



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOĞAL ENTOMOPATOJEN FUNGUSLARIN
MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU

FATMA GÜL ÖZÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2012

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOĞAL ENTOMOPATOJEN FUNGUSLARIN
MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU

FATMA GÜL ÖZÇELİK

Bu tez,
Biyoloji Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS
derecesi için hazırlanmıştır.

KAHRAMANMARAŞ 2012

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Fatma Gül ÖZÇELİK tarafından hazırlanan “Doğal Entomopatojen Fungusların Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu” adlı bu tez, jürimiz tarafından 11 / 06 / 2012 tarihinde oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Özlem GÜVEN

Biyoloji Anabilim Dalı

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

.....

Prof. Dr. Metin DIĞRAK

Biyoloji Anabilim Dalı

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

.....

Doç. Dr. İsmail AKYOL

Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalı

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

.....

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. M. Hakkı ALMA

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

.....

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Fatma Gül Özçelik

Bu çalışma KSÜ Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 2011/8-3 YLS

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

DOĞAL ENTOMOPATOJEN FUNGUSLARIN MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

FATMA GÜL ÖZÇELİK

ÖZ

Bu çalışmada, Kahramanmaraş'ın merkez köylerindeki buğday tarlalarından ve Başkonuş ormanlık alanlarından alınan toprak örneklerinden izole edilen entomopatojen fungus izolatlarının uygun besiyeri ortamında gelişim karakteristikleri, morfolojik yapılarının mikroskopta incelenmesi ve moleküler karakterizasyon çalışması sonucunda *Beauveria bassiana*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Aspergillus flavus* ve *Penicillium* sp. oldukları tespit edilmiştir. Morfolojik karakterizasyonda izolatların çimlenme ve hif oluşturma süreleri, koloni geliştirme zamanları ve konidi, konidiyofor, phialid ölçümleri yapılırken, moleküler karakterizasyonda fungusların 18S ve ITS bölgesi PCR ile çoğaltıldıktan sonra gen sekansı yapılmıştır. Elde edilen sekans sonuçları Blast programı ile analiz edilerek türlerin doğruluğu teyit edilmiştir ve Mega 4.1 programı ile filogenetik ağaçları çizilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Morfolojik karakterizasyon, Moleküler karakterizasyon, ITS, 18S, *Beauveria bassiana*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium* spp. ve *Penicillium* sp.,

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı, Haziran /2012

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Özlem Güven

Sayfa sayısı: 53

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF NATURAL ENTOMOPATHOGENIC FUNGI

FATMA GÜL ÖZÇELİK

ABSTRACT

In this study, entomopathogen was isolated from soil samples collected from the central villages of Kahramanmaraş wheat fields and Başkonuş forests. Development characteristics of isolates on artificial medium, microscopic examination of the morphological structures and molecular characterization were performed. *Beauveria bassiana*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium* sp. were identified. Time of germination and hyphae production, colony color and development, shape of conidi, conidiophor and phialid were used for morphological characterizations. 18S and ITS region nucleotide sequences were used for molecular characterization of fungal isolates. Observed sequence results were compared with database sequence using Blast and phylogenetic tree was drawn using Mega 4.1 software.

Key Words: Morphological characterization, molecular characterization, ITS, 18S, *Beauveria bassiana*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium* spp. ve *Penicillium* sp.

Kahramanmaraş Sütçü İmam University
Institute for Graduate Studies in Science and Technology
Department of Biology / June 2012

Supervisor: Asst.Prof. Dr. Özlem GÜVEN

Page number: 53

DOĞAL ENTOMOPATOJEN FUNGUSLARIN MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Tarımsal ürünlerin üretim ve depolanması sırasında 1/3'lük kısmının böcekler tarafından tüketilmesi nedeniyle bu zararlılara karşı etkin bir mücadele yöntemi uygulanması gerekmektedir. Geniş spektrumlu ilaçların yoğun ve gelişigüzel kullanılması sonucu çevre ve insan sağlığına verdiği olumsuzluklar ve yan etkileri kendini sıkça göstermektedir. Bu yüzden tarımda zararlı böceklerle karşı alternatif yöntemlerin geliştirilmesi önem arz etmektedir. Zararlı böceklerin kontrolünde etkin bir yöntem olan biyolojik mücadelede predatör ve parazit kullanmanın yanında fungus, virüs, bakteri, protozoa ve nematodlar gibi etkili, çevreye ve insan sağlığına dost mikrobiyal patojenlerde kullanılmaktadır. Entomopatojen funguslar, tarım zararlısı böceklerde hastalık etmeni olan patojenlerden en yaygın gözlenenleridir. Uygun ortam koşulları altında fungal hastalıkların görülmesi belirgin epizootiğe yol açar ve geniş alanlarda spesifik zararlı böcek popülasyonunu azaltır. Entomopatojen funguslar ile ölmüş böcekler çoğunlukla bulundukları bitki üzerinden toprağa düşecekleri için toprak ortamı önemli fungus rezervini oluşturur ve abiyotik ve biyotik faktörlerden koruyarak uzun süre canlılıklarını korumasını sağlar. Çalışmamız da Kahramanmaraş'ın merkez köylerindeki buğday tarlalarından ve Başkonuş ormanlık alanlarından alınan toprak örneklerinden izole edilen entomopatojen fungus izolatlarının uygun besiyeri ortamında gelişim karakteristikleri, morfolojik yapılarının mikroskopta incelenmesi ve moleküler karakterizasyon çalışması sonucunda 14 tanesi *Beauveria bassiana*, 9 tanesi *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, 4 tanesi *Aspergillus flavus* ve 1 tanesi ise *Penicillium* sp. oldukları tespit edilmiştir. Sonuçlar Blast programı ile düzenlenmiş ve Mega 4.1 programı ile filogenetik ağaçları çizilmiştir.

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF NATURAL ENTOMOPATHOGENIC FUNGI

SUMMARY

Insects were consume 33 % of the agricultural products during production and storage stage so efficient method should be applied against these insects. As a result of intensive and indiscriminate use of broad-spectrum drugs shows negative and adverse effects on human health and the environment frequently. Therefore, the development of alternative methods against harmful insects is very importance in agriculture. Biological control is very effective aganist harmful insects. In additon predators and parasites use, environment friendly and safe microbial pathojens suc as viruses, bacteria, protozoa and nematodes coul be use. Entomopathogenic fungi are the most common pathogens to agricultural pests and insects. Under appropriate conditions fungal diseases make epizotic effect and reduce specific harmful insect populations and large areas. Entomopathogenic fungi and dead insects present in soil and it provide protection for fungi from abiotic and biotic factors for along time.

In this study, entomopathogen was isolated from soil samples collected from the central villages of Kahramanmaras wheat fields and Baskonus forests. Development characteristics of isolates on artificial medium, microscopic examination of the morphological structures and molecular characterization were performed *Beauveria bassiana* (14), *Fusarium oxysporum* (8), *F. solani* (1), *Aspergillus flavus* (4) and *Penicillium* sp. (1) were identified.. Observed sequence results were compared with database sequence using Blast and phylogenetic tree was drawn using Mega 4.1 software.

TEŞEKKÜR

‘Doğal Entomopatojenik Fungusların Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu’ isimli tez çalışmamda bana her türlü yardımda bulunan ve fedakârlığını esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Özlem GÜVEN’e ve danışmam hocam kadar değerli aynı zamanda üzerimde emeği çok olan sayın hocam Doç. Dr. İsmail AKYOL’a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuar çalışmam boyunca bilgi, tecrübe ve laboratuar imkânlarıyla bana destek olan ÜSKİM binası Mikrobiyoloji ve Mikrobiyal Genetik laboratuarından Fadime TOPÇAL’a ve Ziraat Fakültesi Biyometri ve Genetik laboratuarından Arş. Gör. Ferit Can YAZDIÇ ve Altuğ KARAMAN’a, aynı zamanda çalışma arkadaşlarım Cihat KOZ, Ümit İZGİ ve tüm laboratuar arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman olduğu gibi tez çalışmam süresince de desteklerini esirgemeyen ve bugünlere gelmemde en büyük destekçim olan aileme minnettar olduğumu bildirmek isterim.

Haziran 2012

Fatma Gül ÖZÇELİK

Kahramanmaraş

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
ÖZET	iii
SUMMARY	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1.EPF'lerin Konak Üzerinde Enfeksiyonu	2
1.2. EPF'lerin Morfolojik Tanımlanması	4
1.3. EPF'lerin Moleküler Tanımlanması	5
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	8
2.1. Yurt İçinde Yapılan Çalışmalar	8
2.2. Yurt dışında yapılan çalışmalar	10
3. MATERYAL VE METOT.....	16
3.1. Entomopatojen fungusların eldesi.....	16
3.2. Kültürlerin saflaştırılması	17
3.3. EPF'lerin Gelişimi ve Morfolojik Karşılaştırılması	17
3.4. EPF'lerin Morfolojik Karakterizasyonu	17
3.5. Entomopatojenik Fungusların Moleküler Karakterizasyonu	18
3.5.1. DNA İzolasyonu.....	18
3.5.2. PCR ile Amplifikasyon ve DNA'nın jel elektroforezi	19
3.5.3. DNA örneklerinin dizilenmesi ve dizi analizi.....	21
3.6. Verilerin Analizi	22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	23
4.1. Morfolojik Karakterizasyon	23
4.2. Moleküler Karakterizasyon.....	30
4.2.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	30
4.2.2. Elde Edilen Fungus PCR Ürünlerinin Sekans Analizleri.....	33

KAYNAKLAR.....	46
ÖZGEÇMİŞ.....	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. EPF'lerin enfeksiyonunun şematik gösterimi.....	4
Şekil 1.2. Funguslarda rDNA bölgesi.....	7
Şekil 4.1. <i>B. bassiana</i> kolonilerin kültür ortamında gelişimi.	24
Şekil 4.2. <i>A. flavus</i> 'un konidial başını oluşturan yapılar.....	26
Şekil 4.3. <i>Penicillium</i> sp. kolonilerin kültür ortamında gelişimi.	26
Şekil 4.4. <i>F. oxysporum</i> kolonilerin kültür ortamında gelişimi.....	28
Şekil 4.5. <i>F. oxysporum</i> kolonilerin kültür ortamında gelişimi.	29
Şekil 4.6. Çalışmada kullanılan ITS 1; ITS 4 ve NS 3; NS 6 primerlerinin rDNA üzerindeki yerleri	30
Şekil 4.7. NS3 ve NS6 primeri ile elde edilen DNA bantları.....	30
Şekil 4.8. ITS 1 ve ITS 2 primeri ile elde edilen DNA bantları.....	31
Şekil 4.9. NS 3 ve NS 6 primeri ile elde edilen DNA bantları.....	31
Şekil 4.10. NS 3 ve NS 6 primeri ile elde edilen DNA bantları.....	32
Şekil 4.11. NS 3 ve NS 6 primeri ile elde edilen DNA bantları.....	32
Şekil 4.12. Aksu.2010.C (<i>A. flavus</i>) türüne ait 18S bölgesi sekans dizilenmesi.....	34
Şekil 4.13. Bk.2010.3A (<i>A. flavus</i>) türüne ait 18S bölgesi sekans dizilenmesi.....	34
Şekil.4.14. Bk.2011.2B (<i>A. flavus</i>) türüne ait 18S bölgesi sekans dizilenmesi.....	34
Şekil.4.15. Kılavuzlu.2010.C (<i>A. flavus</i>) örneğine ait ITS bölgesi sekans dizilenmesi.....	35
Şekil 4.16. <i>F. oxysporum</i> türüne ait 18S gen bölgesi sekans hizalaması.....	36
Şekil 4.17. <i>F. solani</i> türüne ait 18S gen bölgesi sekans dizilenmesi.....	36
Şekil 4.18. <i>B. bassiana</i> türüne ait 18S gen bölgesi sekans hizalaması.....	38
Şekil 4.19. BK.2010.2C (<i>B. bassiana</i>) örneğine ait 18S gen bölgesi sekans dizilenmesi...38	
Şekil 4.20. BK.2011.2K (<i>B. bassiana</i>) örneğine ait 18S gen bölgesi sekans dizilenmesi..39	
Şekil 4.21. BK.2011.3E (<i>B. bassiana</i>) örneğine ait 18S gen bölgesi sekans dizilenmesi...39	
Şekil 4. 22. Kapıçam.2010.C (<i>B. bassiana</i>) örneğine ait 18S gen bölgesi sekans dizilenmesi.....	39

