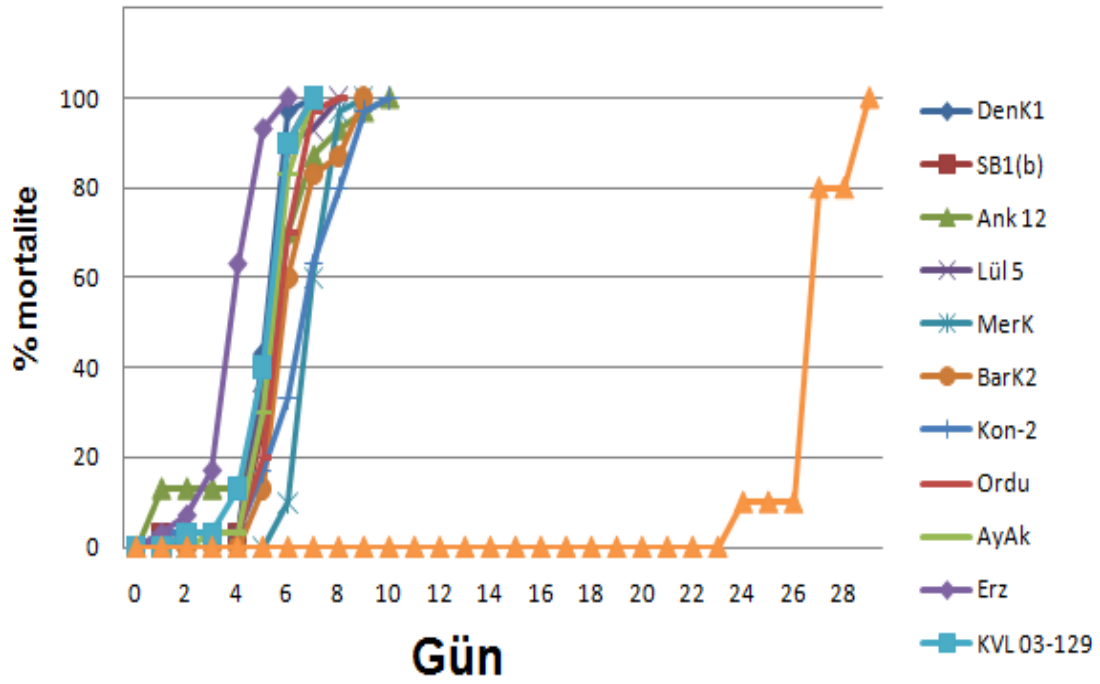
Ancak, tüm fungus suşlarının etkinliğinin, karşılaştırılan standart suşa göre aralarında istatistiksel açıdan farklı olmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.4-4.7) ( $p > 0,05$ ).



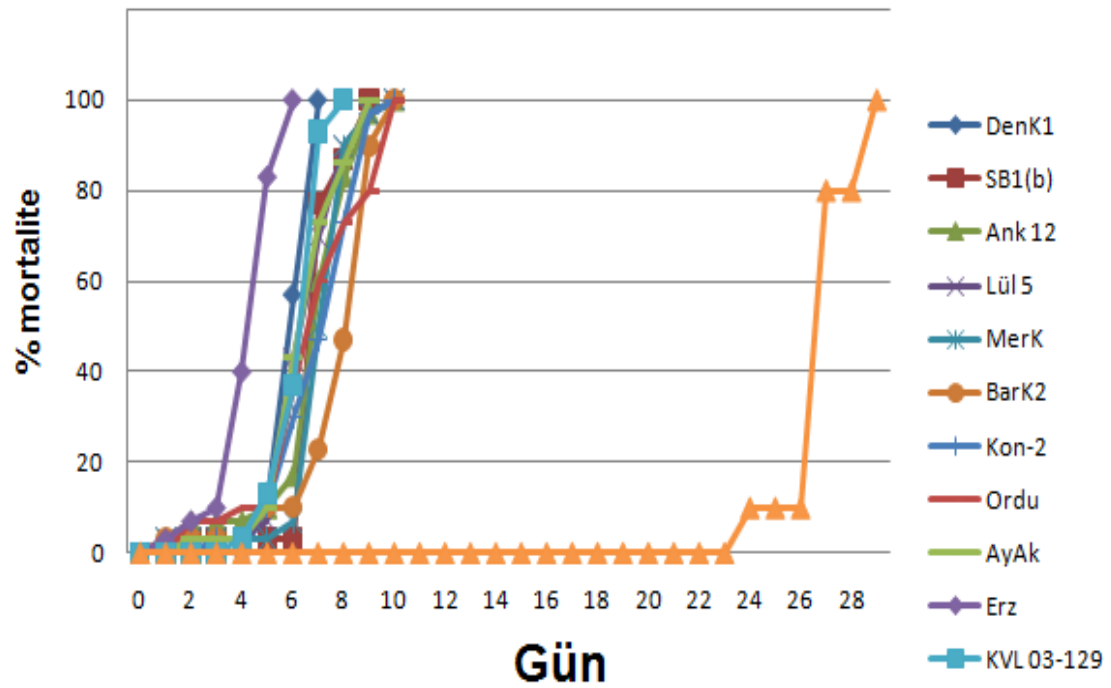
Şekil 4.6. Tüm fungus suşlarının  $1 \times 10^7$  doz uygulamalarının ve kontrol grubunun günlere göre % mortalite değerleri.



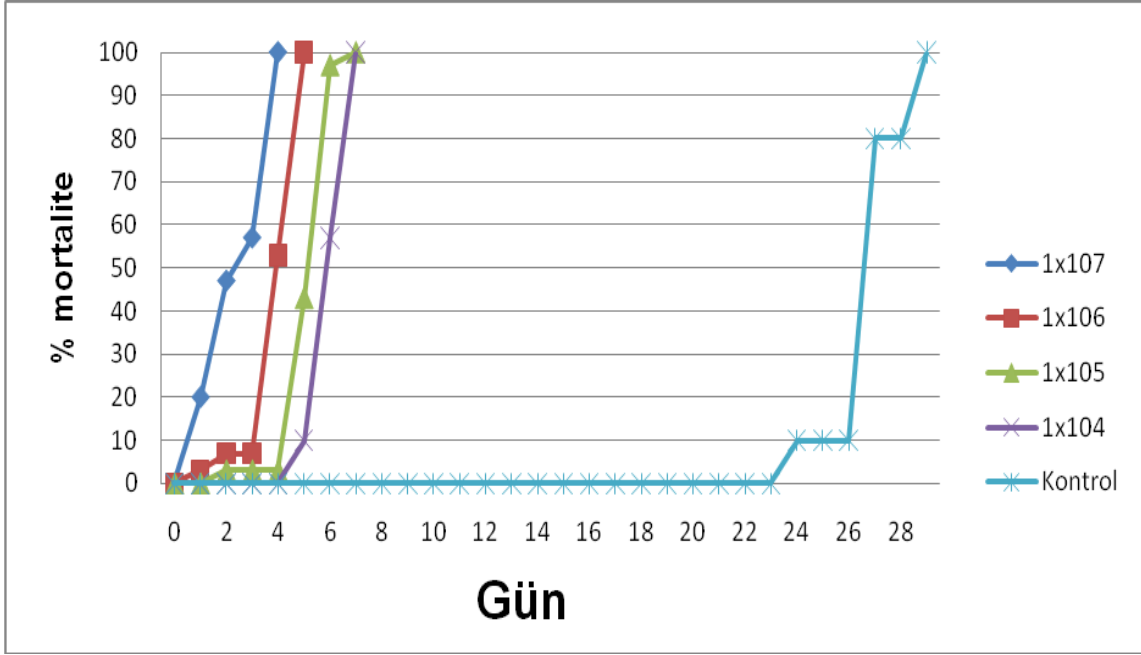
Şekil 4.7. Tüm fungus suşlarının  $1 \times 10^6$  doz uygulamalarının ve kontrol grubunun günlere göre % mortalite değerleri.



Şekil 4.8. Tüm fungus suşlarının  $1 \times 10^5$  doz uygulamalarının ve kontrol grubunun günlere göre % mortalite değerleri.



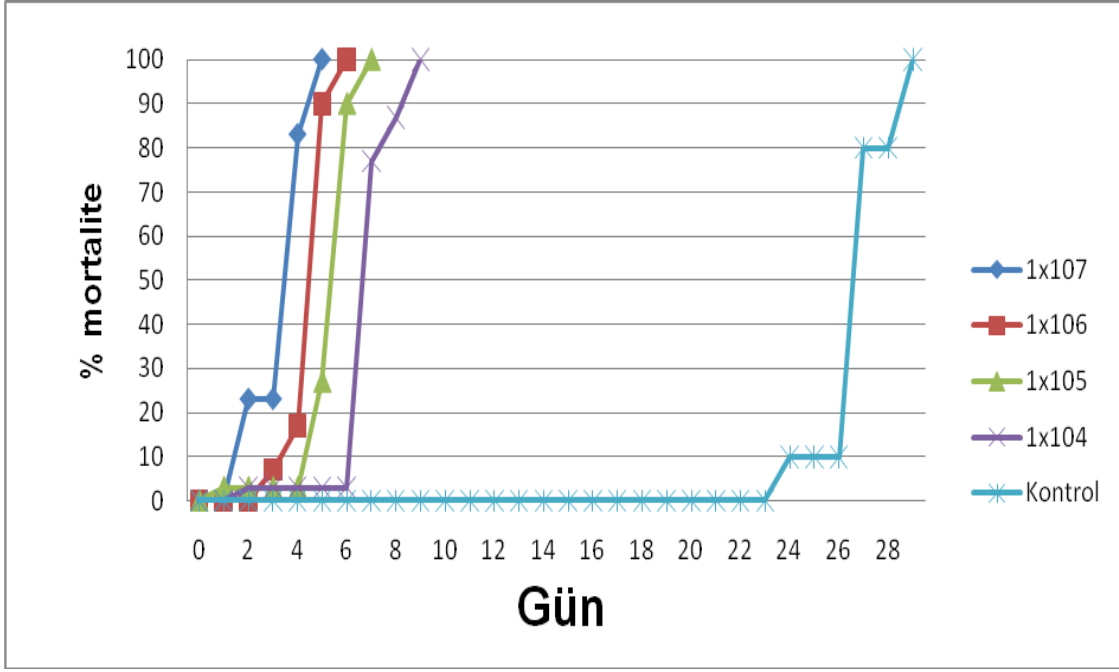
Şekil 4.9. Tüm fungus suşlarının  $1 \times 10^4$  doz uygulamalarının ve kontrol grubunun günlere göre % mortalite değerleri.



Şekil 4.10. DenK1 (Denizli-Kocabey) suşunun *Galleria mellonella* üzerinde denenen 4 konsantrasyonu ve kontrol grubuna göre mortalite değerleri.

Çizelge 4.8. DenK1 (Denizli-Kocabey) suşunun *Galleria mellonella* larvalarına uygulanan konsantrasyonları ve gerçekleştirdikleri ortalama ölüm zamanları.

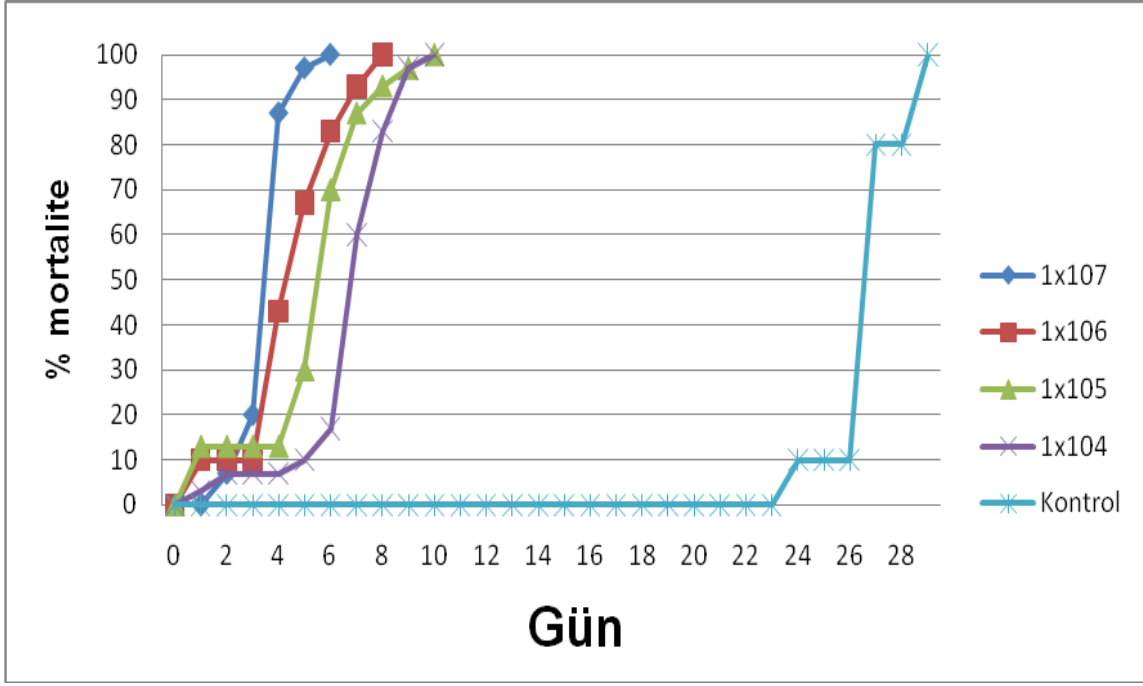
Fungus Suşu	Uygulanan Doz(kon/ml)	Ortalama ölüm zamanı(gün)	Standart sapma
DenK1	$1 \times 10^7$	2,80	1,22
	$1 \times 10^6$	4,30	0,92
	$1 \times 10^5$	5,52	0,85
	$1 \times 10^4$	6,33	0,66
Kontrol	0	27,10	1,32



Şekil 4.11. SB1(b) (Beytepe) suşunun *Galleria mellonella* üzerinde denenen 4 konsantrasyonu ve kontrol grubuna göre mortalite değerleri.

Çizelge 4.9. SB1(b) (Beytepe) suşunun *Galleria mellonella* larvalarına uygulanan konsantrasyonları ve gerçekleştirdikleri ortalama ölüm zamanları.

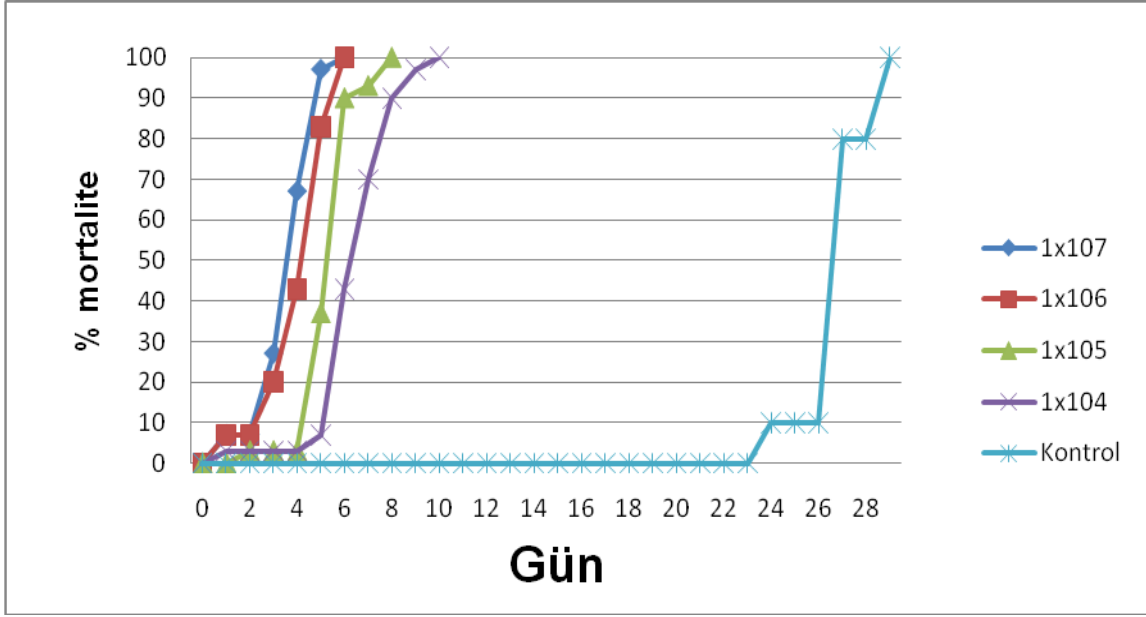
Fungus Suşu	Uygulanan Doz(kon/ml)	Ortalama ölüm zamanı(gün)	Standart sapma
SB1(b)	$1 \times 10^7$	3,70	1,02
	$1 \times 10^6$	4,87	0,68
	$1 \times 10^5$	5,71	1,04
	$1 \times 10^4$	7,20	1,21
Kontrol	0	27,10	1,32



Şekil 4.12. Ank 12 (Ankara) suşunun *Galleria mellonella* üzerinde denenen 4 konsantrasyonu ve kontrol grubuna göre mortalite değerleri.

Çizelge 4.10. Ank 12 (Ankara) suşunun *Galleria mellonella* larvalarına uygulanan konsantrasyonları ve gerçekleştirdikleri ortalama ölüm zamanları.

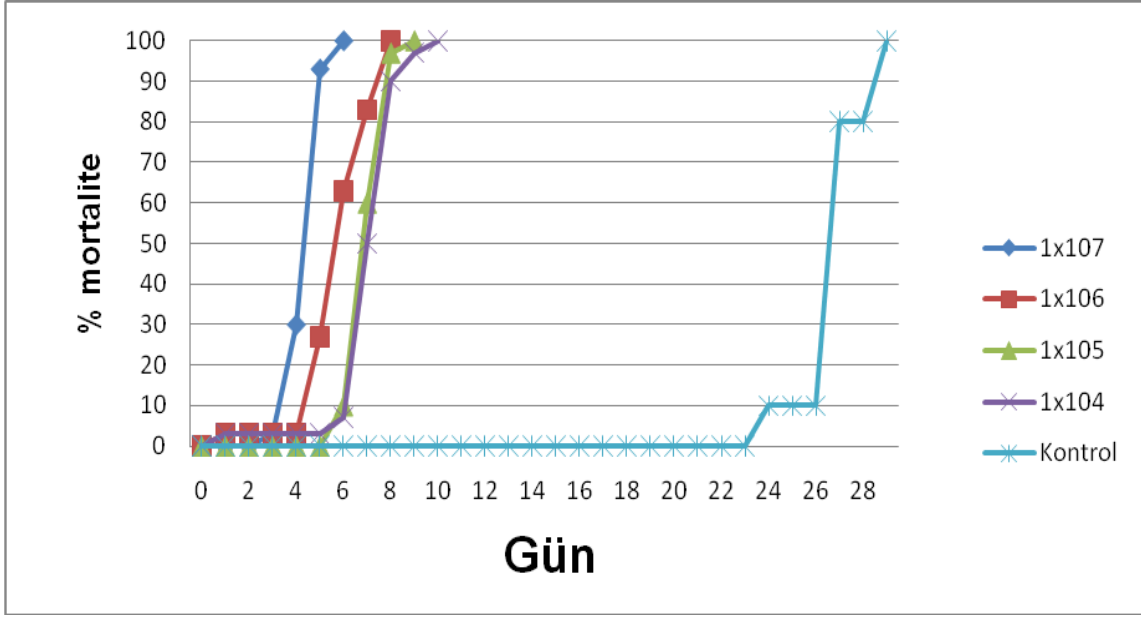
Fungus Suşu	Uygulanan Doz(kon/ml)	Ortalama ölüm zamanı(gün)	Standart sapma
Ank 12	$1 \times 10^7$	3,90	0,80
	$1 \times 10^6$	4,83	1,78
	$1 \times 10^5$	5,77	2,20
	$1 \times 10^4$	7,10	1,85
Kontrol	0	27,10	1,32



Şekil 4.13. Lül 5 (Lüleburgaz) suşunun *Galleria mellonella* üzerinde denenen 4 konsantrasyonu ve kontrol grubuna göre mortalite değerleri.

Çizelge 4.11. Lül 5 (Lüleburgaz) suşunun *Galleria mellonella* larvalarına uygulanan konsantrasyonları ve gerçekleştirdikleri ortalama ölüm zamanları.