Şekil 4.23. Kapıçam.2011.1A (<i>B. bassiana</i>) örneğine ait 18S gen bölgesi sekans dizilenmesi.....	39
Şekil 4.24. <i>B. bassiana</i> türüne ait ITS gen bölgesi sekans hizalaması.....	40
Şekil 4.25. Kılavuzlu.2011.2A (<i>Penicillium</i> sp.) örneğine ait 18S gen bölgesi sekans dizilenmesi.....	40
Şekil 4.26. <i>B. bassiana</i> türlerinin 18S gen bölgesi temel alınarak çizilen filogenetik ağaç.....	41
Şekil 4.27. <i>A. flavus</i> türlerinin 18S gen bölgesi temel alınarak çizilen filogenetik ağaç.....	41
Şekil 4.28. <i>F. oxysporum</i> ve <i>F. solani</i> türlerinin 18S gen bölgesi temel alınarak çizilen filogenetik ağaç.....	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan entomopatojen fungusların laboratuarda kullanılan kod numaraları ve toprakların alındığı bölgeler.....	16
Çizelge 3.2. Kullanılan primerlerin nükleotid dizileri.....	20
Çizelge 3.3. PCR amplifikasyonu'nda örneklerin hazırlanmasında kullanılan miktarlar...20	
Çizelge 3.4. ExoSAP-It ile Pürifikasyon aşamasında kullanılan PCR şartları.....	21
Çizelge 3.5. Döngü PCR protokolü.....	21
Çizelge 4.1. <i>Beauveria</i> sp. olarak teşhis edilen izolatların çimlenme, hif oluşturma ve koloni gelişimleri süresi.....	23
Çizelge 4.2. <i>Aspergillus</i> sp. ve <i>Penicillium</i> sp. olarak teşhis edilen izolatların çimlenme, hif oluşturma ve koloni gelişimleri.....	25
Çizelge 4.3. <i>Fusarium</i> sp. olarak teşhis edilen izolatların çimlenme, hif oluşturma ve koloni gelişim süreleri.....	27
Çizelge 4.4. <i>B. bassiana</i> , <i>Penicillium</i> sp. ve <i>Aspergillus flavus</i> EPF'lerin konidi ve konidiyofor boyutlarının ölçümleri.....	29
Çizelge 4.5. <i>F. oxysporum</i> ve <i>F. solani</i> EPF'lerin makrospor, mikrospor ve phialid boyutlarının ölçümleri.....	29
Çizelge 4.6. Üzerinde çalışılan fungus türlerinin Blast sonuçları.....	33

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

mm	: Milimetre
°C	: Derece santigrad
dk	: Dakika
g	: Gram
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
PDA	: Patates dekstroza agar
SDB	: Sabouraud dekstroza broth
RH	: Hava nemi
sn	: Saniye
%	: Yüzde
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
sp	: Tür
bç	: Baz çifti
dNTP	: Deoksi nükleotid trifosfat
EDTA	: Etilendinitrilotetraasetat
TBE	: Tris, Borik asit, EDTA
Et-Br	: Etidyum Bromür
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
UV	: Ultra viyole

ITS	: İnternal Ara Bölgeler
AFLP	: Amplifiye Parça Uzunluk Polimorfizmi
CTAB	: Setil Trimetil Amonyum Bromid
ISSR	: Basit İç Dizi Tekrarları
RAPD	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
Rpm	: Dakikada dönüş hız birimi
NCBI	: National Center for Biotechnology Institute

1. GİRİŞ

Altmış yılı aşkın süredir böcekleri, otları ve bitki hastalıklarını kontrol etmek için kimyasal pestisitler yaygın olarak kullanılmıştır. Geniş spektrumlu ilaçların yoğun ve gelişigüzel kullanılması sonucu çevre ve insan sağlığına verdiği olumsuzluklar ve yan etkileri kendini sıkça göstermektedir. Bu yüzden tarımda zararlı böceklere karşı alternatif yöntemlerin geliştirilmesi önem arz etmektedir.

Biyolojik mücadele, doğal düşmanları kullanarak zararlının zararlı etkisini azaltan ya da ortadan kaldıran bir mücadele yöntemidir (Charaduttan ve ark., 2002). Biyolojik mücadele yöntemi, parazit, predatör ve faydalı mikroorganizmaların (funguslar, bakteriler, virüsler, nematodlar, riketsiyalar ve protozoalar) yanında faydalı hayvanların (böcek, akar, kuş vb.) da kullanıldığı doğal bir yöntemdir. Gelecekte kimyasal mücadelenin yerini biyolojik mücadelenin alacağı kaçınılmazdır. Fakat zirai mücadele ilaçlarından bugün için vazgeçilememesinin nedeni, bu ilaçlara alternatif bir mücadele yönteminin tam anlamıyla geliştirilememesidir. Geliştirilecek alternatif mücadele yöntemlerinde kullanılacak biyolojik mücadele etmenleri, en az kimyasal pestisitler kadar etkili olmalı, çevreye zararlı olmamalı, büyük bir maddi külfet getirmemeli ve çevrede kalıntı bırakarak insanları, gelecek nesilleri ve diğer canlıları tehdit etmemelidir.

Entomopatojenler (böceklerde hastalık yapan mikroorganizmalar), klasik kimyasal pestisitler ile karşılaştırıldığında insanlar ve diğer hedef dışı organizmalar için güvenli, gıdalarda kalıntı bırakmayan ve doğada var olan diğer doğal düşmanları koruyan doğal bir mücadele yöntemidir (Lacey ve ark., 2001).

Entomopatojen funguslar (EPF), böceklerde hastalık etmeni olan patojenler içinde tür sayısı, geniş konukçu spektrumu, dışarıdan kolaylıkla teşhis edilebilmeleri ve yaygın biçimde gözlenebilmeleri açısından oldukça avantajlı bir gruptur. Bu avantajlarının yanında elde edilen fungus izolatlar izole edildiği böcek konukçusunda yüksek patojenite gösterdiğinden izolat bazında oldukça spesifik biyolojik mücadele etmenleridirler ve bu özellikleri biyolojik mücadelede kullanımları açısından grubunun önemini artırmaktadır (Leger ve ark., 2009). Uygun ortam koşulları altında fungal hastalıkların görülmesi belirgin epizootiğe yol açar ve geniş alanlarda spesifik zararlı böcek popülasyonunu azaltır. Diğer patojenlerden farklı olarak, funguslar böceklere kütikula yoluyla bulaşır. EPF ile ölmüş böcekler çoğunlukla bulundukları bitki üzerinden toprağa düşecekleri için toprak ortamı önemli fungus rezervini oluşturur. Toprak ortamı aşırı biyotik ve abiyotik faktörlere karşı

tampon görevi görür ve aynı zamanda ultraviyole ışınlardan koruması sebebi ile fungusların uzun süre canlı kalmalarını sağlar (Sun ve ark., 2007). Sıcaklık, pH, organik içerik, nem, mineraller gibi toprağın özellikleri fungusun kalıcılığında ve aktivitesinde önemli rol oynar (Asensio ve ark., 2003). Sıcaklık, entomopatojenlerin çevrede ya da konak böcek üzerinde çimlenmesini, yayılmasını etkileyebilir. Yüksek sıcaklık zararlı böcek üzerinde fungusun bağlantı kurmasını engelleyebilir ya da azaltabilir, böceğin içerisine yayılmış bir fungusun ise çoğalmasını hızlandırabilir. Nem, entomopatojenlerin hayatta kalabilmesi için çok önemli bir faktördür. Konak kutikulası üzerinde sporun çimlenmesi ve ölmüş konağın dışında sporulasyonun gerçekleşmesi için nem faktörü çok gereklidir. Yüksek sıcaklık ile düşük ya da yüksek nem birleştirildiğinde fungal sporların kalıcılığını ve yayılabilirliğini etkiler (Zimmermann, 2007).

Tahıl ürünlerinde zarara sebep olan ağustos böceği üzerinde enfeksiyona sebep olan yeşil muscardine adında da bilinen *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin ilk kez 19. yy sonlarında tanımlamıştır. Bu elde edilen sonuç sonrasında böceklerin kontrolü çalışmalarında mikroorganizmaların kullanılabileceği öne sürülmüştür. O zamandan beri yüzlerce fungus tanımlanmış ve çeşitli zararlı böcek ve otların biyolojik kontrolünde geliştirilmiştir (Jackson ve ark., 2009). Yapılan tuzak-böcek çalışmalarında, toprakta *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces* ve *Tolypocladium* cinslerine ait olan sporların varlığı tespit edilmiştir (Sevim ve ark., 2009). EPF'ların bazı türleri çok geniş böcek popülasyonu üzerinde enfeksiyon oluştururken bazı türler ise sadece özel konaklar üzerinde enfeksiyon oluştururlar. Örneğin, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin ve *M. anisopliae* birçok böcek üzerinde hastalıklara sebep olurken, *Coelomomyces opifexi* (Pillai ve Smith) ise sadece iki sivrisinek türünde enfeksiyon oluşturur (Goettel ve ark., 2010).

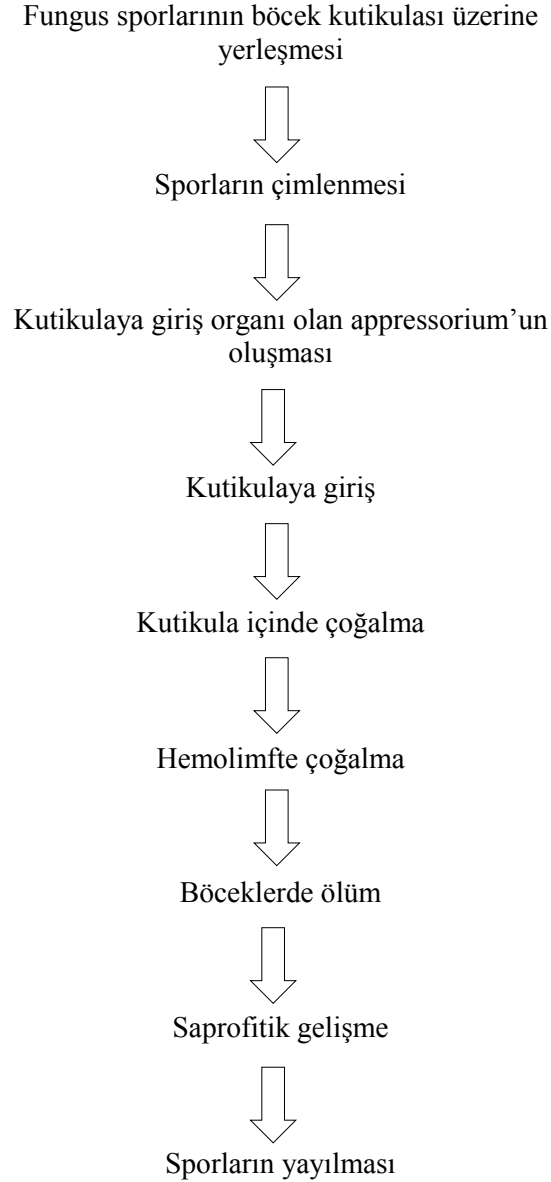
1.1. EPF'lerin Konak Üzerinde Enfeksiyonu

EPF'lar hayatta kalabilmeleri için fungus, konak ve çevre arasındaki hassas dengeyi korumaya ihtiyaç duyarlar. Enfeksiyona sebep olmak için bakteriler ve virüsler gibi sindirilmeye ihtiyaç duymazlar, doğrudan kutikulaya penetrasyon ile enfekte ederler (Leger ve ark., 2009). Fungusların başarılı bir şekilde geliştirilmesi için çevresel faktörler çok önemlidir. Bütün çevresel faktörler mikopatojenlerin enfekte özelliğini etkiler ve bunlar içerisinde en önemli olanı nem faktörüdür. Eğer nem faktörü çevrede çok düşük ise, böcek fungus tarafından öldürülse de asla dış sporulasyon oluşmaz (Talwar, 2005).

EPF'lerin çoğunda enfektif birim konidi veya sporlardır. Rüzgar ve yağmur gibi etmenlerin yardımıyla konak böceğin kutikulası üzerine gelen konidiler uygun çevresel durumlar altında konak kutikulası ile bağlantı kurunca kutikula giriş organı olan apressoriumdan çimlenme tüpleri ya da enfeksiyon kancası çıkarırlar. Bu yapılar kitinaz, proteaz ve lipaz gibi kutikulaı ayırıştırıan kompleks enzimleri salgılar. Bu durum ise, çimlenme tüpünün hemosölde ve yağlı vücutta yayılmasını kolaylaştırır. Aynı zamanda birçok entomopatojen fungus apressorium oluşumu boyunca müsilaı salgılar. Bu müsilaı salgısı ise kutikula yüzeyine apressorial yapısının bağlanmasını sağlar. Müsilaı'nın nem çekme özelliğı vardır ve elverişli bir çevre ortamı yaratırlar. Hemosölün içerisinde yayılan hifler besinleri tüketir, çoğalmaya devam eder. Hemosöl içeriğı tükenince konak böcek ölür ve sonra fungus çimlenir (Talwar, 2005). Uygun çevresel koşullar altında fungus konak içinde çoğalı ve kutikula dışına çıkar (Şekil 1.1). Dışarıda spor ya da benzer yapılar oluşturarak çevreye yayılır. Eğer ortam şartları yayılmaya uygun değilse fungus hayatta kalabilmek için dinlenme evresine geçer. Fungusun çoğalması ve hayatta kalabilmesi konak ve çevre bu yüzden çok önemli bir noktayı oluşturur (Goettel ve ark., 2010).

Biyolojik mücadele etmeni olarak fungusların kullanılmasında bir böceğin davranışları doğrudan etkilidir. Böcek ve entomopatojen fungus arasındaki etkileşimde iki önemli nokta vardır. Bunlardan ilki; hedef böceğin fungal patojeni bulması ve ondan kaçınması, ikincisi ise; konak böcekler arasında fungal patojenlerin yayılmasıdır. Böceğin davranışları enfeksiyonun olup olmayacağını etkileyebilir aynı zamanda enfeksiyon oluşma ihtimalini artırıp ya da azaltabilir (Baverstock ve ark., 2010).

Enfeksiyon sürecinde fungal patojenlerin metabolitlerinin de ilgisi vardır. Biyo-krom (örneğin; bassianin ve tenellin) ya da dibezokinin (örneğin; oosporin) gibi pigmentler böcek vücudunda renk değişiminden sorumludur. EPF'lerin çoğunun ürettiğı toksinler böcekler için zehir olarak davranırlar ve böceğı öldürürler (Talwar, 2005).