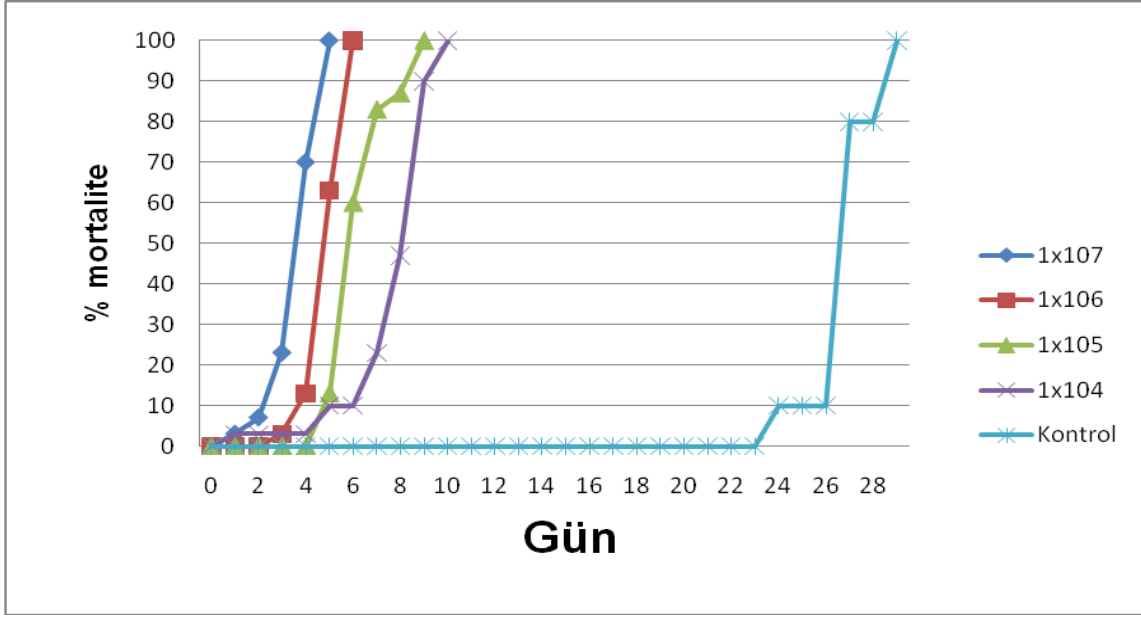
Fungus Suşu	Uygulanan Doz (kon/ml)	Ortalama ölüm zamanı (gün)	Standart sapma
Lül 5	$1 \times 10^7$	3,97	1,10
	$1 \times 10^6$	4,40	1,30
	$1 \times 10^5$	5,70	1,06
	$1 \times 10^4$	6,80	1,58
Kontrol	0	27,10	1,32



Şekil 4.14. MerK (Mersin-Kargıpınar) suşunun *Galleria mellonella* üzerinde denenen 4 konsantrasyonu ve kontrol grubuna göre mortalite değerleri.

Çizelge 4.12. MerK (Mersin-Kargıpınar) suşunun *Galleria mellonella* larvalarına uygulanan konsantrasyonları ve gerçekleştirdikleri ortalama ölüm zamanları.

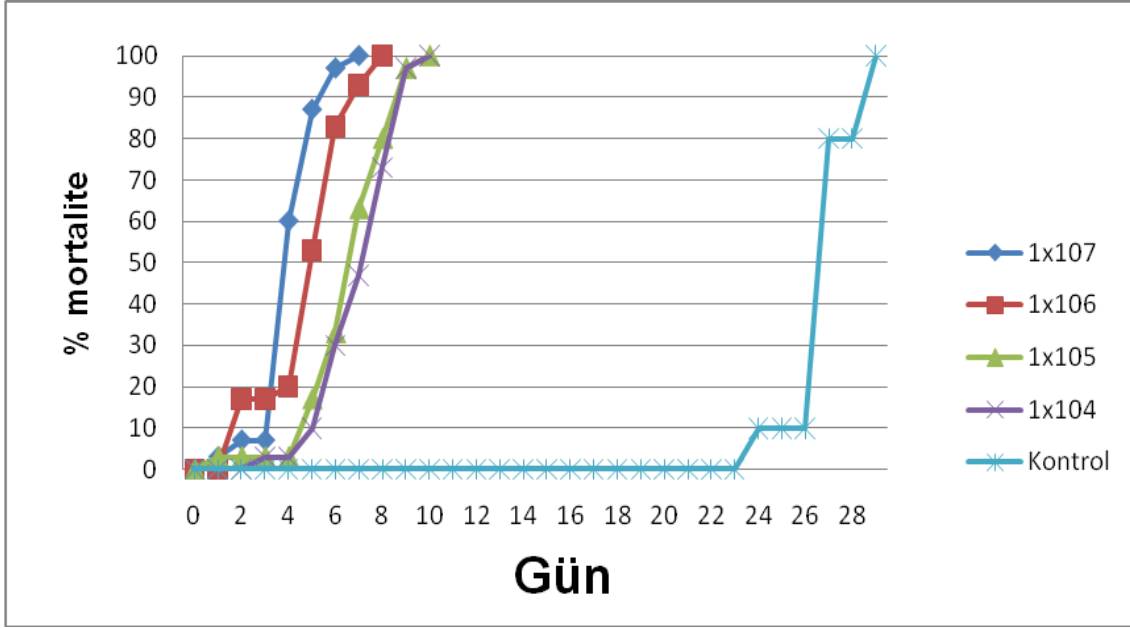
Fungus Suşu	Uygulanan Doz (kon/ml)	Ortalama ölüm zamanı (gün)	Standart sapma
MerK	$1 \times 10^7$	4,73	0,64
	$1 \times 10^6$	6,13	1,41
	$1 \times 10^5$	7,33	0,71
	$1 \times 10^4$	7,44	1,45
Kontrol	0	27,10	1,32



Şekil 4.15. BarK2 (Bartın-Kumluca) suşunun *Galleria mellonella* üzerinde denenen 4 konsantrasyonu ve kontrol grubuna göre mortalite değerleri.

Çizelge 4.13. BarK2 (Bartın-Kumluca) suşunun *Galleria mellonella* larvalarına uygulanan konsantrasyonları ve gerçekleştirdikleri ortalama ölüm zamanları.

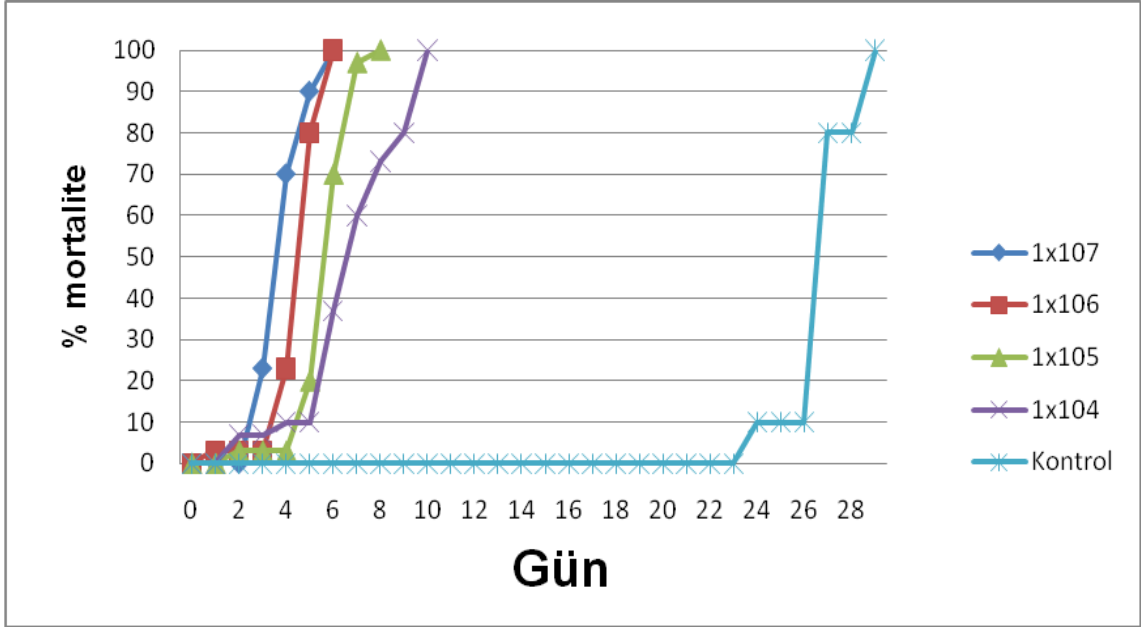
Fungus Suşu	Uygulanan Doz (kon/ml)	Ortalama ölüm zamanı (gün)	Standart sapma
BarK2	$1 \times 10^7$	3,97	0,96
	$1 \times 10^6$	5,20	0,76
	$1 \times 10^5$	6,57	1,20
	$1 \times 10^4$	8,07	1,82
Kontrol	0	27,10	1,32



Şekil 4.16. Kon-2 (Konya) suşunun *Galleria mellonella* üzerinde denenen 4 konsantrasyonu ve kontrol grubuna göre mortalite değerleri.

Çizelge 4.14. Kon-2 (Konya) suşunun *Galleria mellonella* larvalarına uygulanan konsantrasyonları ve gerçekleştirdikleri ortalama ölüm zamanları.

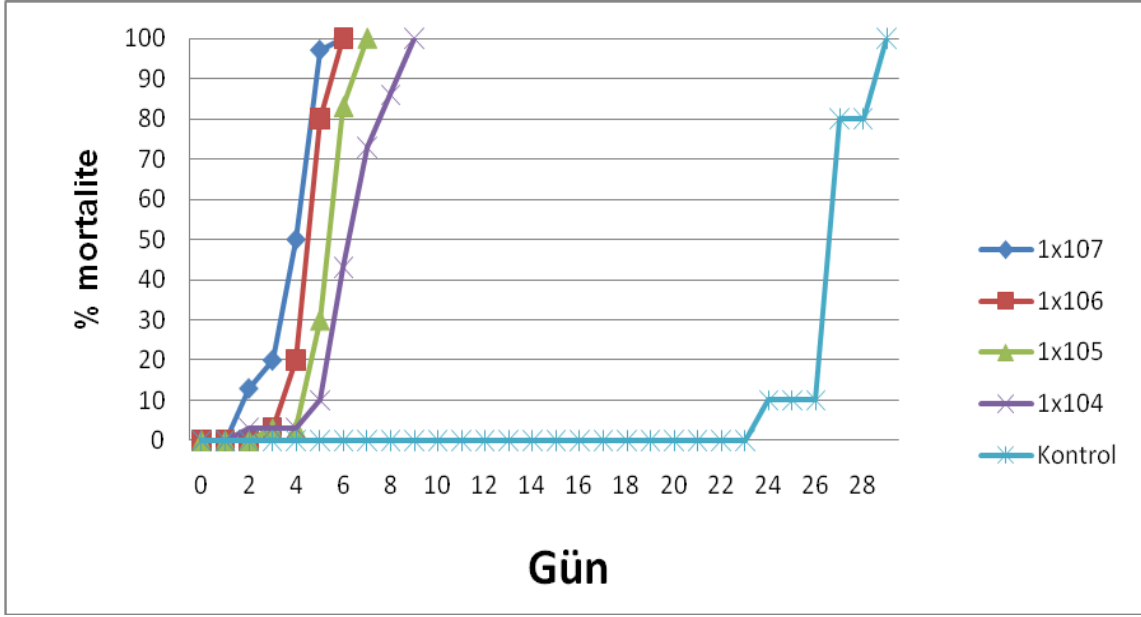
Fungus Suşu	Uygulanan Doz (kon/ml)	Ortalama ölüm zamanı (gün)	Standart sapma
Kon-2	$1 \times 10^7$	4,40	1,13
	$1 \times 10^6$	5,17	1,70
	$1 \times 10^5$	6,97	1,77
	$1 \times 10^4$	7,37	1,56
Kontrol	0	27,10	1,32



Şekil 4.17. Ordu suşunun *Galleria mellonella* üzerinde denenen 4 konsantrasyonu ve kontrol grubuna göre mortalite değerleri.