Şekil 1.1. EPF'lerin enfeksiyonunun şematik gösterimi (Deacon, 1983)

1.2. EPF'lerin Morfolojik Tanımlanması

EPF'lerin teşhis ve tanımlanmasında anatomik, morfolojik, bazen de kimyasal özellikler kullanılır. Fungal entomopatojenlerin çoğunluğu temel teşhis karakterleri ile hızlıca tanımlanmasına rağmen *B. bassiana*, *M. anisopliae* ve *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viegas gibi türlerin tanımlanması kompleksdir ve onların morfolojik, patolojik ve diğer karakteristik özellikleri onları tanımlamada önemli faktörlerdir (Humber,1997). Örneğin; *Beauveria* türleri, genellikle yavaş büyüyen, ince tüylü, ilk zamanlar besiyerinde beyaz daha sonraları hafif sarımsı renge dönüşen, zig zag bir eksen ya da diz gibi çıkıntı üzerinde tek hücreli konidia'nın simpodial gelişmesiyle karakterize edilirler. *Aspergillus* türleri, genellikle hızlı büyüyen, kahverengi yeşil tonlarında

konidisporlar üzerinde yoğun bir şekilde oluşurlar. *Fusarium* türlerinde koloniler genellikle hızlı büyür, 4 gün içinde koloni çapları 4.5 cm olabilir. Koloniler genellikle soluk veya tırüne göre parlak renkli olabilir. Aynı hif üzerinde iki farklı konidiyum yapıları vardır. Bunlardan tek hücreli olanlar hif üzerinde çeşitli yerlerde, küçük oval, yuvarlak ya da armut şeklinde olabilirler ve bu yapılara mikrokonia denir. Bunun yanında çok hücreli mekik gibi olan yapılara ise makrokonia denir. *Penicillium* türleri ise, kolonileri genellikle çok hızlı büyüyen, yeşil tonlarında gelişim gösteren konidisporları çok yoğun oluşan türlerdir.

Kanada’da yapılan bir çalışmada klasik yöntemlerle *Metarhizium* cinsinin kültür ortamındaki morfolojik özellikleri ve sporların mikroskop incelenmesi yapılarak tanımlanmıştır. Ancak spor büyüklükleri geniş oranda çakışmış ve diğer özellikler *Metarhizium* cinsleri arasında ki taksonomik ilişkileri belirlemede kesin sonuçlar vermemiştir. Çeşitli çevresel ve fizyolojik durumlar altında farklı morfolojik özellikler sergilemeleri sebebi tanımlamada zorluklar ortaya çıkarmıştır (Entz ve ark., 2005). Assaf ve ark. (2011) *Beauveria brogniartii* (Sacc.) Petch. üzerinde yaptıkları çalışmada fungusun besi yeri ortamında gelişimleri, gelişim esnasında koloni rengi, koloninin çapı, sporların şekli gibi özellikleri inceleyerek bu türü tanımlamaya çalışmışlardır. Bu metotlar temelde hala kullanılmasına rağmen fungusların bütün alanlarda teşhisinde moleküler tekniklere doğru artan bir yönelim vardır (Atkins ve Clarck, 2004).

Farklı habitatlarda bulunan organizmalar birbirlerinden farklı değişimler gösterebildiğinden, aynı türe ait organizmalar bile farklı morfolojik ve anatomik özellik gösterirler. Morfolojide görülen farklılıklar, genetik çeşitliliğin bir kısmını oluşturduğu gibi genetik çeşitliliğin büyük bir kısmı da morfolojide görülmemektedir. Genotip-çevre etkileşimi ve bir karakterin birden fazla lokus tarafından belirlenmesi gibi etmenler yüzünden morfolojiden elde edilen bilgiler, genetik farklılıkları belirlemede etkili olamazlar. Bu yüzden entomopatojenik fungusların teşhis ve tanımlanmasında, morfolojik özelliklerin yanında moleküler tekniklerde etkili olmaktadır.

1.3. EPF’lerin Moleküler Tanımlanması

Günümüzde moleküler teknikler pek çok alanda kullanılmakta ve yapılan çalışmaların güvenilirliğini artırmaktadır (Soylu ve Gönülol, 2012). Moleküler nükleik asit tekniklerinin gelişmesi, fungal sistematğinde devrim yaptırmıştır. Uygulanan DNA

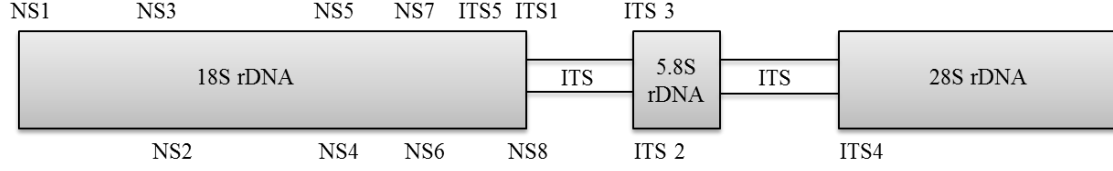
teknikleri bireyleri tanımlamak ayrıca bireyler arasındaki taksonomik ve filogenetik ilişkileri belirlemek için genetik markörlerin analizlerine izin verir (Edel, 1998).

Organizmalar arasında ki filogenetik ilişkileri belirlemede kullanılacak genin bütün organizmalarda bulunması, atalarını düzgün bir biçimde yansıtması, farklı genetik kökenler arasında geçişlere izin vermemesi ve gen bölgesinin özel olarak korunması lazımdır. Doğru filogenetik analizler için dizilerin hizalanması önemli bir noktayı oluşturur ve bu yüzden korunmuş dizi ve yapılar dizilerin hizalanmasında önemli dönüm noktasını oluşturur. Ribozomal RNA genlerinin nükleotid dizilerinin karşılaştırma çalışmaları taksonomik aşamaların geniş çaplı filogenetik ilişkilerini analiz etmek için fayda sağlar. SSU rRNA dizileri mikrobiyal tanımlamalar için iyi bir standarttır ve organizmalar arasındaki evrimsel ilişkiler için anlam çıkartmada önemlidir (Pace, 2009). 18S rDNA dizileri evrimsel ilişkilerde yavaştır ve ilgili organizmaları ayırt etme çalışmalarında oldukça kullanışlı bölgelerdir (White ve ark. 1990). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), özel DNA dizilerinin, uygun primerlerin kullanımıyla in vitro şartlarda enzimatik olarak çoğaltılması tekniğidir (Erich, 1989). PCR reaksiyonunun ortaya çıkması, moleküler sistemikte yeni uygulamaların gelişmesine öncülük etmiştir. Bu teknik spesifik DNA dizilerinin çoğaltılmasına izin verir ve hedef DNA'nın mikrogram miktarında hızlı bir şekilde bir veya daha fazla DNA parçalarından milyonlarca kopyasının üretilmesine izin verir (Edel, 1998). PCR temelli uygulamalar organizmaları karakterize etmek için büyük fayda sağlar ve EPF'lerin türlerini ve filogenesini anlamamıza yardımcı olur (Meyling, 2008).

rRNA eski, fonksiyonel olarak sabit, evrensel olarak yaygın ve filogenetik farkı, ölçülü bir şekilde koruyabilen bir moleküldür. Protein sentezinin oldukça eski ve tüm organizmalarda ortak bir özellik olmasından dolayı organizmalar arasındaki evrimsel ilişkiyi ayırt edebilmek için rRNA'lar üstün moleküllerdir ve taksonomik ve filogenetik çalışmalarda rDNA dizileri sıklıkla kullanılır. Farklı taksonlardaki organizmaları karşılaştırmaya izin verir. Ayrıca rRNA gibi büyük bir moleküldeki olasılıkların sayısı oldukça fazladır ve iki dizi arasındaki benzerlikler filogenetik bir ilişkiyi işaret etmektedir. rRNA dizi analizlerinin sonuçları ve moleküler genetik çalışmalar organizmalar arasındaki doğru evrimsel ilişkileri yansıtacak şekilde filogenetik ağaçların elde edilmesini sağlamıştır (Kılıçoğlu ve Özkoç, 2008).

Çekirdek genomu ve mitekondriyal genom, funguslar ve diğer ökaryotlar'da rDNA'nın yerlerini oluşturur. Funguslarda çekirdek rDNA (Şekil 1.2) ardışık tekrarlanan rDNA birimleri olarak organize olmuştur. Fungal çekirdek rRNA genleri her genomda

birkaç yüz kopyası olan, ardışık tekrarlanan yapılar olarak düzenlenmiştir. Her bir birimde üç rRNA geni bulunmaktadır: küçük rRNA geni (18S), 5.8S rRNA geni ve büyük rRNA geni (28S).



Şekil 1.2 Funguslarda rDNA bölgesi (White ve ark.,1990)

Kodlanmayan iki değişken bölgeden meydana gelen ITS bölgesi, oldukça korunmuş küçük alt birim (SSU) ile 5.8S alt birimi arasında (ITS1 bölgesi) ve de büyük alt birim (LSU) rRNA genleri ile 5.8S alt birimi arasındaki bölgede (ITS2) yer almaktadır.

Taksonomik çalışmalarda rRNA genleri arasında yer alan 5S bölgesi kullanılmıştır. Özellikle birbirine uzak olan organizmalar arasındaki ilişkiyi belirlemede bu bölgeden faydalanılır. 18S rRNA dizileri grupların ve daha yüksek aşamaların taksonomik ve evrimsel ilişkilerinde sorulara cevap bulmada kullanışlıdır. 18S rDNA bölgesini fungal sınıflar içindeki filogenetik ilişkileri belirlemede kullanılır (Edel, 1998).

Çalışmamız genel olarak Kahramanmaraş ovasında buğday ekimi yapılan topraklardan ve Kahramanmaraş Başkonuş ormanlık alanlarındaki toprak örneklerinden izole edilen EPF'lerin klasik ve moleküler karakterizasyonunu amaçlamaktadır. Böylece, farklı iki habitattan elde edilen aynı türe ait farklı izolatların ve farklı tür entomopatojenik fungusların kültür ortamında gelişimi, morfolojik ve moleküler karakterizasyonu ile karşılaştırması amaçlanmaktadır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Yurt İçinde Yapılan Çalışmalar

Türkiye koşullarına adapte olmuş entomopatojenler ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların birçoğunu entomopatojenik bakterilerin (Aslım ve ark. 2002; Demir ve ark., 2002; Nalçacıoğlu, ve ark., 2002; Apaydın ve ark., 2005; Sezen ve Demirbağ, 2007a; Sezen ve Demirbağ, 2007b; Çınar ve ark., 2008), virüslerin (Yaman ve ark., 2001; Sezen ve Demirbağ, 2006) ve nematodların (Özer ve ark., 1995; Susurluk ve ark., 2001; Hazır ve ark., 2003a; Hazır ve ark., 2003b) izolasyonu ve karakterizasyonu oluşturmaktadır. Entomopatojen funguslar ile yapılan çalışmalar oldukça sınırlı sayıda olmakla beraber sadece belirli zararlı böceklerde izolasyonu ve etkisi araştırılmıştır.

Orta Anadolu bölgesinin merkezinde sünelerin kışı geçirdikleri bölgelerde entomopatojen fungusların bu zararlılar üzerinde ki etkileri araştırılmıştır. Funguslar içerisinde *B. bassiana* en yaygın böcek patojenidir ve yüksek oranlarda ölümlere sebep olur. Yapılan çalışma sonucunda sünelere *B. bassiana*'nın % 77.7-55.8 oranında ölümlere sebep olurken *Mucor* sp., *Alternaria* sp., *Penicillium* sp. ise düşük oranlarda ölümlere sebep olduğu belirlenmiştir (Kocatürk ve ark., 1998).

Şahin (2006) yaptığı çalışmada Kürtül, Karacasu ve Şekeroba yörelerinden alınan topraklardan *G. mellonella* ve *T. pityocampa* larvaları kullanılarak tuzak böcek yöntemi ile izolasyon sonucunda toplam 35 entomopatojen fungus elde edilmiştir; bunların 16 tanesi *Paecilomyces* cinsine, 19 tanesi *Beauveria* cinsine aittir.

Kıvan (2007), laboratuvar şartlarında süne, *Eurygaster integriceps* Puton, erginleri üzerinde yapmış olduğu çalışmalarda 4 tane *B. bassiana* ve 1 tane *M. anisopliae* var *anisopliae* izolatlarını denemiştir. *B. bassiana* izolatlarından biri Tekirdağ orijinli diğer üçü ise ARSEF koleksiyonundan (5665, 1394, 6444) temin edilmiştir. Her bir izolatın tek dozu (10-6) erginlere 5 saniye süre uygulanmış ve *B. bassiana*'ya maruz kalan süne erginlerinin %82,5'inde, *M. anisopliae*'ya maruz kalan süne erginlerinin ise %100'nün 8 gün sonra öldüğü tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile uygulama grubu arasında istatistiksel olarak fark olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışma bize Kahramanmaraş ilinde süne zararlılarına karşı entomopatojen fungusların uygulanabilirliği hakkında umut vermiştir.

Er ve ark. (2008), doğu Akdeniz bölgesinde 2004-2005 yıllarında Coccinellidlerin doğal hastalık etmeni olan entomopatojen fungusları belirlemek üzere çalışma

yürütmüşlerdir. Coccinellidlerin patojenleri olarak *Beauveria* ve *Paecilomyces* türleri saptanmıştır.