Çizelge 4.15. Ordu suşunun *Galleria mellonella* larvalarına uygulanan konsantrasyonları ve gerçekleştirdikleri ortalama ölüm zamanları.

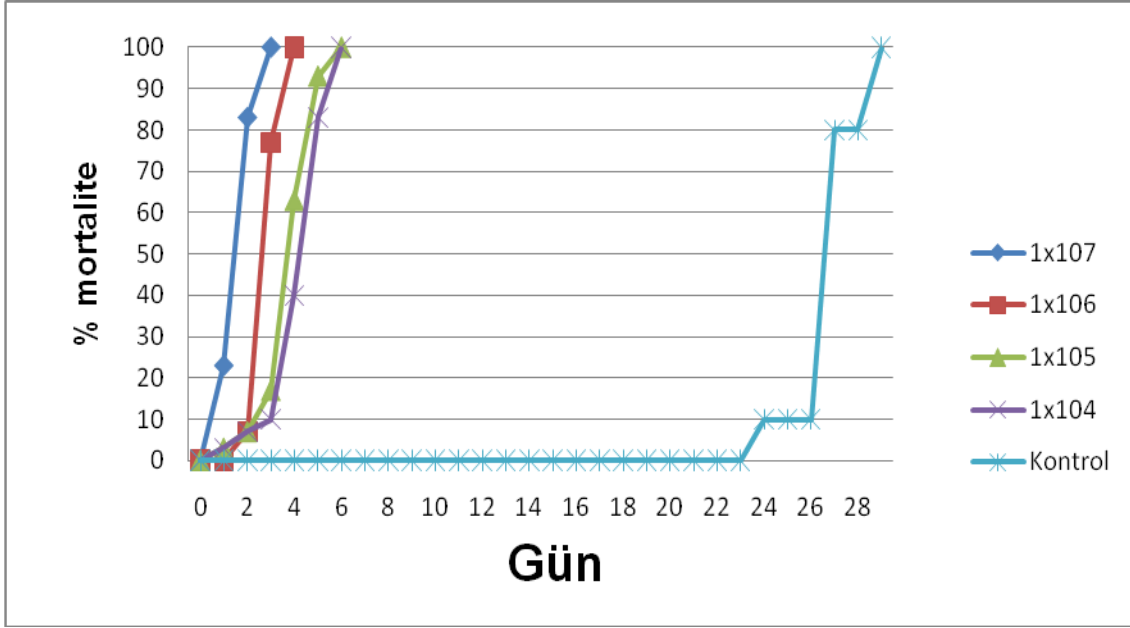
Fungus Suşu	Uygulanan Doz (kon/ml)	Ortalama ölüm zamanı (gün)	Standart sapma
Ordu	$1 \times 10^7$	4,17	0,91
	$1 \times 10^6$	4,87	0,97
	$1 \times 10^5$	6,03	1,07
	$1 \times 10^4$	7,17	2,13
Kontrol	0	27,10	1,32



Şekil 4.18. AyAk (Aydın-Akbük) suşunun *Galleria mellonella* üzerinde denenen 4 konsantrasyonu ve kontrol grubuna göre mortalite değerleri.

Çizelge 4.16. AyAk (Aydın-Akbük) suşunun *Galleria mellonella* larvalarına uygulanan konsantrasyonları ve gerçekleştirdikleri ortalama ölüm zamanları.

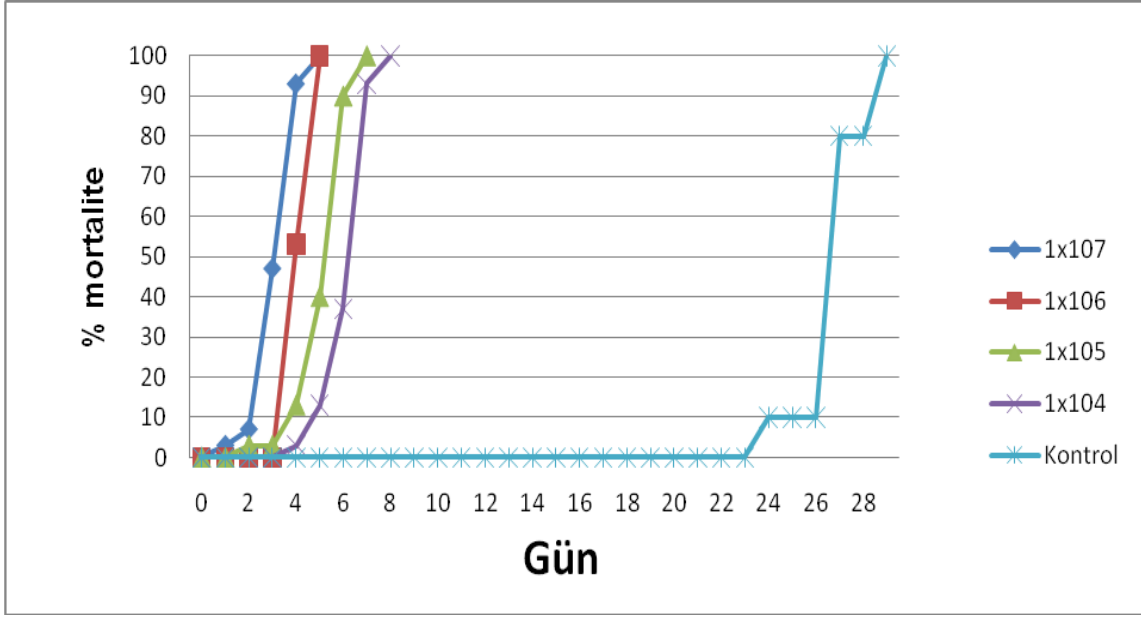
Fungus Suşu	Uygulanan Doz (kon/ml)	Ortalama ölüm zamanı (gün)	Standart sapma
AyAk	$1 \times 10^7$	4,20	1,10
	$1 \times 10^6$	4,97	0,72
	$1 \times 10^5$	5,80	0,85
	$1 \times 10^4$	6,77	1,46
Kontrol	0	27,10	1,32



Şekil 4.19. Erz suşunun (Erzincan) *Galleria mellonella* üzerinde denenen 4 konsantrasyonu ve kontrol grubuna göre mortalite değerleri.

Çizelge 4.17. Erz (Erzincan) suşunun *Galleria mellonella* larvalarına uygulanan konsantrasyonları ve gerçekleştirdikleri ortalama ölüm zamanları.

Fungus Suşu	Uygulanan Doz (kon/ml)	Ortalama ölüm zamanı (gün)	Standart sapma
Erz	$1 \times 10^7$	1,93	0,64
	$1 \times 10^6$	3,17	0,53
	$1 \times 10^5$	4,17	1,05
	$1 \times 10^4$	4,57	1,14
Kontrol	0	27,10	1,32



Şekil 4.20. KVL 03-129 (standart suş) suşunun *Galleria mellonella* üzerinde denenen 4 konsantrasyonu ve kontrol grubuna göre mortalite değerleri.

Çizelge 4.18. KVL 03-129 (standart suş) suşunun *Galleria mellonella* larvalarına uygulanan konsantrasyonları ve gerçekleştirdikleri ortalama ölüm zamanları.

Fungus Suşu	Uygulanan Doz (kon/ml)	Ortalama ölüm zamanı (gün)	Standart sapma
KVL 03-129	$1 \times 10^7$	3,55	0,85
	$1 \times 10^6$	4,47	0,51
	$1 \times 10^5$	5,50	1,04
	$1 \times 10^4$	6,53	0,89
Kontrol	0	27,1000	1,32

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada *Galleria mellonella* larvaları üzerinde *Beauveria bassiana*'nın 10 farklı izolasyonunun ve standart bir suşun, 4'er konsantrasyonunun etkileri araştırılmıştır.

Topraktan entomopatojen fungus suşlarının izolasyonunda *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) ve *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) gibi hassas böcekler kullanılmaktadır (Meyling and Eilenberg, 2007). Ülkemizde mevcut 4.700.000 kadar arı kolonilerinin yaklaşık 600.000 adedinin *Galleria mellonella* ile farklı yoğunluklarda bulaşık durumda olması (Akyol, 2008) nedeniyle çalışmamızda hedef organizma olarak *Galleria mellonella* tercih edilmiştir.

Entomopatojen fungusların izolasyonu, doğadan farklı yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Bu çalışmada, *Galleria* tuzak yöntemi ve toprak seyreltme yöntemi uygulanmıştır. *Galleria* tuzak yöntemi ile izole edilen fungus sayısı, toprak seyreltme yöntemine göre daha fazla bulunmuştur. Bu sonuç, *Galleria* tuzak yönteminin daha duyarlı bir yöntem olduğunu göstermektedir. Bu yöntem ilk olarak Bedding ve Akhurst tarafından, topraktaki entomopatojen nematodların *Galleria* larvaları kullanılarak tespit edilmesi için geliştirilmiş ve ardından Zimmermann (1986) ile Mietkiewski ve arkadaşları bu yöntemin entomopatojen fungusların izolasyonunda da başarılı olduğunu belirtmişlerdir (Barker and Barker, 1998). Keller ve arkadaşları (2003) yaptıkları bir çalışmada bu yöntemin daha etkili olduğunu belirtmişlerdir. Meyling (2007)'de *Galleria* tuzak yönteminin, toprak seyreltme yöntemine göre daha avantajlı olduğunu belirtmiştir. Toprak seyreltme yönteminde daha az toprak örneği kullanılması nedeniyle entomopatojen funguslara rastlamanın zorlaştığı; seyreltme ile spor sayısının daha da azaldığı, ayrıca diğer fırsatçı saprofitik fungusların besiyerinde üremelerinin bu yöntemi dezavantajlı duruma soktuğunu belirtmiştir. *Galleria* tuzak yönteminde ise daha fazla miktarda toprak kullanılması entomopatojenlerin izolasyonu için bu yöntemi daha seçici kılmaktadır (Meyling, 2007). Kessler ve arkadaşları da (2004) yaptıkları çalışmada *Galleria* tuzak yönteminin toprak seyreltme yöntemine göre daha hassas bir yöntem olduğunu vurgulamıştır. Dhoj ve arkadaşları (2008), 2002-2005 yılları arasında Nepal'den

46 toprak örneğinden *Galleria* tuzak yöntemi ve toprak seyreltme yöntemi kullanarak entomopatojen fungus izole etmeye çalışmışlardır. Sonuçta *Galleria* tuzak yöntemiyle 78 entomopatojen fungus örneği toprak seyreltme yöntemi ile 5 entomopatojen fungus örneği izole etmişlerdir. Bizim bulgularımız da bu araştırmacılarınkine paralellik göstermektedir.

Toprak, entomopatojenik funguslar için klasik izolasyon yeridir (Meyling and Eilenberg, 2007) ve birçok entomopatojen fungus, hem işlenmiş toprakta hem de daha doğal habitatlarda bulunabilir (Klingen et al., 2002; Keller et al., 2003; Meyling and Eilenberg, 2006). Bu çalışmada 48 *B. bassiana* ve 1 *B. brongniartii* izole edilmiş olup *Metarhizium spp.*'leri saptanamamıştır. Bu sonuç bize denenen topraklarda *Metarhizium spp.*'lerinin olmadığını gösterebilir. Ayrıca Şahin (2006)'nin yaptığı çalışmada, Kahramanmaraş ilinden aldığı toprak örneklerinden 19 *Beauveria bassiana* izole etmiş fakat *Metarhizium spp.* izole edememiştir. Bu bulgu bizim bulduğumuz sonuçla paralellik göstermektedir. Yapılan kaynak araştırmasında da ülkemiz topraklarında *Metarhizium spp.*'ye ait başka bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada fungusların 28'i işlenmiş toprak örneklerinden 21'i ise işlenmemiş toprak örneklerinden izole edilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda entomopatojen fungusların farklı ülkelerde farklı habitatlarda değişik oranlarda bulunduğu belirtilmiştir. Meyling ve Eilenberg (2006) Danimarka'nın tarım alanlarındaki topraklarda *B. bassiana*'nın yaygın, *M. anisopliae*'nin seyrek olduğunu bulmuşlardır. Bu sonuç bizim bulgularımızla uyusmaktadır. Fakat Sun ve arkadaşları (2008), Çin'de yaptıkları çalışmada böcek patojeni fungusların, daha az işlenmiş meyve bahçesi topraklarında, işlenmiş tarım topraklarına göre daha çok olduğunu göstermişler ve Vanninen (1995)'de, Finlandiya topraklarında böcek patojeni fungusların orman topraklarında, tarım alanlarındaki topraklara göre daha fazla olduğunu belirtmiştir. Bütün bu çalışmalar sonucunda işlenmiş ve işlenmemiş topraklarda entomopatojen fungusların değişik oranlarda olabileceği anlaşılmaktadır.

*Galleria* tuzak yönteminde *B. bassiana*'nın *B. brongniartii*'ye göre daha fazla çıkması, *B. bassiana*'nın larvaları daha hızlı enfekte edip öldürmesi olabilir. Keller ve arkadaşları (2003), *Galleria* tuzak yönteminde *M. anisopliae* suşunu, *B.*

*brongniartii*'ye göre daha fazla izole etmişler. Onlar, *M. anisopliae*'nin *Galleria* larvalarını *B. brongniartii*'den daha hızlı öldürmesi olasılığını öne sürmüşlerdir. Bu bulgu, bizim çalışmamızda *Galleria* tuzak yönteminde *B. bassiana*'nın, *B. brongniartii*'ye göre neden daha fazla izole edildiğini açıklayabilir. Chase ve arkadaşları (1986) ise besiyerindeki 0,55 g/l dodinin sadece optimum düzeyde *B. bassiana*'nın izole edilmesine izin verdiğini, dodin miktarının 0.46 g/l'ye düşürüldüğünde *B. bassiana* yanısıra diğer entomopatojen fungus suşlarının da izolasyonuna izin verdiğini bulmuşlardır (Chase et al., 1986). Bu çalışmada SDA besiyerine 0.46 g/l dodin eklenerek *B. bassiana* yanısıra *B. brongniartii* izole edilmiş ve bu sonuç Chase ve arkadaşlarının bulgularına uygunluk göstermiştir.

Bu çalışmada izole edilen *Beauveria bassiana* suşları deney düzeneği başlatılmadan önce *Galleria* larvaları üzerinde denenmiş, bunlar içerisinde en enfektif olan 10 örnek seçilmiştir. Yapılan deneyde bu suşların ve tip türün farklı 4 dozu ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$  ve  $1 \times 10^4$ ) kullanılmış, Tween 80 solüsyonunun *Galleria* larvalarının yaşam süreleri üzerinde bir etkisi olup olmadığını anlamak ve enfeksiyona uğratılmamış larvaların, dozlara maruz bırakılmış olanlara göre sağlıklı olduğunu göstermek için kontrol grubu oluşturulmuştur. Genellikle bu tarz çalışmalarda kullanılan doz aralığı konağa ve uygulama şekline göre değişmekle birlikte her 10 böcek için  $1 \times 10^4$  -  $1 \times 10^8$  kon/ml arasında değişen miktarlar kullanılır. Bu gibi deneylerde hedef canlının üzerinde farklı dozların denenmesindeki amaç virulansta oluşabilecek küçük değişiklikleri gözlemleyebilmektir (Hicks et al., 2001; Brownbridge et al., 2001; De La Rosa et al., 2002; Klingen et al., 2002; Luz et al., 2004).

Çalışmada kullanılan standart suş KVL 03-129 (ARSEF 8032), ARS entomopatojenik fungus koleksiyonundan bir suş olup, 18 Eylül 2002 tarihinde Nicolai V. Meyling tarafından tarım bölgesi toprağından *Galleria* tuzak yöntemi kullanılarak izole edilmiş bir suşdur. Türkiye topraklarından izole edilen suşlarla aynı yöntemle izole edilmesi, yapılan patojenite deneylerinde sağlıklı bir sonucun ortaya çıkmasını sağlamıştır. Çünkü biyolojik kontrol çalışmalarında entomopatojen fungusların biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılmalarında, homolog konaklardan izole edilen suşların daha başarılı olduğu belirtilmiştir (Hicks et al., 2001; Pliz et al., 2007; Bugeme et al., 2008). Ayrıca biyolojik

kontrol çalışmalarında hedef organizma ile aynı orjinli ajan aramak yaygın olmakla birlikte hedef zararlının doğal alanından gelmemiş doğal düşmanlarla da başarılı kontroller elde edilmiştir (Hicks et al., 2001). Klingen ve arkadaşları (2002), yaptıkları bir çalışmada *M. anisopliae* suşunun (ARSEF 5520) *G. mellonella*'ya oldukça patojen olduğunu ancak tuzak yönteminde *Delia floralis* kullanılarak izole edilmiş bir suş olmasına rağmen *Delia floralis* larvalarına patojen olmadığını gözlemlemişlerdir.

Kontrol ajanı başka bölgeleden getirilecekse getirileceği alana uyum sağlama şansının ve zararlı karşısında göstereceği performansın ne olacağının tahmin edilmesi gerekmektedir. Herhangi bir alanda başarılı olan bir ajan, başka yerde iyi bir sonuç vermeyebilir (Hansoylu, 2003). Ayrıca çevre güvenliği ve ekosistem dengesi göz önüne alındığında bir mikrobiyal kontrol programında entomopatojen fungusların doğal suşlarının kullanılmasının daha uygun olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Beron and Diaz, 2005). Bu çalışmada da ülkemizdeki zararlılara karşı Türkiye topraklarından izole edilen suşların daha başarılı olacağı düşünülerek 10 farklı *B. bassiana* suşu kullanılmıştır.

Seçilen bu 10 suşun ve standart suşun denenen tüm dozları *Galleria mellonella* larvaları üzerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yüksek oranda başarılı bulunmuştur (Şekil 4.10-4.20). Klingen ve arkadaşları (2002), *B. bassiana*'nın 3 farklı suşunun  $1 \times 10^7$  kon/ml dozunu *Mamestra brassicae* üzerinde denemişler ve kontrol grubuna göre yüksek oranda başarılı bulmuşlardır. Trudel ve arkadaşları (2007), 6 farklı *B. bassiana* suşunun  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  ve  $1 \times 10^{10}$  kon/ml dozlarını *Pissodes strobi* türünde denemişler ve kontrol grubuna göre başarılı mortalite sonucu elde etmişlerdir. Bizim bulgularımız da bu araştırmacılarla paralellik göstermektedir.

Bu çalışmada, *Galleria mellonella* deneylerinde tüm fungus suşlarında en kısa sürede en yüksek mortalite, her fungusun en yüksek doz ( $1 \times 10^7$ ) uygulaması ile elde edilmiştir (Şekil 4.6). Kim ve Kim (2008) bir entomopatojen fungus olan *Lecanicillium attenuatum* suşunun 5 farklı dozunu ( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ) pamuk yaprak bitleri üzerinde denemişler ve en etkili dozun  $10^8$  kon/ml olduğunu bulmuşlardır. Santoro ve arkadaşları (2008), *B. bassiana*'nın çeşitli suşlarını *Alphitobius diaperinus* türü üzerinde denemişler ve yine en etkili dozun  $1 \times 10^8$

kon/ml olduğunu belirtmişlerdir. Bu sonuçlar bizim bulgularımızla uyuşmaktadır. Bu çalışmada denenen daha düşük dozlarda da *B. bassiana* suşlarının etkili olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.7-4.9). Kreutz ve arkadaşları (2004) *Beauveria bassiana*'nın 5 farklı suşunun 3 farklı dozunu ( $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ) *Ips typographus* L. üzerinde denemiş ve düşük konidiya dozlarında etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Deneyler süresince yapılan gözlemler sonucunda konsantrasyondaki artmaya bağlı olarak  $LT_{50}$  değerlerinde ve sporların gelişme süresinde azalma gözlenmiştir. Vu ve arkadaşları (2008)'da konidyal konsantrasyon yükseldikçe  $LT_{50}$  değerinde azalma olduğunu belirtmişlerdir. Luz ve arkadaşlarının (1999) yaptıkları çalışmada da böceklerle uygulanan konsantrasyondaki azalmaya bağlı olarak kadavra üzerinde sporların daha geç ve daha az miktarda oluştuğunu belirtmişlerdir. Bu bulgular bizim sonuçlarımızla paralellik göstermektedir.

Elde edilen  $LD_{50}$  ve  $LT_{50}$  sonuçlarına göre en etkili suşun Erz suşu olduğu, en zayıf etki gösteren suşun ise MerK suşu olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.3-4.7). Tüm fungus suşlarının en yüksek konsantrasyon uygulanması sonuçlarına göre Erz ve DenK1 suşu deneklerin % 50'sini 2. ve 3. gün sonunda öldürdükleri gözlenmiştir (Çizelge 4.4). Birçok biyolojik kontrol uygulama çalışmalarında da belirtildiği gibi, bu başarılı bir sonuç olarak kabul edilmektedir (Miranpuri and Khachatourians, 1995; Liu et al., 2002; Hansoylu, 2003). Ayrıca DenK1 suşunun en yüksek ve en düşük dozda standart suşa göre daha etkili olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.4, Çizelge 4.7). En düşük dozda en zayıf etki gösteren suş ise BarK2 suşudur (Çizelge 4.7). Ancak yapılan istatistiksel çalışmalar, izole edilen suşların ve standart suşun *Galleria mellonella* larvalarına karşı etkileri ya da biyolojik kontrol ajanı olarak potansiyellerinin önemli bir fark göstermediğini işaret etmiştir. Bu sonuç başka araştırmacılar tarafından elde edilen sonuçlarla da uyuşmaktadır (Studdert and Kaya, 1990b; Hansoylu, 2003). Çalışmalarında, *Galleria mellonella* larvaları üzerinde denenen *B. bassiana*'nın farklı suşlarının mortalite sonuçları arasında anlamlı fark olmadığını bulmuşlardır. Ancak başka bir çalışmada da, *Beauveria bassiana*'nın da bulunduğu 4 fungus türünün her birinin farklı izolatları, denenen konak organizmada çok farklı mortalitelere neden olmuştur (Bello et al., 2000).