Kahramanmaraş bölgesinde (Türkoğlu, Göksun, Sekeroba, Elbistan, Pazarcık) 2003-2005 yıllarında, Er ve Mart (2009) arazi çalışmalarından topladıkları böceklerden ve toprak örneklerinden tuzak böcek (*G. mellonella* larvası) yöntemi ile entomopatojenik fungusların belirlenmesine yönelik çalışma yapmışlardır. Bu çalışma sonucunda, yaprak bitlerinde *Pandora* sp. Humber (Entomophthoraceae), *Hypera postica* (Gyll.) (Curculionidae: Coleoptera) larvalarında *Zoophthora* sp. Batko (Entomophthoraceae) ve *H. postica* erginlerinde *Beauveria* sp. cinsine ait funguslar belirlenmiştir. Toprak örneklerinden en çok *Beauveria* cinsine ait funguslar ile *Isaria* (= *Paecilomyces*) ve *Metarhizium* cinsine bağlı entomopatojenik fungusların izolasyonu yapılmıştır.

Kılıç ve ark. (2009), seralarda ve tarım arazilerinde zararlı olan beyazsineğe [*Bemisia tabaci* Gennadius, (Homoptera: Aleyrodidae)] karşı kimyasal pestisit (cypermethrin) kullanımına alternatif olabilecek mücadele yöntemlerini araştırmak için 15 *B. bassiana* izolatlarını denemişlerdir. Bu izolatlardan 10 tanesi Türkiye'nin çeşitli bölgelerindeki topraktan (Tokat, Erzurum ve Kayseri) izole edilmiş, 5 tanesi ise ARSEF-USA'den temin edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda *B. bassiana*'nın beyazsineğin kontrolünde cypermethrin'e göre etkisinin az olduğu fakat farklı entomopatojenik fungus ve izolatların denenmesi ile alternatif bir kontrol ajanı olabileceğini tespit etmişlerdir.

Fındık yetiştiriciliğinin çok olduğu arazilerde entomopatojenik fungusların topraktaki dağılımını belirlemek için yapılan çalışmada *Galleria* larvaları kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda örneklenen toprakların % 20.59'unda entomopatojenik fungus bulunmuştur. Morfolojik, ITS dizileri, 18S ve EF1- α genleri temel alınarak yapılan çalışma sonucunda *B. bassiana*, *B. bassiana* cf. *bassiana*, *M. anisopliae* var. *anisoplia*, *Metarhizium* sp., *I. fumosoroseus* ve *Evlachovaea* sp. türleri teşhis edilmiştir. Bu funguslar fındıkta önemli zararlı olan *Melolontha melolontha* (L.)'a karşı test edilmiş ve tüm fungusların patojenik olduğu fakat *M. anisopliae* var. *anisoplia* ve *Evlachovaea* sp. insektisit aktivitesinin daha çok olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda *M. melolontha*'ya karşı entomopatojenik funguslar iyi bir biyolojik kontrol ajanı olabileceği vurgulanmıştır (Sevim, 2010).

B. bassiana ve *M. anisopliae* var. *anisopliae* dünya çapında kullanılan mikrobiyal mücadel etmenleri içerisinde en yaygın olanlarıdır. Bu iki önemli türün genetik çeşitliliğinin değerlendirilmesi etkili biyolojik mücadele stratejilerinin geliştirilmesi için

faydalıdır. Bu çalışmada Türkiye’de fındık yetiştiriciliği yapılan bölgelerden izole edilen 13 *B. bassiana* ve 33 *M. anisopliae* var. *anisopliae*’nın genetik çeşitliliği AFLP ve α ve β izoenzimle kullanılarak bulunmuştur. AFLP analizleri hem *B. bassiana* hem de *M. anisopliae* var. *anisopliae* izolatlarını 3 ve 4 farklı grup içerisinde yerleştirmiştir. α ve β esterez bant çiftleri *M. anisopliae* var. *anisopliae* için net bir şekilde ayırırken, *B. bassiana* için yeterli bir bilgi vermemiştir (Sevim ve ark., 2010).

Isaria farinosa (Holm ex S. F. Gray) ve *B. bassiana* izolatlarının 1×10^6 ve 1×10^8 konidia konsantrasyonu altında ve % 70 ve %95 nem faktörü altında *Aelia rostrata* Boh. (Hemiptera: Pentatomidae) üzerine etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışma 27 ± 1 sıcaklığında, 16 saat ışık, 8 saat karanlık periyodunda yapılmış ve 6, 9, 12. günler sonunda ölüm oranları belirlenmiştir. Deneyler sonucunda entomopatojenlerin her ikisi de hem %95 nem faktöründe hem de 1×10^8 konidia konsantrasyonu altında en etkili sonuca varmıştır. *I. farinosa* % 70 nem faktörü altınsa 12. günün sonunda ölümlere sebep olurken, *B. bassiana* 9. günün sonunda %100 ölümlere sebep olmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda *A. rostrata* üzerine yapılan çalışmada *B. bassiana* *I. farinosa*’ya göre daha etkili olduğu belirlenmiştir (Muştu ve ark., 2011).

Türkiye’de tarım ve orman zararlıları ile mücadelede entomopatojenlerin varlığı araştırılarak ülkemizde biyolojik kaynaklı preparatların üretimine yönelik çalışmalara hız kazandırılmalı ve entegre mücadele kapsamında kullanılacak alternatif entomopatojen preparatların sayısı arttırılmalıdır.

2.2. Yurt Dışında Yapılan Çalışmalar

Günümüzde yeni tür ve izolat bulmayı amaçlayan çok sayıda araştırma sürmekte ve bunların bazılarında yeni türler elde edilmektedir (Stock ve ark. 1999; Griffin ve ark. 2000; Liao ve ark. 2001). Zararlı bir böceğin mücadelesinde mikrobiyal ajanların hedeflenen böceğe yüksek patojenite göstermesi ve her ülkenin kendi koşullarına adapte olmuş izolatların kullanılması kontrol yüzdesini arttırmaktadır (Tanada ve Kaya, 1993).

Boucias ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada, ITS dizi analizleri, RADP, AFLP ve telomorfik parmakizlerinin dâhil olduğu çeşitli moleküler teknikler doğrultusunda entomopatojen fungus olan *Nomuraea rileyi* (Farlow)’nin genotipik özellikleri araştırmışlardır. *N. rileyi*’nin 28S ve ITS-5.8S bölgelerinin analizleri bu türün *Nomuraea anemonoides* (A.D. Hocking) ve *N. atypicola*’dan ziyade *M. anisopliae* ve *M. flavoviridae*’ye çok daha yakın ilişkili olduğunu belirlemişlerdir.

Dokuz aylık bir çalışma periyodunda sulanmış bitki tarlalarında ve orkidelerin yetiştiği topraklarda entomopatojenik funguslar *Galleria* tuzak metodu kullanılarak incelenmiştir. Toprak örnekleri çalışmasında % 33.6 oranında entomopatojenik fungusların olduğu belirlenmiş ve bunlar içerisinde ise en yaygın olarak *Conidiobolus coronatus* (Costantin) bulunmuştur. Tarla çalışmasında bulunan entomopatojenik fungusların izolasyonu üzerinde toprağın organik içeriği ve vejetasyon tipi önemli birer özellik olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda *C. coronatus*'un tarım yapılan topraklarda biyolojik kontrol için iyi bir aday olabileceği ortaya konulmuştur (Shtayeh ve ark., 2003).

Keller ve ark. (2003), iki yıl boyunca, seçici besiyeri ve *Galleria* tuzak metodu ile İsviçre'nin kuzey, doğu, merkez ve güney batısındaki 82 alandan topladıkları toprak örneklerinden entomopatojen fungus izolasyonu yapmışlardır. İki metodun da izolasyon oranları birbirine oldukça benzese de *Galleria* metodunun fungus izolasyonunda daha hassas olduğunu vurgulamışlardır. Toprak alanların %96'sında *M. anisopliae* izole edilmiş, *B. brongniartii* sadece konukçu böceği olan *M. melolontha*'nın kolonize olduğu alanlar ile sınırlı kalmıştır. Ayrıca, *B. bassiana*, *Isaria fumosorosea* (Wize) ve *Conidiobolus* sp. gibi entomopatojenler de topraktan izole edilmiştir.

Entomopatojenik funguslar orman ve tarımsal ekosistemde oldukça geniş alanlara yayılmışlardır. Ilıman bölgelerde, Filum: Ascomycota (Takım: Hypocreales) ve Altfilum: Entomophthoromycotina'ya (Takım: Entomophthorales) ait birçok fungus Arthropod'larda genellikle enfeksiyona sebep olduğu bilinmektedir (Shah ve Pell, 2003).

Farklı ekosistemlerin toprakta bulunan entomopatojenik fungusların bulunmasına etkisini araştırmak için İspanya'nın güneydoğu bölgesindeki Alicante ilinde yapılan çalışmada orman, ekin alanı, doğal ortam ve bahçelerden 61 farklı kısımdan toprak örnekleri alınmıştır. Böcek patojenlerinden en çok entomopatojen funguslara rastlanmıştır (%32,8) ve bu funguslar arasında en sık *B. bassiana* (%21) gözlenmiştir. *M. anisopliae* (%6,4) ve *Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) (%4,8) türlerine daha az rastlanmıştır. Ayrıca *B. bassiana*, tek toprak örneklerinde en yüksek enfekte yüzdesine sahiptir, böceklerin %98'ini enfekte etmiştir (Asensio ve ark., 2003).

Afrika ve Avustralya'da çekirgelerin kontrolü için mikopestisit olarak entomopaten fungus *M. anisopliae* var. *acridium*'un etkili olabileceği belirlenmiştir. *M. anisopliae* var. *acridium*'un çekirge ve çekirge türleri üzerinde ki enfeksiyonunu tanımlamak için klasik olarak enfekte kadavrada fungal gelişimlerin incelenmesine dayanmaktadır. Çevrede ve

hedef dışı organizmalarda bu entomopatojenlerin bulunmasının belirlenmesi klasik metot yöntemiyle yapılan çalışmalara yani kültürlerin gelişimlerinin incelenmesine ve bunların biyolojik testlerine dayanmaktadır. *M. anisopliae* var. *acridium*' un bulunması için PCR temelli bir teknik geliştirilmiştir. Fungal DNA'nın bulunması için PCR temelli teşhis yönteminde ITS rDNA bölgesinden elde edilen primerler kullanılmıştır. *M. anisopliae* var. *acridium*'a özel 420 baz çifti uzunluğunda bölge çoğaltılmıştır. Yapılan çalışmada patojene özel primerler ile diğer fungal patojenler, bitki patojenleri, mikopatojenler ve saprofitler bulunamamıştır. Sonuçta, PCR temelli teşhis yöntemi *M. anisopliae* var. *acridium* DNA'sını topraktan ve enfekte çekirgelerde bulunmasında kullanışlı bir yöntemdir (Entz ve ark., 2005).

Orta Doğu ve Batı Asya'da yer alan yedi ülkeden kış aylarında sünelerden (*Eurygaster* ve *Aelia* türleri), çerçöplerden ve bazı diğer böcek örneklerinden *Beauveria*'nın 110 izolatu elde edilmiştir. Bu izolatların DNA'sı izole edilerek genetik çeşitliliğini belirlemek ve karakterize etmek için ITS-RFLP, ITS dizileme, ISSR-PCR ve AFLP teknikleri kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda ITS-RFLP ve ITS dizilemede izolatlar arasında önemli bir fark bulunmazken ISSR-PCR ve AFLP teknikleri ile tür içi grupların coğrafik orjinleri ile ilişkisi belirlenmiştir (Aquino De Muro ve ark., 2005).

Kalkar ve ark. (2006), yaptıkları çalışmada, Endonezya'da uzun antenli çekirgelerde izole edilen IndGH 96 olarak kodladıkları entomopatojenik fungusu fenotipik ve moleküler veriler doğrultusunda *Paecilomyces reniformis* (Bainier) olarak tanımlamışlardır. IndGH 96 türünü morfolojik özellikler, ITS1-5.8S-ITS2 bölgelerinin dizileri, rDNA'nın 28S bölgeleri ve tübilin genlerin bir bölümü kullanılarak, laboratuarda biyolojik testleri yapılarak kapsamlı bir şekilde inceleyerek tanımlamışlardır.

Hypocrealean takımına ait *B. bassiana* ve *M. anisoplia* tarımsal ekosistemlerde çok geniş konukçulara sahiptir. Son zamanlardaki araştırma sonuçları, biyolojik kontrol stratejisine uygun fungusların ekolojik yönlerini açıklığa kavuşturmuştur. Bu araştırmalar, ılıman iklimli tarımsal ekosistemlerde, *B. bassiana*'nın zeminden yüksek yerlerde yaşayan konukçularda, *M. anisoplia*'nın toprak yüzeyinin üzerinde veya altında bulunan konukçularla ilişkili olduğunu göstermiştir (Meyling ve Eilenberg, 2007). Bu iki fungusun kaynağı topraktır ve aynı toprak örneklerinden izole edilebilmektedirler (Keller ve Zimmermann, 1989; Meyling ve Eilenberg, 2006).

Haploit bir fungus olan *B. bassiana* hem endofitik hem de entomopatojenik özelliğe sahiptir. Geniş alanlarda bulunmasından dolayı ve böcek patojeni özelliği sayesinde önemli tarım zararlısı olan Lepidoptera, Coleoptera ve Hymenoptera sınıfının böcekleri üzerinde geniş çaplı olarak enfekte eder. Farklı coğrafik merkezlerden izole edilen yedi *B. bassiana*'nın genetik çeşitliliğini incelemek ve tanımlamak için ISSR- PCR markörleri kullanılmıştır. Kullanılan moleküler markör ile bu yedi tür içerisinde yüksek oranda polimorfizm görülmüştür. ISSR 873 primeri ile yapılan çalışmada yedi farklı izolattan tek bant elde edilmiş ve bunun sonucunda bir dendogram çizilmiştir. ISSR- PCR markörleri hızlı, güvenilir ve yapılan çalışmada *B. bassiana* izolatlarını tanımlanmaya izin verecek özelliktedir (Estrada ve ark., 2007).