Sonuçta denenen bu 10 *B. bassiana* suşunun ve standart suşun *G. mellonella* larvaları üzerinde başarılı mortalite sağladığı gözlenmiştir. Yapılan istatistiksel testlerin ışığında larvalar üzerinde denenen en yüksek dozun her suşta en başarılı kontrol sağladığı bulunmuştur. Bu sonuç, başka araştırmacıların yaptığı çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermektedir (Vänninen et al., 1999; Liu et al., 2002; Hansoylu, 2003). Fungus suşlarının etkileri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermediği bulunmuş, fakat genel olarak bakıldığında en başarılı suşun Erz suşu olduğu, en başarısız suşun ise MerK suşu olduğu bulunmuştur.

Ancak yapılan bu çalışmalar laboratuvar koşullarında sabit bir sıcaklıkta, yüksek nem ve karanlık ortamda tutularak yapılmıştır. Bu etmenlerin entomopatojen fungusların patojenitesi üzerinde duruma göre olumlu ya da olumsuz etkileri vardır. Çünkü patojenite, sadece entomopatojen fungusun biyokimyası, fizyolojisi ve hastalık gelişiminin moleküler biyolojisine bağlı olmaz aynı zamanda çevreye de bağlıdır. Bu etmenler içerisinde bağıl nem, UV ışınları, sıcaklık ve besin mevcudiyeti başarılı bir mikoinsektisidin performansını etkiler (Chelico et al., 2006). Birçok araştırmacı UV ışınlarının entomopatojen fungusların konidialarını inaktif hale getirdiğini belirtmiştir (Chelico et al., 2006; Fernandes et al., 2007). Ayrıca Wojda ve arkadaşlarının (2009) belirttiklerine göre *Galleria mellonella* larvaları koloni halinde yaşayan böcekler olup, bu larvalar bir araya geldiğinde ortam sıcaklığı 40 °C ye kadar yükselir ve böylece patojenlere karşı bir koruma sağlamış olurlar. Bu sıcaklık fungus enfeksiyonunun gelişimi için olumsuz etki yaratmaktadır.

Daha sonraki çalışmalarda, çevresel koşulların ve böcek davranışlarının, denenen *B. bassiana* suşlarının patojeniteleri üzerinde nasıl bir etki yarattığına bakılması amaçlanmaktadır. Ayrıca bu suşların farklı zararlı böcekler üzerindeki etkilerinin incelenmesinin sonraki biyolojik kontrol çalışmaları için faydalı veriler oluşturabileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abebe, H., 2002, Potential of entomopathogenic fungi for the control of *Macrotermes subhyalinus* (Isoptera: Termitidae), Ph.D. thesis, Addis Ababa University, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ethiopia, 161p.
- Ali-Shtayeh, M.S., Mara'i, Abdel-Basit B.M., and Jamous, R.M., 2002, Distribution, occurrence and characterization of entomopathogenic fungi in agricultural soil in the Palestinian area, *Mycopathologia*, 156, 235-244.
- Akhurst, R., and Smith, K., 2002, Regulation and Safety. Entomopathogenic Nematology. Gaugler, R. (ed), CABI, Wallingford UK, pp. 311-332.
- Akyol, E., Korkmaz, A., 2008, Peteklerin büyük mum güvesi (*Galleria mellonella* L.)'ne karşı korunmasında -5 °C soğuk uygulamasının etkisi, *Uludağ Arıcılık Dergisi*. 8(1), 26-29.
- Asensio, L., Carbonell, T., Lopez-Jimenez, J.A., and Lopez-Llorca, L.V., 2003, Entomopathogenic fungi in soils from Alicante province, *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1(3), 34-75.
- Bajwa, W.I., and Kogan, M., 2002, Compendium of IPM Definitions, IPPC Publication 998. <http://ippc.orst.edu/IPMdefinitions/>.
- Barker, C.W., and Barker, G.M., 1998, Generalist entomopathogens as biological indicators of deforestation and agricultural land use impacts on Waikato soils, *New Zealand Journal of Ecology*, 22(2): 189-196.
- Bello, G.D., Padin, S., Lastra, C.L., Fabrizio, M., 2000, Laboratory evaluation of chemical biological control of rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) stored in grains, *J. of stored Products Research*, 37(1), 77-84.
- Beron, C.M., and Diaz, B.M., 2005, Pathogenicity of hyphomycetous fungi against *Cyclocephala signaticollis*, *BioControl*, 50, 143-150.
- Bidochka, M.J., Kasperski, J.E., and Wild, G.A.M., 1998, Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats, *Can. J. Bot.*, 76(7): 1198-1204.
- Bottrell, D. G., and P. L. Adkisson, 1977, Cotton insect pest management. *Annual Review of Entomology* 22:451-481.
- Brownbridge, M., Costa, S., Jaronski, S.T., 2001, Effects of *in Vitro* Passage of *Beauveria bassiana* on Virulence to *Bemisia argentifolii*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 77, 280-283

- Bugeme, D.M., Maniania, N.K., Knapp, M., Boga, H.I., 2008, Effect of temperature on virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to *Tetranychus evansi*, *Exp. Appl. Acarol.*, 46, 275-285.
- Butt, T.M., Jackson, C., and Magan, N., 2001, Introduction – Fungal biological control agents: progress, problems and potential. *Fungi as biocontrol agents*. Butt, M.T., Jackson, C., and Magan, N., (eds.), CABI, New York. pp. 1-22.
- Butt, T.M., and Goettel, M.S., 2000, Bioassays of entomopathogenic fungi. *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. Navon, A., and Ascher, K.R.S. (eds.), CABI, New York. pp. 141-196.
- Chandler, D., Hay, D., Reid, A.P., 1997, Sampling and occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in UK soils, *Applied Soil Ecology*, 5, 133-141.
- Charnley, A.K., 1991, Microbial pathogens and insect pest control, *Letters in Applied Microbiology*, 12, 149-157.
- Chase, A.R., Osborne, L.S., and Ferguson, V.M., 1986, Selective isolation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an artificial potting medium, *Florida Entomologist*, 69(2):285-292.
- Chelico, L., Haughian, J.L., and Khachatourians, G.G., 2006, Nucleotide excision repair and photoreactivation in the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Beauveria nivea*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces farinosus* and *Verticillium lecanii*, *J. of Appl. Microbiol.*, 100, 964-972.
- Cote, J.-C., 2007, How Early Discoveries about *Bacillus thuringiensis* Prejudiced Subsequent Research and Use. *BIOLOGICAL CONTROL A Global Perspective Case Studies from Around the World*. Vincent, C., Goettel, M.S., and Lazarovits, G. (eds), CABI, Wallingford UK, pp. 169-178.
- Çağlar, S.S., 1991, Karasinek *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae)' da tetramethrin'e dirençlilik düzeyi ve hayat tablosu çalışmaları. *Doğa Turkish Journal of Zoology* 15, 91-97.
- Davidson, G., Phelps, K., Sunderland, K.D., Pell, J.K., Ball, B.V., Shaw, K.E., and Chandler, D., 2003, Study of temperature–growth interactions of entomopathogenic fungi with potential for control of *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata) using a nonlinear model of poikilotherm development, *Journal of Applied Microbiology*, 94, 816–825.
- Deacon, J.W., 2005, *Fungal Biology*, Blackwell Publishing, Oxford Uk, 4th edition, 371 pp.
- DeBach, P., and Rosen, D., 1991, *Biological control by natural enemies*. Cambridge University Press, Cambridge, 440 pp.

- De La Rosa, W., Segura H.R., Barrera, J.F., Williams, T., 2000, Laboratory evaluation of the impact of entomopathogenic fungi on *Prorops nasuta* (Hymenoptera: Bethyridae), a parasitoid of Coffee Berry Borer, *Environ. Entomol.*, 29, 126-131.
- De La Rosa, W., Lopez F.L., and Liedo, P., 2002, *Beauveria bassiana* as a pathogen of the mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions, *J. Econ. Entomol.*, 95(1): 36-43.
- De Melo, D.R., Fernandes, E.K.K., Da Costa, G.L., Scott, F.B., and Bittencourt, V.R.E.P., 2008, Virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to *Ctenocephalides felis felis*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1149: 388–390.
- Demir, İ., 2008, Funguslar ve biyolojik mücadele. Entomopatojenler ve biyolojik mücadele. Demirbağ, Z. (ed.), Esen Ofset Matbaacılık, Trabzon. ss. 175-244.
- Demirbağ, Z., 2008, Biyolojik mücadeleye genel bakış. Entomopatojenler ve biyolojik mücadele. Demirbağ, Z. (ed.), Esen Ofset Matbaacılık, Trabzon. ss. 1-50.
- Dent, D., 2000. *Insect Pest Management*. Cabi Bioscience Ascot, UK, 432 pp.
- Dhoj GC, Y., Keller, S., Nagel, P., Kafle, L., 2008, Virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* Against Common White Grubs in Nepal, *Formosan Entomol.*, 28: 11-20.
- Ehlers, R.-U., 2005, Forum on Safety and Regulation. Nematodes as Biocontrol Agents. Grewal, P.S., Ehlers, R.-U., and Shapiro-Ilan, D.I. (eds.), CABI, Cambridge. pp. 107-114.
- Eilenberg, J., 2006, Concepts and visions of biological control. An Ecological and Societal Approach to Biological Control. Eilenberg, J., and Hokkanen, H.M.T. (eds.), Springer, Netherlands. pp. 1-11.
- Eilenberg, J., Hajek, A., and Lomer, C., 2001, Suggestions for unifying the terminology in biological control, *BioControl*, 46: 387–400.
- Eken, C., Tozlu, G., Dane, E., Çoruh, S., ve Demirci, E., 2006, Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hypomycetes) to larvae of the small poplar longhorn beetle, *Saperda populnea* (Coleoptera: Cerambycidae), *Mycopathologia*, 162: 69-71.
- Ertürk, Ö., 2008, Protozoonlar ve biyolojik mücadele. Entomopatojenler ve biyolojik mücadele. Demirbağ, Z. (ed.), Esen Ofset Matbaacılık, Trabzon. ss. 289-325.
- Fang, W., Leng, B., Xiao, Y., Jin, K., Ma, J., Fan, Y., Feng, J., Yang, X., Zhang, Y., and Pei, Y., 2005, Cloning of *Beauveria bassiana* Chitinase Gene *Bbchit1* and Its Application To Improve Fungal Strain Virulence, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(1), p. 363–370.

- Fernandes, E.K.K., Rangel, D.E.N., Moraes, A.M.L., Bittencourt, V.R.E.P., Roberts, D.W., 2007, Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria spp.* isolates, *Journal of Invertebrate Pathology* 96, 237-243.
- Floate, K.D., Bérubé, J., Boiteau, G., Dosdall, L.M., van Frankenhuyzen, K., Gillespie, D.R., Moyer, J., Philip, H.G., and Shamoun, S., 2002, Pesticides and biological control. *Biological Control Programmes in Canada*. Mason, P.G., and Huber, J.T. (eds), CABI, Oxford. pp. 4-14.
- Fuxa, J.R. 1987, Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM, *Ann. Rev. Entomol.*, 32:225-251
- Georghiou, G.P., 1986, The Magnitude of Resistance Problem. Pesticide resistance strategies and tactics for management. National research council (US). National Academy Press Washington, D.C. 14-43 p.
- Glazer, I., and Lewis, E.E., 2000, Bioassays of entomopathogenic nematodes. *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. Navon, A., and Ascher, K.R.S. (eds.), CABI, New York. pp. 229-248.
- Goettel, M.S., and Inglis, G.D., 1997, Fungi: Hyphomycetes in *Manual of Techniques in Insect Pathology* (L. Lacey ed), p.213-248, Academic Press, San Diego, C.A. p.409.
- Griffin, C.T., Boemare, N.E., and Lewis, E.E., 2005, Biology and Behaviour. Nematodes as biocontrol agents. Grewal, P.S., Ehlers, R.-U., and Shapiro-Ilan, D.I. (eds), CABI, Cambridge, 47-64pp.
- Hajek, Ann E., 2004, *Natural Enemies: An Introduction to Biological Control*, New York, 338p.
- Hall, R.A., and Papierok, B., 1982, Fungi as biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance. *Parasitology*. Anderson, R.M., and Canning, E.U., (eds.), Cambridge University, Great Britain. 84, pp. 205-240.
- Hansoylu, R.B., 2003, Türkiye Topraklarından Elde Edilen Entomopatojen Fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Suşlarının Biyolojik Kontrol Ajanı Olarak Kullanılması. Bilim Uzmanlığı Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 84s.
- Hasenekoğlu, İ., 1991, Toprak mikrofungusları, Atatürk Üniversitesi Yayınları, No:689, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Yayınları, No:II, Cilt:II, s. 39-46.
- Hazır, S., Keskin, N., Stock, S.P., Kaya, H.K., and Özcan, S., 2003a, Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Turkey, *Biodiversity and Conservation*, 12: 375–386.

- Hazır, S., Kaya, H.K., Stock, S.P., Keskin, N., 2003b, Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for Biological Control of Soil Pests
- Hegedus, D.D., and Kachaturians G.G., 1993, Identification of Molecular Variants in Mitochondrial DNAs of Members of the Genera *Beauveria*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, and *Metarhizium*, Appl. Environ. Microbiol., 59(12), p. 4283-4288.
- Hicks, Barry J., Watt, Allan D., Cosens, D., 2001, The potential of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) as a biological control agent against to pine beauty moth, *Panolis flammea* (Lepidoptera: Noctuidae). Forest Ecology and Management 149, 275-281.
- Hu, G., and Leger, R.J.St., 2002, Field Studies Using a Recombinant Mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) Reveal that It Is Rhizosphere Competent, Applied and Environmental Microbiology, 68(12), p. 6383–6387.
- Hughes, W.O.H., Thomsen, L., Eilenberg, J., and Boomsma, J.J., 2004, Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, Journal of Invertebrate Pathology, 85, 46–53.
- Humber, R.A., 1998, Entomopathogenic Fungal Identification. APS/ESA Joint Annual Meeting. [http://www.ppru.cornell.edu/mycology/Insect\\_mycology.html](http://www.ppru.cornell.edu/mycology/Insect_mycology.html).
- Inglis, G.D., Goettel, M.S., Butt, T.M., and Strasser, H., 2001, Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pests. Fungi as biocontrol agents. Butt, M.T., Jackson, C., and Magan, N., (eds.), CABI, New York. pp. 23-70.
- Internet: <http://arsef.fpsnl.cornell.edu/pictures/beauveria2.gif>.
- Internet: [www.etae.gov.tr/yayin-ek/ciftci-bro/131-ciftcibro.pdf](http://www.etae.gov.tr/yayin-ek/ciftci-bro/131-ciftcibro.pdf).
- Jackson, T.A., and Saville, D.J., 2000, Bioassays of replicating bacteria against soil-dwelling insect pests. Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. Navon, A., and Ascher, K.R.S. (eds.), CABI, New York. pp. 73-94.
- Jaglan, R.S., and Singh, R., 2007, History of integrated pest management. Entomology: Novel Approaches, Jain, P.C. and Bhargava, M.C. (eds), New India Publishing, New Delhi, pp. 1-18.
- Jones, K.A., 2000, Bioassays of entomopathogenic viruses. Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. Navon, A., and Ascher, K.R.S. (eds.), CABI, New York. pp. 95-140.

- Kalyoncu, L., Üstüner, T., Aktümsek, A., 2005, Farklı Sıcaklık Derecelerinin *Galleria mellonella* (L.) Pupa larının Açılma Oranına Etkileri, Biyoloji Bölümü, S Ü Fen Ed. Fak. Fen Derg., Konya, Sayı 26, 71-74.
- Kamp, A.M., and Bidochka, M.J., 2002, Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars, Letters in Applied Microbiology, 35, 74–77.
- Katı, H., 2008, Bakteriler ve biyolojik mücadele. Entomopatojenler ve biyolojik mücadele. Demirbağ, Z. (ed.), Esen Ofset Matbaacılık, Trabzon. ss. 109-174.
- Kaygın, A.T., Yıldız, Y., 2006, Bartın Yöresi bal arısı (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera, Apidae) zararlıları, Orman Fakültesi, ZKÜ Bartın Orman Fakültesi Dergisi, Sayı 10, 64-73.
- Kogan, M., 1998, Integrated Pest Management: Historical perspectives and contemporary developments, Annu. Rev. Entomol., 43:243–70.
- Keller, S., Kessler, P., and Schweizer, C., 2003, Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metharhizium anisopliae*, BioControl, 48: 307–319.
- Kessler, P., Enkerli, J., Schweizer, C., and Keller, S., 2004, Survival of *Beauveria brongniartii* in the soil after application as a biocontrol agent against the European cockchafer *Melolontha melolontha*, BioControl, 49: 563–581.
- Kim, J.J., Kim K.C., 2008, Selection of a highly virulent isolate of *Lecanicillium attenuatum* against cotton aphid, Journal of Asia-Pacific Entomology, 11, 1-4.
- Klingen, I., and Haukelan, S., 2006, The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. An Ecological and Societal Approach to Biological Control. Eilenberg, J., and Hokkanen, H.M.T. (eds.), Springer, Netherlands. pp. 145-212.
- Klingen, I., Meadow, R., and Aandal, T., 2002, Mortality of *Delia floralis*, *Galleria mellonella* and *Mamestra brassicae* with insect pathogenic hyphomycetous fungi, J. Appl. Ent., 126, 231-237.
- Kreutz, J., Vaupe, O., and Zimmermann, G., 2004, Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Against the spruce bark beetle, *Ips typographus* L., in the laboratory under various conditions, JEN, 128(6), 384-389.
- Kuyucu, A.C., 2007, İnsektisit Direncinin Karasinek, *Musca Domestica* L. (Diptera: Muscidae)'nın uyumsal özellikleri üzerindeki etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 94s.

- Langewald, J., Mitchell, J.D., Maniania, N.K., and Kooyman, C., 2003, Microbial Control of Termites in Africa. Biological control in IPM systems in Africa. Neuenschwander, P., Borgemeister, C., and Langewald, J. (eds), CABI, Wallingford UK, 227-242 pp.
- Lezama-Gutierrez, R., Hamm, J.J., Molina-Ochoa, J., Lopez-Edwards, M., Pescador-Rubio, A., Gonzalez-Ramirez, M., and Styer, E.L., 2001, Occurrence of entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mexican states of Michoacan, Colima, Jalisco and Tamaulipa, Florida Entomologist, 84(1) pp. 23-30.
- Liu, H., Skinner, M., Parker, B.L., Brownbridge, M., 2002, Pathogenicity of *Beauveria bassiana*; *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) and other entomopathogenic fungi against *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae), J. Econ. Entomol., 95(4): 675-681.
- Luz, C., Silva, I.G., Cordeiro, C.M.T., Tigano, M.S., 1999, Sporulation of *Beauveria bassiana* on cadavers of *Triatoma infestans* after infection at different temperatures and doses of inoculum, Journal of Invertebrate Pathology, 73, 223-225.
- Luz, C., Rocha, L.F.N., Nery G.V., 2004, Detection of Entomopathogenic Fungi in Peridomestic Triatomine-Infested Areas in Central Brazil and Fungal Activity Against *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae), Neotropical Entomology, 33(6): 783-791.
- Meyling, N.V., 2007, Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment. Laboratory manual. <http://orgprints.org/11200>.
- Meyling V.M., and Eilenberg, J., 2007, Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control, Biological Control, 43, 145-155.
- Meyling, N.V., and Eilenberg J., 2006, Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. Agriculture Ecosystems and Environment, 113, 336-341.
- Mietkiewski, R.T., Pell, J.K., Clark, S.T., 1997, Influence of pesticide use on the natural occurrence of entomopathogenic fungi in arable soils in the UK field and laboratory comparisons, Biocontrol Science and Technology, 7, 565-575.
- Miranpuri, G.S., and Khachatourians, G.C, 1995, Entomopathogenicity of *Beauveria bassiana* toward flea beetles, *Phyllotreta crucifera goeze* (Col., Chrysomellidae), J. Appl. Ent. 119: 167-170.
- Moazami, N., 2002, Biopesticide Production. In: Encyclopedia of life support systems, EOLSS. <http://www.eolss.net/ebooks/Sample%20Chapters/C17/E6-58-05-08.pdf>.