B. bassiana ve *M. anisopliae* gibi entomopatojenik fungusların doğal düşmanlar ve faydalı toprak böcekleri gibi hedef olmayan böcekler üzerine etkileri incelenmiştir. Yapılan çalışmada konidi süspansiyonun son konsantrasyonu 1×10^8 olarak ayarlanmıştır. *Coccinella septempunctata* (L), *Chrysoperla carnea* (Stephens)'nin 1. dönem larvaları ve *Dicyphus tamaninii* (Him., Mirida), *Hemicoelus nitidus* (Fabricius)'un erginleri test edildi. Elde edilen sonuçlara göre *B. bassiana*'nın faydalı toprak böceklerine ve doğal düşmanlar üzerine patojenitesinin olmadığı belirlenirken *M. anisopliae*'nin doğal düşmanlara % 4 oranında patojenite gösterdiği belirlenmiştir (Thungrabeab ve Tongma, 2007).

İspanya'da doğal toprak ortamları ve kültür yapılan bölgelerde ki 244 toprak örneği alınarak entomopatojen fungusların oluşumları ve dağılımları üzerine etkileri araştırılmıştır. Alınan toprak örneklerinin 175'in de %71.7 oranında EPF izole edildi ve bu izolasyonda sadece *B. bassiana* ve *M. anisopliae* bulundu. 204 toprak örneğinin 104'ün de *B. bassiana* (%42.6), 18'in de *M. anisopliae* (%7.3) ve 53 toprak örneğinde ise %21.7 oranında her iki fungus türü bulunmuştur. Habitat tipine bakmaksızın *B. bassiana* *M. anisopliae*'ye göre yüksek kil ve pH içerikli ve düşük organik madde içerikli topraklardan izole edilen topraklarda bol miktarda bulunmuştur. Bu sonuçlar, belirli bir toprak türüne en iyi uyum gösterecek fungusun seçimi ve doğal toprak ortamı ya da kültür ortamlarında ki topraklarda uygun entomopatojen fungusların seçilmesine yardımcı olur (Moraga ve ark., 2007).

Çin'in farklı bölgelerindeki orman ve dağlarından örneklenen topraklarından 6 EPF türü, *B. bassiana*, *M. anisopliae* var. *anisoplia*, *L. lecanii*, *I. farinosus*, *I. fumosoroseus* ve *Tolypocladium inflatum* (Rostr.), izole edilmiş ve en yaygın olanları *B. bassiana*, *M. anisopliae* var. *anisoplia* ve *I. farinosus* olarak gözlenmiştir (Sun ve Liu, 2008). Ayrıca

Çin'in tarla bitkileri alanlarında ve meyve bahçelerinde yapılan araştırmada en çok *B. bassiana*, *M. anisopliae* var. *anisoplia* ve *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) türlerine rastlanmıştır (Sun ve ark., 2008).

Entomopatojen funguslar, Güney Amerika ve Afrika'da tropik yağmur ormanlarında araştırılmış ve fungusların zenginliği ve çeşitliliği ormanların örselenmesi ile birlikte azaldığı gözlenmiştir (Samson ve ark., 1988). Bu azalma optimum enfeksiyon için koşulların kaybolmasına veya funguslar için spesifik konukçu böceklerin yok olmasına veya her iki sebebe de bağlı olabilir. Halbuki, Tayland yağmur ormanlarında yapılan çalışmada, entomopatojenik fungusların çeşitliliğinin örselenmiş ormanlarda korunmuş ormanlara oranla daha fazla olduğu bulunmuştur (Aung ve ark., 2008). Örselenmiş yağmur ormanları hem orman habitatını ve hem de tarım habitatını içerdiğinden dolayı entomopatojen fungusların çeşitliliğinin fazlalığını açıklayabilir.

İki farklı toprak habitatından (tarla ve orkideler) alınan toprak toplamda 29 tür izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Tarla topraklarından 25 tür, orkidelerinin olduğu topraklardan ise 20 tür izole edilmiştir. Yaygın böcek patojeni türler olan *B. bassiana*, *M. anisopliae* var. *anisopliae* ve *I. fumosoroseus* türleri her iki habitattan da izole edilmesine rağmen *B. bassiana* ve *I. fumosoroseus* türleri orkide ürünlerinin olduğu toprakta daha fazla bulunmuş, *M. anisopliae* var. *anisopliae* ise daha çok tarla topraklardan izole edilmiştir. EPF'ların yanında fırsatçı bir patojen olan *Mucor* spp. tarla ürünlerinin olduğu topraklarda çok bulunmuştur (Sun ve ark., 2008).

Slovenya'da 2008 yılları boyunca entomopatojenik fungusların varlığını belirlemek amacı ile 901 toprak örneği alınmış ve *G.mellonella* tuzak metodu ile Dodin ve sikloheksilamin içeren seçici ortam (SM) kullanarak EPF'lar izole edilmiştir. *G. mellonella* ile yapılan yöntemde dört tür; *B. bassiana* (örneklerin % 31'den), *M. anisopliae* (%8), *I. farinosa* (%6) ve *I. fumosorosea* (%6), SM ile yapılan yöntemde ise üç tür; *B. bassiana* (örneklerin % 36'dan), *M. anisopliae* (% 37) ve *I. fumosorosea* (%9) bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre *B. bassiana* farklı habitatlarda sıkça bulunmasına rağmen ormanlık bölgeler gibi doğal habitatlarda daha bol bulunmuştur. *I. farinosa* orman habitatlarında oldukça sınırlı bulunurken *I. fumosorosea* çit topraklarından alınan toprak örneklerinde bol miktarda bulunmuştur. *M. anisopliae* tarla ve çayır örneklerinden alınan topraklarda daha bol bulunmuştur. *B. bassiana* ve *I. farinosa*'nın bulunmasında düşük toprak pH'sı önemli

faktördür. Her iki fungus türün yüksek organik içerikli topraklarda bolca bulunmaktadır (Medo ve Cagan, 2011).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Entomopatojen Fungusların Eldesi

Çalışmada İzgi (2012) ve Koz (2012) tarafından Çizelge 3.1’de belirtilen bölgelerden alınan toprak örneklerinden *G. mellonella* larvaları kullanılarak izolasyonları yapılan entomopatojen funguslar (EPF) kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan entomopatojen fungusların laboratuarda kullanılan kod numaraları ve toprakların alındığı bölgeler

EPF'lerin Laboratuvar Kod No	Teshis Adı	Bölge	Yıl
Kılavuzlu.2010.B	<i>B. bassiana</i>	Kılavuzlu	2010
Kılavuzlu.2010.C	<i>A. flavus</i>	Kılavuzlu	2010
Kılavuzlu.2011.2A	<i>Penicillium</i> sp.	Kılavuzlu	2011
Kılavuzlu.2011.2B	<i>Fusarium</i> sp.	Kılavuzlu	2011
Kürtül.2010.C	<i>B. bassiana</i>	Kürtül	2010
Kürtül.2011.2A	<i>Fusarium</i> sp.	Kürtül	2011
Kılılı.2010.A	<i>Fusarium</i> sp.	Kılılı	2010
Kılılı.2010.B	<i>Fusarium</i> sp.	Kılılı	2010
Kılılı.2011.2A	<i>Fusarium</i> sp.	Kılılı	2011
Önsen.2010.B	<i>B. bassiana</i>	Önsen	2010
Önsen.2011.2B	<i>B. bassiana</i>	Önsen	2011
Aksu.2010.C	<i>Aspergillus</i> sp.	Aksu	2010
Aksu.2010.F	<i>B. bassiana</i>	Aksu	2010
Aksu.2011.2A	<i>Fusarium</i> sp.	Aksu	2011
Aksu.2011.2C	<i>B. bassiana</i>	Aksu	2011
Kapıçam.2010.C	<i>B. bassiana</i>	Kapıçam	2010
Kapıçam.2010.E	<i>B. bassiana</i>	Kapıçam	2010
Kapıçam.2011.1A	<i>B. bassiana</i>	Kapıçam	2011
Bk.2010.1A	<i>Beauveria</i> sp.	Başkonuş	2010
Bk.2010.2C	<i>B. bassiana</i>	Başkonuş	2010
Bk.2010.3A	<i>A. flavus</i>	Başkonuş	2010
Bk.2011.1B	<i>Fusarium</i> sp.	Başkonuş	2010
Bk.2011.1C	<i>B. bassiana</i>	Başkonuş	2011
Bk.2011.2B	<i>A. flavus</i>	Başkonuş	2011
Bk.2011.2D	<i>Fusarium</i> sp.	Başkonuş	2011
Bk.2011.2K	<i>B. bassiana</i>	Başkonuş	2011
Bk.2011.3A	<i>Fusarium</i> sp.	Başkonuş	2011
Bk.2011.3E	<i>B. bassiana</i>	Başkonuş	2011

3.2. Kùltürlerin Saflaştırılması

EPF olduğu düşünölen sporlar patates dekstrore agar (PDA, Merck) besi yerine ekimi yapılmıştır. PDA, 1000 ml saf su içerisine 39 gr PDA tartılmış ve sonrasında 121°C’de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. Funguslar ile enfekte olmuş larvalardan toplanan süspansiyonlar besiyeri içeren petri kaplarına yayılmış ve petri kaplarında gelişen tek kolonilerden tekrar fungus sporları alınarak yeni besiyeri ortamlarına ekimleri yapılarak kùltürler saflaştırılmıştır. Petri kapları 20-25 °C’de %75 nem ortamında 12:12 (Light/Dark) foto periyotta inkübe edilmiştir. EPF’ler ile enfekte olmuş larvalardan izole edilen ve kùltürü yapılmış örnekler %30’luk gliserol içerisinde -20 ve -80 °C (New Brunswlek)’de saklanmıştır.

3.3. EPF’lerin Gelişimi ve Morfolojik Karşılaştırılması

Topraktan izole edilerek saf kùltürleri oluşturulan fungusların PDA ortamında gelişimleri ve morfolojik özellikleri incelenmiştir. Çizelge 3.1’de belirtilen izolatların saf kùltürleri elde edildikten sonra PDA bulunan petri kaplarına (5 bölge/petri kabı) steril iğne öze ile inoküle edildikten sonra 16, 24, 36 saat ve sonra birer gün ara ile spor oluşumu gözleninceye kadar inceleme yapılmıştır. Fungus sporlarının çimlenmesi, miselyum ve sonra spor meydana getirme süreleri ve koloni çapları kaydedilmiştir.

3.4. EPF’lerin Morfolojik Karakterizasyonu

Fungus ile enfekte olmuş böceklerin dış görünüşleri, koloni morfolojisi, konidiyagenez ve konidia hücrelerinin büyüklükleri entomopatojen fungusların tür teşhislerinde önemli özelliklerdir. Mikroskop preparatlarının hazırlanmasında “lam kùltür” teknikleri kullanılmıştır (Lacey, 1997). Fungusların mikroskopik olarak incelenmesi şu şekilde yapılmıştır;

- Steril bir lam üzerine 1x1 şeklinde parçalara ayrılmış PDA besiyeri konulmuştur.
- Besiyeri üzerine incelenecek fungus kùltüründen iğne öze ile ekim yapılarak ve besiyerinin üzeri steril lamel ile kapatılmıştır.
- Yaklaşık 4-5 gün 23- 24°C’de inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrasında pens yardımıyla besiyeri üzerindeki lamel dikkatlice alınarak lamel üzerine 1-2 damla %70’lik etanol damlatılmıştır Etanol, örneği

sabitlemek, hava kabarcıklarını uzaklaştırmak, yoğun hif ve sporları birbirinden ayırmak için kullanılmıştır.

- Lamel üzerine damlatılan etanol tamamen uçtuktan sonra fungus yapıların daha net görülebilmesi için lam üzerine 1 damla laktofenol mavisi çözeltisinden damlatılıp lamel 45°'lik açı ile kapatılmıştır.
- Lamelin dışına taşan çözelti temizlenerek çözeltinin örneğe iyice karışması beklenmiştir.
- Laktofenol mavisi ile boyanan funguslar mikroskopta incelenerek teşhis edilmiştir.
- Tür teşhislerinde ışık mikroskobu (Olympus CX21) ve diseksiyon mikroskobu (Soif DA 0625) kullanılmıştır.

İzolatlar ışık mikroskobu (Nikon Eclipse 80İ) altında spor yapıları ve konidiyoforları incelenmiştir aynı zamanda bu yapılar her bir izolat için ayrı ayrı ölçülmüştür.

3.5. Entomopatojenik Fungusların Moleküler Karakterizasyonu

Günümüzde moleküler biyolojide yaşanan gelişmeler, fungal sistematğinde hızlı ve güvenilir teşhislere imkân verdiğiinden morfolojik tekniklerin yanında bu çalışmada moleküler tekniklerden PCR temelli teknikler ve DNA sekans çalışmaları fungusların karakterizasyonun da kullanılmıştır.

3.5.1. DNA İzolasyonu

EPF'lerin hayfa bodileri, 50 ml Sabouraud-2% dekstroze broth (Merck) (SDB;1000ml sdH₂O içerisine 30 gr tartılmış ve sonrasında sterilizasyon için 121°C'de 15 dk otoklav edilerek hazırlanmıştır) içeren kapaklı cam erlenlere inoküle edilerek 250 rpm'de 26°C'de 3-5 gün çalkalanarak (İKA KS 260 basic) inkübe edilmiştir. Broth içinde gelişen miselyumlar 4200 rpm'de (3392 g), 5 dk santrifüj edilmiş (Sigma 3-16P) ve süpernatant kısım dikkatlice dökülerek pelet steril distile su ile yıkanarak tekrardan aynı santrifüj şartlarında santrifüj edilmiş ve broth uzaklaştırılmıştır. Elde edilen örnekler kullanılıncaya kadar -20° de saklanmıştır.

Fungus izolatlarının total DNA izolasyonları için modifiye edilmiş CTAB protokolü kullanılmıştır. CTAB protokolüne göre DNA izolasyon aşamaları şu şekildedir;

- -20 de dondurulan fungus DNA' ları sıvı azot kullanarak havanda öğütülmüştür.

- 2 ml'lik ependorf tüplere alınan örneklerin üzerine 700 µl CTAB izolasyon tamponu (0.1 M TrisHCl, pH 8.0; 1.4 M NaCl; 0.02 M EDTA; %2 CTAB) eklenmiştir.
- Örnekler 60 dk süre ie 70 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.
- Bu süre sonunda 500 µl kloroform eklenmiş ve vortekslenmiştir.
- 70 °C'de 5 dk beklettikten sonra 10000 g' de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatanttan 500 µl alınarak yeni bir 2 ml tüpe aktarılmıştır ve üzerine 300 µl izopropanol eklenmiştir.
- Tekrar 10000 g'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant kısım dikkatlice dökülmüştür.
- Örnekler 1 ml % 70 etanol ile 70 °C'de 20 dk bekletilerek yıkanmış tuzların uzaklaştırılması sağlanmıştır.
- Tekrar 10000 g' de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant kısım dikkatlice dökülmüş ve DNA peleti elde edilmiştir.
- Etanolün tamamen uçması için tüplerin kapakları bir süre açık olarak bekletilmiştir.
- Elde edilen DNA 50 µl TE tamponu (1mM TrisHCl, pH 8.0; 0.1 mM EDTA) içerisinde çözülerek ileriki çalışmalar için -20°C'de saklanmıştır.

DNA'nın varlığı agaroz jelde elektroforetik olarak da gözlemlenmiştir. %1'lik agaroz jeline örnekler yüklendikten sonra 100 voltta 30 dk yürütüldü ve son konsantrasyon 0.5 mg/ml olacak şekilde etidyum bromür boyası içinde 15 dk kadar boyanması beklendi. UV ışığı altında bantların varlığı tespit edilerek fotoğrafları çekilmiştir. Ayrıca izole edilen DNA miktarları nanodrop ile belirlenmiştir.

3.5.2. PCR ile Amplifikasyon ve DNA'nın jel elektroforezi

PCR amplifikasyonu için ITS1-5.8S-ITS2 ve 18S fungal genleri universal primerler (White ve ark., 1990) kullanılarak yapılmıştır (Çizelge 3.2). PCR reaksiyonu 40 döngü olarak ve her bir döngü 95 °C'de 30 sn, 65 °C'de 30 sn, 72 °C'de 1dk olarak ayarlanmıştır. PCR başlangıcında 95 °C 5 dk. ve reaksiyon sonunda 72 °C'de 15 dakikalık aksesuar aşamaları eklenmiştir ve PCR amplifikasyonu'nda örneklerin hazırlanmasında kullanılan miktarlar Çizelge 3.3'te verilmiştir. PCR ürünleri % 1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan primerlerin nükleotid dizileri;

Primerler	Oligo Nükleotid Dizilimi 5' → 3'	Beklenen Fragment (bp)
ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	600
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	600
NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	900
NS6	GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC	900

Çizelge 3.3. PCR amplifikasyonu'nda örneklerin hazırlanmasında kullanılan miktarlar

Bileşen	Miktar µl
İleri primer	1.0 (20 pmol)
Geri primer	1.0 (20 pmol)
Taq DNA polimeraz	0.5 (5 u/ µl)
dNTP	1.0 (1 mM)
reaksiyon tamponu	5.0 (10X)
sdH ₂ O	40.5
Toplam Hacim	50.0

Agaroz jel hazırlamak üzere; %1 oranında agaroz, 1X TBE tampon çözeltisinde [1000 ml TBE (1X) tampon çözeltisi hazırlamak için; 5,5 g Borik asit, 10,8 g Trizma base ve EDTA (500 mM) çözeltisinden 4 ml eklenerek 1000 ml saf su ile karıştırılır] çözdürülmüştür. Analiz edilecek DNA örnekleri 1/5 (loading buffer/DNA) oranında yükleme solüsyonu [10 ml DNA loading buffer için; 0,025 mg bromophenol blue, %40 süktroz ve 2,5 ml EDTA (100 mM) (pH 8,0)] eklenerek yüklemeye hazırlanmıştır. 100 baz çiftlik DNA markörleri (vivantis) kullanılmıştır. Elektroforez tankında (Thermo Scientific, EC 300 XL), jel 120 volt ve 60 mA'da koşturulmuştur. Koşturulan agaroz jel Et-Br (0,5 µg/ml) ile 15 dakika boyanmıştır. DNA örnekleri UV ışığı altında görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.5.3. DNA örneklerinin dizilenmesi ve dizi analizi

Sekans örneklerin hazırlanmasında; PCR örneklerinin ExoSAP-It ile pürifikasyonu, Döngü PCR, Sephadex ile pürifikasyon ve örneklerin cihaza verilmesi aşamalarını içermektedir.

ExoSAP-It ile Pürifikasyon: Tüm PCR ürünlerine (5 µl.'ye) 2 µl. ExoSAP-It eklenerek Çizelge 3.4' te belirtilen şartlarda PCR cihazı çalıştırılmıştır.

Çizelge 3.4. ExoSAP-It ile Pürifikasyon aşamasında kullanılan PCR şartları

Aşama	Tanım	Isı (°C)	Süre
1	Aktivasyon	37	30 :00
2	İnaktivasyon	80	15 :00
3	Bekleme	4	∞

Döngü PCR: Pürifikasyon aşaması tamamlandıktan sonra Döngü PCR yapılmıştır. Bu aşamada BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) kullanılmıştır. Uygulanan Döngü PCR protokolü ise Çizelge 3.5'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Döngü PCR protokolü

Bileşen	Miktar µl
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR100	2.0
Big Dye Terminator v1.1, v3.1 5x Sequencing Buffer	2.0
Forward ya da reverse primer	2.0
PCR Ürünü	2.0
Distile su	2.0
Toplam Hacim	10.0

Sephadex ile pürifikasyon: Bu işlemde Sephadex G-50 kullanıldı. Sephadex G-50'den 1 gr tartılır ve 14 ml. distile suda iyice çalkalayıp, kolonlara dağıtıldı. Kolonlara dağıtıktan sonra 4600 rpm'de 2 dk santrifüj edildi ve alt sıvı döküldü. Kristal haldeki sephadex üzerine PCR ürünü ilave edilerek yeniden santrifüj edildi. Alt kısımda ki sıvıdan 10 µl alınarak Sequence Plate'e eklenir ve sonrasında örnekler sekans cihazına (Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzers) verilmiştir.

3.6. Verilerin Analizi

EPF'lerin morfolojik karakterizasyonunda yapılan ölçümler ANOVA testine tabi tutulmuş ve ortalamalar arasındaki farklılıklar TUKEY çoklu karşılaştırma testine göre $P<0,05$ önem seviyesinde ortaya konulmuştur. Veri analizleri MINITAB istatistik yazılımı kullanılarak yapılmıştır (Minitab, 1993).

Elde edilen sekans sonuçları Clone Manager 9'da düzenlenip sıraya konulduktan sonra elektronik veri tabanında NCBI GenBank'a giriş yapılarak BLAST üzerinden diğer fungus türlerinin sekansları ile karşılaştırılarak tür teşhisi doğrulanmıştır. Daha sonra elde edilen türlerin filogenetik ağaçları Mega 4.1 programı kullanılarak çizilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Morfolojik Karakterizasyon

Kahramanmaraş'ın merkez köylerindeki buğday tarlalarından ve Başkonuş ormanlık alanlarından alınan toprak örneklerinden izole edilmiş olan 28 EPF izolatlarının PDA ortamında gelişim karakteristikleri ve morfolojik yapılarının mikroskopta incelenmesi sonucunda 4 farklı türe ait oldukları tespit edilmiştir. Elde edilen bu EPF'lerin çimlenme ve hif oluşturma süreleri, koloni geliştirme zamanları ve tür teşhis adları çizelge 4.1, 4.2, ve 4.3'de verilmiştir. Her türü temsilen seçilen izolatlardan yapılan konidi, konidiyofor, phialid ölçüm sonuçları çizelge 4.4 ve 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. *Beauveria* sp. olarak teşhis edilen izolatların çimlenme, hif oluşturma ve koloni gelişim süreleri

İzolat Laboratuvar Kod No	Teşhis Adı ^a	Çimlenme (saat)	Hif oluşumu (Saat)	Koloni gelişimi		
				48 saat (mm)*	3. Gün (mm)*	5. Gün (mm)*
Kılavuzlu.2010.B	<i>B. bassiana</i>	16	36	5 ± 0,7a	12,2± 1,1a	22,8±3,1ab
Kürtül.2010.C	<i>B. bassiana</i>	16	24	6,4 ±1,1ab	12,2 ± 1,6a	22±2,1ab
Aksu.2010.F	<i>B. bassiana</i>	16	24	5,2 ±1,1a	11±0,7a	21,4±2,6ab
Kapıçam.2010.C	<i>B. bassiana</i>	16	24	7,8±1,3b	10,6±0,9a	19,6±1,1ab
Kapıçam.2010.E	<i>B. bassiana</i>	16	24	5,6±0,5ab	10,8±0,8a	19±2,9ab
Önsen.2010.B	<i>B. bassiana</i>	16	24	6,4 ±1,1ab	10 ±0,7a	21,8 ±3,8ab
Aksu.2011.2C	<i>B. bassiana</i>	16	36	4,8±0,8a	12,6±1,7a	20,6±0,9ab
Kapıçam2011.1A	<i>B. bassiana</i>	16	36	4,4±0,5a	14±1,6b	21±1,6ab
Önsen.2011.2B	<i>B. bassiana</i>	16	24	5,8 ±0,8ab	9,6±1,5a	18±2,9a
Bk.2010.1A	<i>Beauveria</i> sp.	16	36	6,5±1,3ab	14,4±1,5b	19,6±2,9ab
Bk.2010.2C	<i>B. bassiana</i>	16	24	6,6 ±1,1ab	10±1,2a	18,2± 2,8ab
Bk.2011.1C	<i>B. bassiana</i>	16	24	6,8 ±1,6ab	12,2±2,8ab	23,4±4,4b
Bk.2011.2K	<i>B. bassiana</i>	16	24	5,2 ±0,4a	11,4±1,1ab	23±1,6ab
Bk2011.3E	<i>B. bassiana</i>	16	24	7± 1,6ab	11,6±1,5ab	21±4,1ab

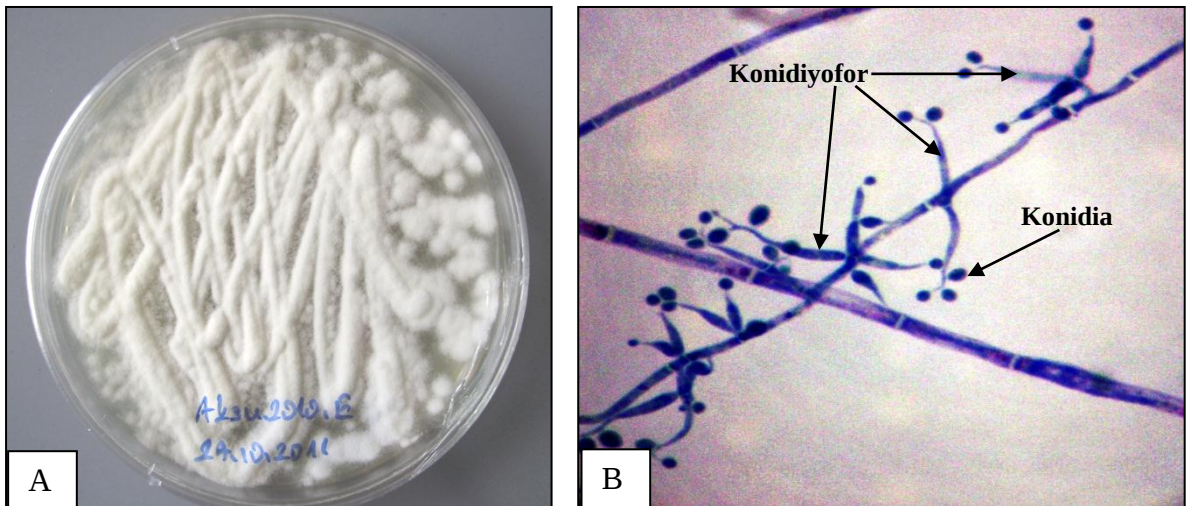
*Aynı harf içeren sütunlardaki ortalamalar arasında Tukey testine göre istatistikî olarak önemli bir fark yoktur (n=14, P>0.05).

^aSekans analizleri sonucunda elde edilen tür teşhis adlarıdır.