- Monzon, A.J., Guharay, F., Kingen, I., 2008, Natural occurrence of *Beauveria bassiana* in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) populations in unsprayed coffee fields, *Journal of Invertebrate Pathology*, 97, 134-141.
- Navon, A., 2000, Bioassays of *Bacillus thuringiensis* products used against agricultural pests. Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. Navon, A., and Ascher, K.R.S. (eds.), CABI, New York. pp. 1-24.
- Nalçacıoğlu, R., 2008, Virüsler ve biyolojik mücadele. Entomopatojenler ve biyolojik mücadele. Demirbağ, Z. (ed.), Esen Ofset Matbaacılık, Trabzon. ss. 51-108.
- Oğurlu, İ., 2000, Biyolojik Mücadele, SDÜ Basımevi, Isparta, 438s.
- Oudor, G.I., Smith S.M., Chandi, E.A., Karanja, L.W., Agano, J.O., Moore, D., 2000, Occurrence of *Beauveria bassiana* on insect pests of stored maize in Kenya, *Journal of Stored Products Research*, 36, 177-185.
- Padjama, G.K.V., 2001, Use of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (Moniliales: Deuteromycetes) for controlling termites, *Current Science*, 81(6), 647-647.
- Pedigo, L.P., 1996. *Entomology and Pest Management*. Prentice Hall Inc, 679pp.
- Pell, J.K., Eilenberg, J., and Hajek, A.E., 2001, Biology, ecology and pest management potential of entomophthorales. Fungi as biocontrol agents. Butt, M.T., Jackson, C., and Magan, N., (eds.), CABI, New York. pp. 71-154.
- Pliz, C., Wegensteiner, R., and Keller, S., 2007, Selection of entomopathogenic fungi for the control of the western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera*, *J. Appl. Entomol.*, 131(6), 426-431.
- Quesada-Moraga, E., Navas-Cortes, J.A., Maranhao, E.A.A., Ortiz-Urquiza, A., Santiago-Alvarez, C., 2007, Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils, *Mycological Research*, 111, 947-966.
- Ramos-Rodríguez, O., Campbell, J.F., Ramaswamy, S.B., 2007, Efficacy of the entomopathogenic nematode *Steinernema riobrave* against the stored-product insect pests *Tribolium castaneum* and *Plodia interpunctella*, *Biological Control*, 40, 15-21.
- Safavi, S.A., Shah, F.A., Pakdel, A.K., Rasoulilian, G.R., Bandani, A.R., and Butt, T.M., 2007, Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, *FEMS Microbiol Lett*, 270, 116-123.

- Saharayaj, K., and Namasivayam S.K.R., 2008, Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products, *African Journal of Biotechnology*, 7(12), pp. 1907-1910.
- Samson, R. A., Evans, H.C., and Latge, J.D., 1988, Atlas of entomopathogenic fungi. Springer Verlag, Berlin. pp. 187.
- Santaro, P.H., Neves, P.M.O.J., Alexandre, P.M., Sartori, D., Alves, L.F.A., Fungaro, M.H.P., 2008, Selection of *Beauveria bassiana* isolates to control *Alphitobius diaperinus*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 97, 83-90.
- Scholte, E.-J., Knols, B.G.J., Samson, R.A., and Takken, W., 2004, Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review, *Journal of Insect Science*, 4:19, 24 pp.
- Sezen, K., 2008, Nematodlar ve biyolojik mücadele. Entomopatojenler ve biyolojik mücadele. Demirbağ, Z. (ed.), Esen Ofset Matbaacılık, Trabzon. ss. 245-288.
- Shapiro-Ilan, D.I., Gardner, W.A., Fuxa, J.R., Wood, B.W., Nguyen, K.B., Adams, B.J., Humber, R.A., and Hall, M.J., 2003, Survey of Entomopathogenic Nematodes and Fungi Endemic to Pecan Orchards of the Southeastern United States and Their Virulence to the Pecan Weevil (Coleoptera: Curculionidae), *Environ. Entomol.*, 32(1): 187-195
- Shimazu, M., Sato, H., and Maehara, N., 2002., Density of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in forest air and soil, *Appl. Entomol. Zool.*, 37(1):19–26.
- Smart Jr., G.C., 1995, Entomopathogenic Nematodes for the Biological Control of Insects, Supplement to the *Journal of Nematology*, 27(4S): 529-534
- Sonia, R., Peveling, R., Nagel, P., Keller, S., 2005, The natural distribution of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in different regions and habitat types in Switzerland, *IOBC Bulletein*, 28(2), pp. 185-188.
- Sookar, P., Bhagwant, S., and Awuor Ouna, E., 2008, Isolation of entomopathogenic fungi from the soil and their pathogenicity to two fruit fly species (Diptera: Tephritidae). *J. Appl. Entomol.*, 132, 778–788.
- Stock, S.P., Pryor, B.M., and Kaya H.K., 1999, Distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in natural habitats in California, USA, *Biodiversity and Conservation*, 8: 535-549.
- Stock, S.P., and Hunt, D.J., 2005, Morphology and systematics of nematodes used in biocontrol. Nematodes as biocontrol agents. Grewal, P.S., Ehlers, R.-U., and Shapiro-Ilan, D.I. (eds.), CABI, Cambridge. pp. 3-44.

- Studdert, J.P., and Kaya, H.K., 1990a, Effect of water potential, temperature and clay coating on survival of *Beauveria bassiana* conidia in Loam and Peat soil, *J. of Invertebrate Pathology*, 55, 417-427.
- Studdert, J.P., and Kaya H.K., 1990b, Water potential, temperature and soil type on the formation of *Beauveria bassiana* soil colonies, *J. of Invertebrate Pathology*, 56, 380-386.
- Sun, B.-D., Yu, H.-Y., Chen, A.J., Liu, X.-Z., 2008, Insect-associated fungi in soils of field crops and orchards, *Crop Protection* 27, 1421-1426.
- Şahin, H., 2006, Çam Kesetirtılı (*Thaumetopoea pityocampa* (Den and Schiff)) (Lepidoptera:Thaumetopoeidae)'na karşı farklı entomopatogen fungus izolatlarının etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş. 29s.
- Torrado-Leon, E., Montoya-Lerma, J., and Valencia-Pizo, E., 2006, Sublethal effects of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius)(Hemiptera: Aleyrodidae) under laboratory conditions, *Mycopathologia*, 162: 411-419.
- Thomas, M.B. and Read, A.F., 2007, Can fungal biopesticides control malaria?, *Nature Microbiology Reviews*, 5: 377-383.
- Trudel, R., Lavallee R., Guertin, C., Cote, C., Todorova, S.I., Alfaro, R., and Kope, H., 2007, Potential of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) for controlling the white pine weevil, *Pissodes strobi* (Col., Curculionidae). *J. Appl. Entomol.*, 131(2), 90-97.
- Tutkun, E., Bosgelmez, A., 2003, Bal Arısı Zararlıları ve Hastalıkları Teshis ve Tedavi Yöntemleri. Bizim Büro Basımevi.
- Van Den Bosch, R., Messenger, P.S., Gutierrez, A.P., 1982, An Introduction to Biological Control, Plenum Press, New York, 225p.
- Van Driesche, R.G., Bellows Jr., T.S., 1996, Biological Control, An International Thomson Publishing, New York, 447p.
- Vänninen, I., Hokkanen, H., Tyni-Juslin, J., 1999, Attempts to control cabbage root flies *Delia radicum* L. and *Delia floralis* (Fall.) (Dipt.) *Anthomyiidae*, with entomopathogenic fungi; Laboratory and greenhouse tests, *J. Appl. Ent.*, 123, 107-113.
- Vänninen, I., 1995, Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: Effect of geographical location, habitat type and soil type, *Mycol. Res.*, 100, 93-101.
- Vänninen, I., Husberg, G.-B., Hokkanen, H.M.T., 1989, Occurrence of entomopathogenic fungi and entomoparasitic nematodes in cultivated soils in Finland, *Entomologica Fennica*, 53, 65-71.

- Veen, K.H., and Ferron, P., 1966, A selective medium for the isolation of *Beauveria tenella* and *Metarhizium anisopliae*, J. Insect. Pathol., 8:268-269.
- Vilcinskas, A., Matha, V., Götz, P., 1997a, Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites, J. of Insect Physiology, 43(5), p. 475-483.
- Vilcinskas, A., Matha, V., Götz, P., 1997b, Effects of the Entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*, J. Insect Physiol, 43(12), p. 1149-1159.
- Vu, V.H., Hong, S.I., and., Kim, K., 2007, Selection of Entomopathogenic Fungi for Aphid Control, J. of Biosci.and Bioeng., 104(6), 498-505.
- Waage, J.K., and Greathead, D.J., 1988, Biological control: challenges and opportunities, Phil. Trans. R. Soc. Lond., 318: 111-128
- Webster, J., and Weber, R.W.S., 2007, Introduction to Fungi, Cambridge University Press, New York, Third Edition, 701p.
- Wekesa, V.W., Maniania, N.K., Knapp, M., Boga, H.I., 2005, Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to the tobacco spider mite *Tetranychus evansi*, Experimental and Applied Acarology, 36, 41-50
- White, M.M., Lichtwardt, R.W., Colbo M.H., 2006, Confirmation and identification of parasitic stages of obligate endobionts (Harpellales) in blackflies (Simuliidae) by means of rRNA sequence data, Mycological Research, 110, 1070-1079.
- Wraight, S.P., Jackson, M.A., and Kock, S.L., 2001, Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. Fungi as biocontrol agents. Butt, M.T., Jackson, C., and Magan, N., (eds.), CABI, New York. pp. 253-288.
- Wojda, I., Kowalski, P., Jakubowicz, T., 2009, Humoral immune response of *Galleria mellonella* larvae after infection by *Beauveria bassiana* under optimal and heat-shock conditions, Journal of Insect Physiology, 55, 525-531.
- Xavier-Santos, S., Magalhães, B., Lima, E.A.L-A., 1999, Differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride* (Hyphomycetes), Revista de Microbiologia, 30:47-51.
- Yaman, M., Demirbağ Z., 1998, Biyolojik ajanların insektisidal etkilerini belirleme yöntemleri. Ekoloji Çevre Dergisi, 8, 11-14.
- Zimmermann, G., 2007a, Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*, Biocontrol Science and Technology, 17(5/6): 553-596.

- Zimmermann, G., 2007b, Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, *Biocontrol Science and Technology*, 17(9): 879-920.
- Zimmermann G., 1998. Suggestion for a standardized method for re-isolation of entomopathogenic fungi from soil using the bait method, *IOBC Bulletin*, 21(4), 289.
- Zimmermann, G., 1986, The *Galleria* bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil, *Journal of Applied Entomology*, 102, 213-215.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Yusuf DOĞAN

Doğum Yeri : ANKARA

Doğum Yılı : 01 / 01 / 1983

Medeni Hali : Bekar

### **Eğitim ve Akademik Durumu:**

Lise : 1996 - 1999 Fatih Sultan Mehmet Lisesi

Lisans : 2000 - 2005 Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : 2006 - Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Yabancı Dil : İngilizce

### **İş Tecrübesi:**