B. bassiana olarak teşhis edilen izolatların morfolojik gelişimleri incelendiğinde sporların 16 saat içinde çimlendiği ve çimlenmenin 24 saat içinde tamamlandığı

gözlenmiştir. Kılavuzlu.2010.B, Bk.2010.1A, Aksu.2011.2C ve Kapıçam.2011.1A izolarlarında çimlenme süresi 36 saat içinde tamamlanmıştır. Tüm *B. bassiana* izolatları ekim yapıldıktan 5 gün sonra petri kaplarında koloni gelişimlerini tamamlamış ve ölçümler ekim yapılan kolonilerin birbiri içine girmesinden sonra son verilmiştir. İzolatların günler içinde gelişimlerine bakıldığında ANOVA testi sonucunda istatistiki olarak fark gözlenmiştir (48 saat için $F=2,86$, $P=0,006$; 3. Gün için $F=4,41$, $P=0,00$; 5. Gün için $F=3,02$ $P=0,004$). Her bir izolatın diğer izolatlarla olan farklılıkları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Aynı harfi içeren sütunlardaki ortalamalar arasında Tukey testine göre istatistikî olarak önemli bir fark yoktur ($n=14$, $P>0.05$).

Petri kabında in vitro gelişen *B. bassiana* kolonileri tüylü, yün gibi, kadifemsiden tozlu bir yapıda gözlenmiştir. Koloniler başlangıçta beyaz renkte iken gelişimin ilerleyen evrelerinde sarımsı rengine dönüşmüştür. Kolonilerin alt kısımları renksizdir ve herhangi bir koku gözlenmemiştir (Şekil 4.1.A). Hifler şeffaf, düz duvarlı yapıdadır. Hiflerden yan olarak gelişen elips veya alt kısımları silindirik şeklinde şişkin hücrelerden 1-5 tane konidiofor hücreleri gelişir. Konidiyofor hücreleri küçük gruplar şeklinde veya tek olarak, küre şeklinden şişe şekline (armut) benzeyen, bazen taban kısmı uzamış ve yapılan ölçümler sonucunda ortalama $1,7\pm0,3 \times 5,9\pm1,2 \mu\text{m}$ boyutlarında, uç kısmı uzamış zigzag dişli yapılardan oluşur. Bu dişli yapıların her birinden bir tane şeffaf, düz, küre veya genişçe elips şeklinde, ortalama $1,6\pm0,3 \times 1,8\pm0,3 \mu\text{m}$ boyutlarında konidi taşırlar (Şekil 4.1.B).



Şekil 4.1. A) *B. bassiana* kolonilerin kültür ortamında gelişimi. B) Konidial gelişimi oluşturan yapılar.

Çizelge 4.2. *Aspergillus* sp. ve *Penicillium* sp. olarak teşhis edilen izolatların çimlenme, hif oluşturma ve koloni gelişim süreleri

Laboratuar Kod No	Teşhis Adı ^a	Çimlenme (saat)	Hif oluşumu (Saat)	Koloni gelişimi	
				48 saat (mm)*	3. Gün (mm)*
Kılavuzlu.2010.C	<i>A. flavus</i>	14	24	3,5±0,5a	14 ±2,1a
Aksu.2010.C	<i>A. flavus</i>	14	24	3,8±0,4a	13,8±2,5a
Bk.2010.3A	<i>A. flavus</i>	14	24	4,6±0,5a	16±1,6a
Bk.2011.2B	<i>A. flavus</i>	14	24	4,2±0,4a	15±1,2a
Kılavuzlu.2011.2A ^b	<i>Penicillium</i> sp.	16	24	7,4± 0,5	12,2±2,3

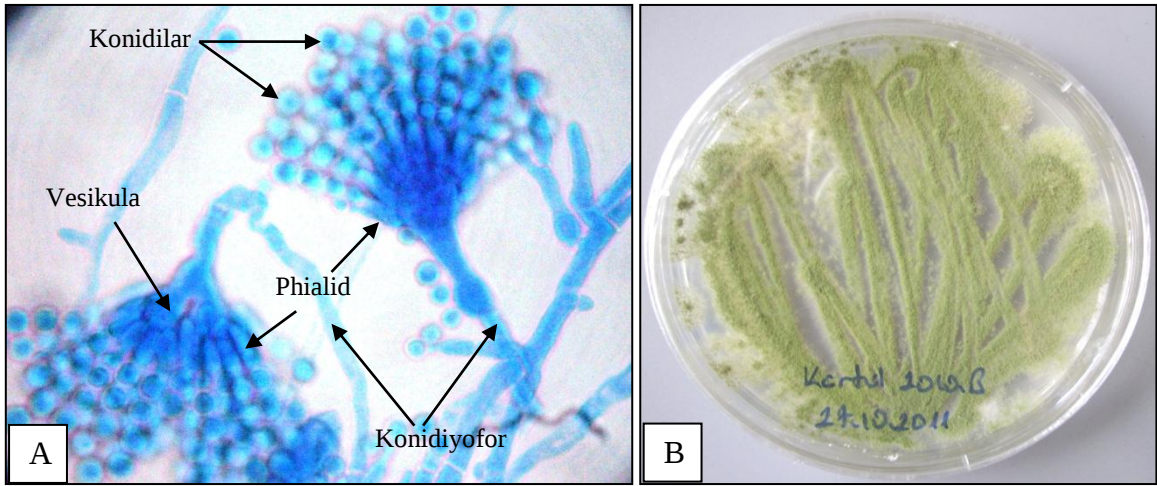
*Aynı harfi içeren sütunlardaki ortalamalar arasında Tukey testine göre istatistikî olarak önemli bir fark yoktur (n=4, P>0.05).

^aSekans analizleri sonucunda elde edilen tür teşhis adlarıdır.

^b*Penicillium* sp. tek olduğu için *A. flavus* izolatları ile istatistiki karşılaştırılması yapılmamıştır.

A. flavus türüne ait sporların 14 saat içinde çimlendiği ve çimlenmenin 24 saat içinde tamamlandığı gözlenmiştir. Bu cinse ait türlerin koloni gelişimleri oldukça hızlı olduğu ve spor ekimi yapıldıktan 48 saat içinde spor oluşumu gözlemlendiği ve koloni gelişimlerini tamamladığı gözlenmiştir (Çizelge 4.2).

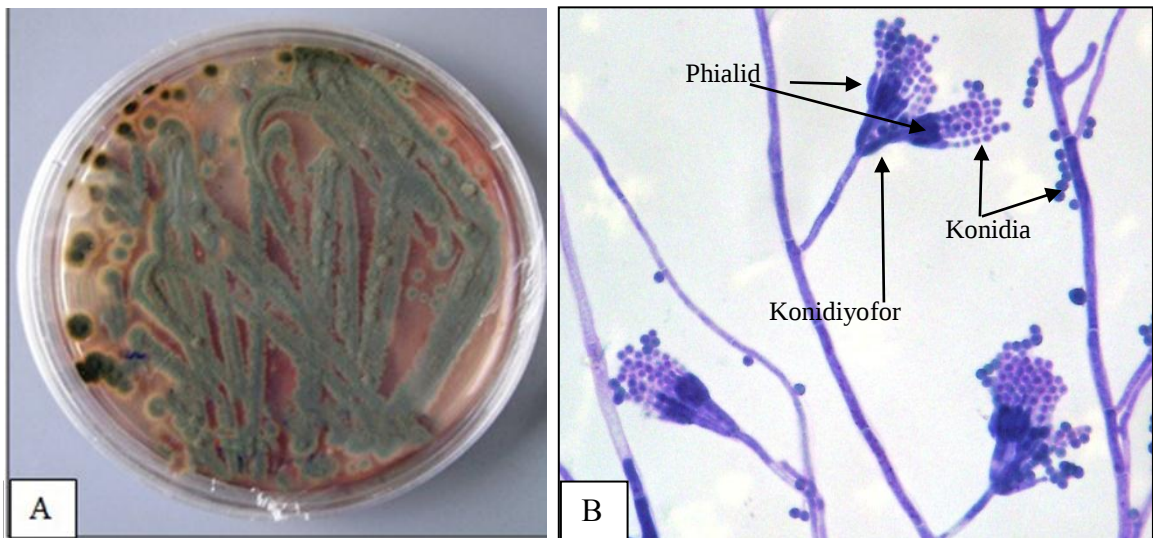
A. flavus kolonileri taneli, seyrek miselyum, yassı, ilk spor oluşum evresinde sarı renkli, ilerleyen evrelerde koyu sarı-yeşil renktedir (Şekil 4.2B). Konidial başı gelişimin ilk safhalarında tipik olarak ışınsal yapıda sonra seyrek kolonlu bir yapı oluşturmuştur. Phialidler vesikuladan direk çıkmış, şişe şekline (armut) benzeyen 3,1±0,5 x 8,0±1,0 µm boyutlarındadır. Konidiler küre şeklinde, 4,5±0,6 x 4,9±0,6 µm boyutlarında, yeşil renkte pürüzlü yüzeye sahiptir (Şekil 4.2A).



Şekil 4.2. A) *A. flavus*'un konidial başını oluşturan yapılar B) Kolonilerin kültür ortamında gelişimi

Penicillium sp. olarak teşhis edilen tür 16 saat içinde çimlenmiş ve çimlenmenin 24 saat içinde tamamlandığı gözlenmiştir. Koloni gelişiminin hızlı olduğu ve spor ekimi yapıldıktan 48 saat içinde spor oluşumu gözlemlendiği ve koloni gelişimlerini 3. gün'de petri kabının tamamını kapladığı gözlenmiştir (Çizelge 4.2).

Penicillium sp. kolonileri koyu yeşil renkte, sık yapılı görünümündedir (Şekil 4.3A). Mikroskopta yapılan incelemede konidiler zincir şeklinde tek hücreli halde phialidlerden oluşurlar. Phialidler şişe şekline (armut) benzeyen, belirgin boyun kısmı ve $1,9 \pm 1,1 \times 6,3 \pm 0,7 \mu\text{m}$ boyutlarında grup halinde oluşurlar. Konidiler küre şeklinde, düz yapılı ve $2,1 \pm 0,5 \times 4,9 \pm 0,6 \mu\text{m}$ boyutlarındadır (Şekil 4.3.B).



Şekil 4.3. A) *Penicillium* sp. kolonilerin kültür ortamında gelişimi. B) Konidial gelişim oluşturan yapılar

Çizelge 4.3. *Fusarium* sp. olarak teşhis edilen izolatların çimlenme, hif oluşturma ve koloni gelişim süreleri

Laboratuvar Kod No	Teşhis Adı ^a	Çimlenme (saat)	Hif oluşumu (Saat)	Koloni gelişimi	
				48 saat (mm)*	3. Gün (mm)*
Kılılı.2010.A	<i>F. oxysporum</i>	16	24	12±2a	22,8±0,8a
Kılılı.2010.B	<i>F. oxysporum</i>	16	24	15,2±2,8ab	25±1,6a
Aksu.2011.2A	<i>F. oxysporum</i>	16	24	16,4±1,7b	30,2±2,3b
Kılavuzlu.2011.2B	<i>F. oxysporum</i>	16	24	18,6±1,3b	34,6±2,4b
Kılılı.2011.2A	<i>F. solani</i>	16	24	11,2±1,1a	28,8±1,3ab
Kürtül.2011.2A	<i>Fusarium</i> sp.	16	24	24,2± 2,7c	39,8±3,2c
Bk.2011.1B	<i>F. oxysporum</i>	16	24	19,8±1,5b	32,2±3,0b
Bk.2011.2D	<i>F. oxysporum</i>	16	24	13,6±2,5a	23,2±3a
Bk.2011.3A	<i>F. oxysporum</i>	16	24	18,6±1,1b	33,2±1,9b

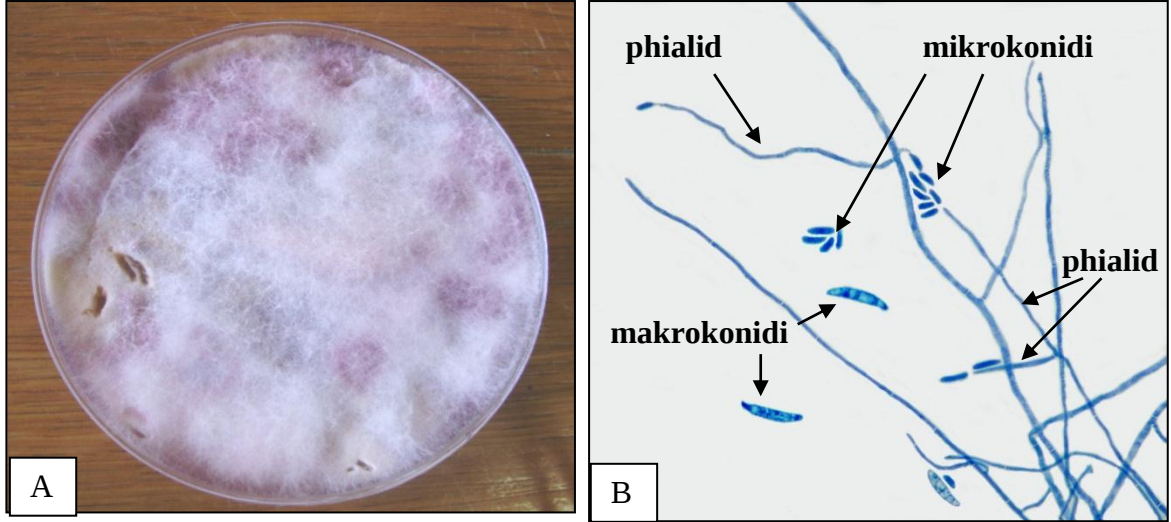
*Aynı harfi içeren sütunlardaki ortalamalar arasında Tukey testine göre istatistikî olarak önemli bir fark yoktur (n=9, P>0.05).

^aSekans analizleri sonucunda elde edilen tür teşhis adlarıdır.

Fusarium oxysporum olarak teşhis edilen izolatların morfolojik gelişimleri incelendiğinde sporların 16 saat içinde çimlendiği ve çimlenmenin 24 saat içinde tamamlandığı gözlenmiştir. *F. solani*'nin gelişimi de incelendiğinde sporların 16 saat içinde çimlendiği ve 24 saat içinde çimlenmenin tamamlandığı gözlenmiştir. Tüm *F. oxysporum* ve *F. solani* izolatlarının ekim yapıldıktan 3 gün sonra petri kaplarında koloni gelişimlerini tamamlamıştır. İzolatların günler içinde gelişimlerine bakıldığında ANOVA testi sonucunda istatistikî olarak fark gözlenmiştir (48 saat için F=17,89, P=0,000; 3. Gün için F=31,71, P=0,000). Her bir izolatın diğer izolatlar ile olan farklılıkları Çizelge 4.3'de verilmiştir. Aynı harfi içeren sütunlardaki ortalamalar arasında Tukey testine göre istatistikî olarak önemli bir fark yoktur (n=9, P>0.05).

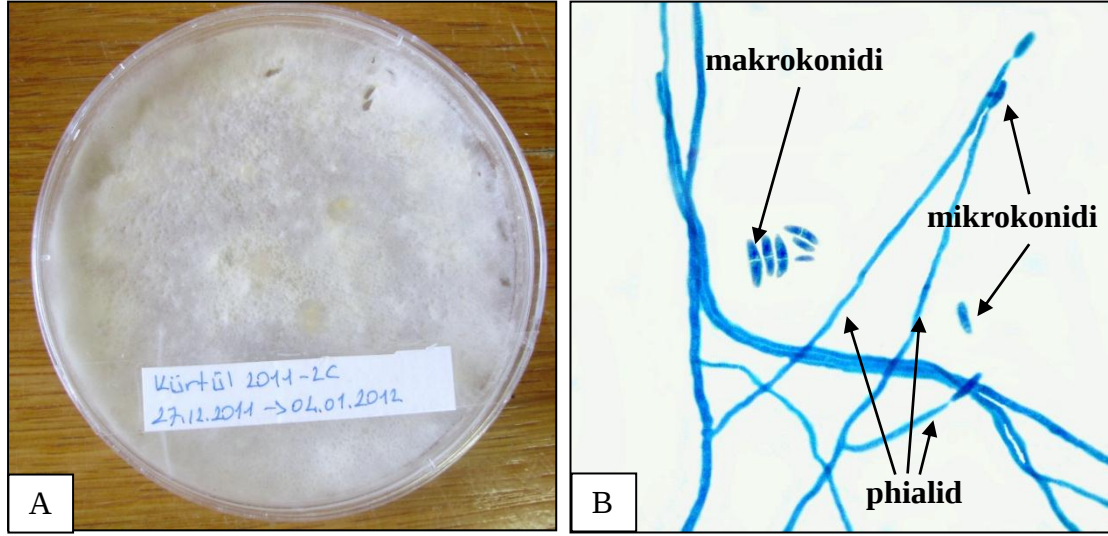
F. oxysporum kolonilerinde havasal miselyumlar beyaz renkte gelişimlerine başlarken ilerleyen evrede renk hafif morumsu renk alır. Kültür ortamında alt kısmın rengi kırmızımsı morumsu renktedir (Şekil 4.4.A). Phialidler tekil halde, kısa yapıda, 2,7±0,6 x 40,9±8,4 µm boyutlarındadır. Makrokonidiler fuziform (iğ biçimli), çoğu zaman 2-3

bölmeli, hafifçe kıvrılmış, $15,1 \pm 7,4 \times 7,6 \pm 7,4 \mu\text{m}$ boyutlarındadır (Şekil 4.4.B). Mikrokonidiler tekil halde, zincir oluşturmayan, çoğunlukla tek hücreli septasız, elips veya silindirik yapıda, bazen düz bazen de hafif kıvrılmış, $2,7 \pm 0,5 \times 8,6 \pm 1,3 \mu\text{m}$ boyutlarındadır (Şekil 4.4.B).



Şekil 4.4. A) *F. oxysporum* kolonilerin kültür ortamında gelişimi. B) Makrokonidi, mikrokonidi ve phialidler.

F. solani kolonilerinde havasal miselyumlar beyazımsı krem rengindedir. Kültür ortamında alt kısmın rengi şeffaf renktedir ve eski kültürde renk değişmemiştir (Şekil 4.5.A). Phialidler tekil halde, *F. oxysporum* ile karşılaştırıldığında oldukça uzun yapıda, $2,4 \pm 0,7 \times 76,7 \pm 36,5 \mu\text{m}$ boyutlarındadır. Makrokonidiler fuziform (iğ biçimli), çoğu zaman 2-3 bölmeli, bazal ve apikal kısmı küt yapıda, $3,5 \pm 0,5 \times 15,7 \pm 2,5 \mu\text{m}$ boyutlarındadır. Mikrokonidiler genellikle tekil, silindirik veya oval yapıda, 1-2 hücreli $2,8 \pm 0,4 \times 9,1 \pm 1,65 \mu\text{m}$ boyutlarındadır (Şekil 4.5.B).



Şekil 4.5. A) *F. oxysporum* kolonilerin kültür ortamında gelişimi. B) Makrokonidi, mikrokonidi ve phialidler

Çizelge 4.4. *B. bassiana*, *Penicillium* sp. ve *A. flavus* EPF'lerin konidi ve konidiyofor boyutlarının ölçümleri

Entomopatojen funguslar	Konidi		Konidiyofor	
	En (µm)	Boy (µm)	En (µm)	Boy(µm)
<i>Beauveria bassiana</i>	1,6±0,3	1,8±0,3	1,7±0,3	5,9±1,2
<i>Penicillium</i> sp.	2,1±0,5	2,6±0,7	1,9±1,1	6,3±0,7
<i>Aspergillus flavus</i>	4,5±0,6	4,9±0,6	3,1±0,5	8,0±1,0

Çizelge 4.5. *F. oxysporum* ve *F. solani* EPF'lerin makrospor, mikrospor ve phialid boyutlarının ölçümleri

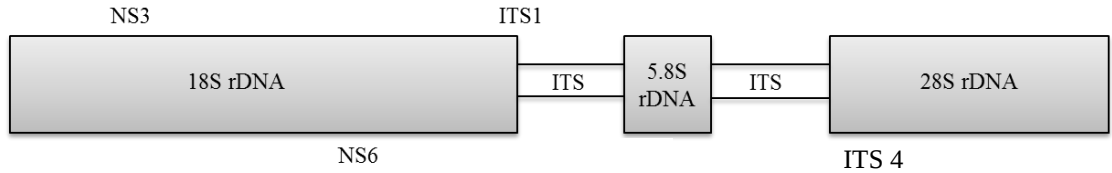
Entomopatojen funguslar	Mikrospor		Makrospor		Phialid	
	En (µm)	Boy (µm)	En (µm)	Boy (µm)	En (µm)	Boy (µm)
<i>Fusarium oxysporum</i>	2,7±0,5	8,6±1,3	7,6±7,4	15,1±7,4	2,7±0,6	40,9±8,4
<i>Fusarium solani</i>	2,8±0,4	9,1±1,6	3,5±0,5	15,7±2,5	2,4±0,7	76,7±36,5

4.2. Moleküler Karakterizasyon

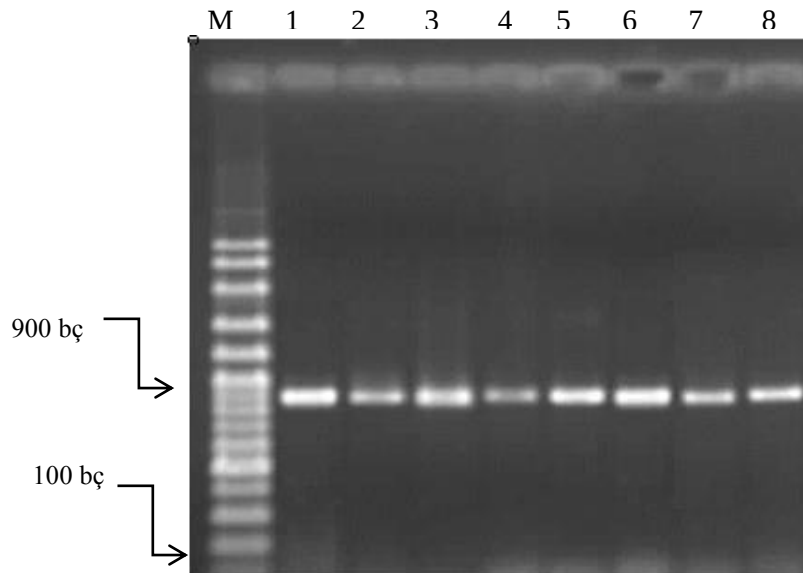
Morfolojik tanımlamayı teyit etmek için EPF'ler moleküler olarak da tanımlanmıştır. Bu işlemde fungusların 18S gen bölgesi ve ITS gen bölgesi PCR ile yükselti olarak çoğaltılmıştır. Çoğaltılan gen bölgelerinin sekansları yapılarak Blast üzerinden yeniden tanımlanmıştır.

4.2.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

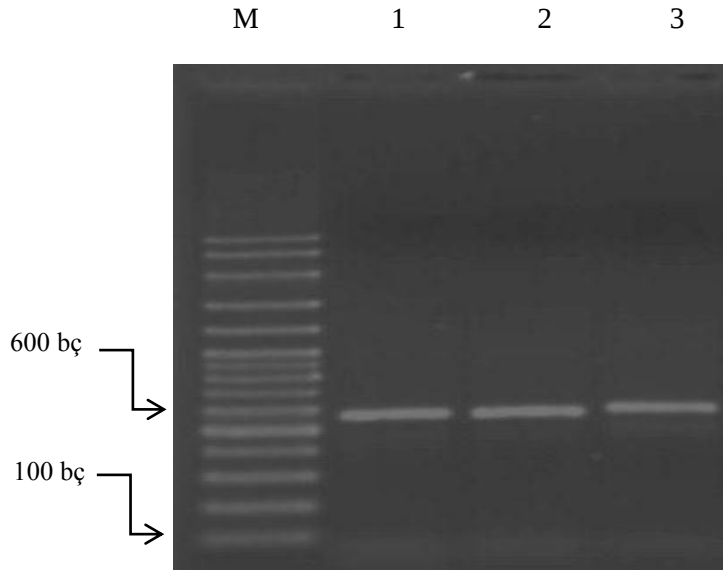
Şekil 4.6.'da rDNA üzerinde gösterilen primer çiftleri (ITS 1, ITS 4, NS 3, NS 6) fungus geninin alt ve üst bölgesini PCR ile çoğaltacak şekilde tasarlanmıştır. PCR reaksiyonunda kalıp DNA zinciri olarak izole edilen kromozomal DNA 3.8 ve 3.9'da detaylandırılan PCR koşulları kullanılarak yapılmış, çoğaltılan PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.7; 4.8; 4.9; 4.10; 4.11).



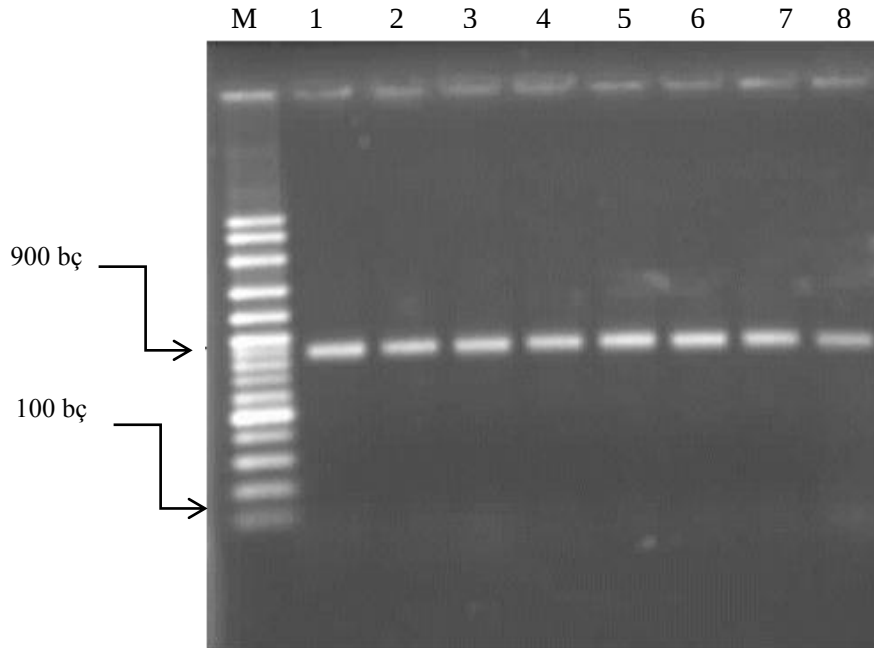
Şekil 4.6. Çalışmada kullanılan ITS 1; ITS 4ve NS 3; NS 6 primerlerinin rDNA üzerindeki yerleri (White ve ark., 1990).



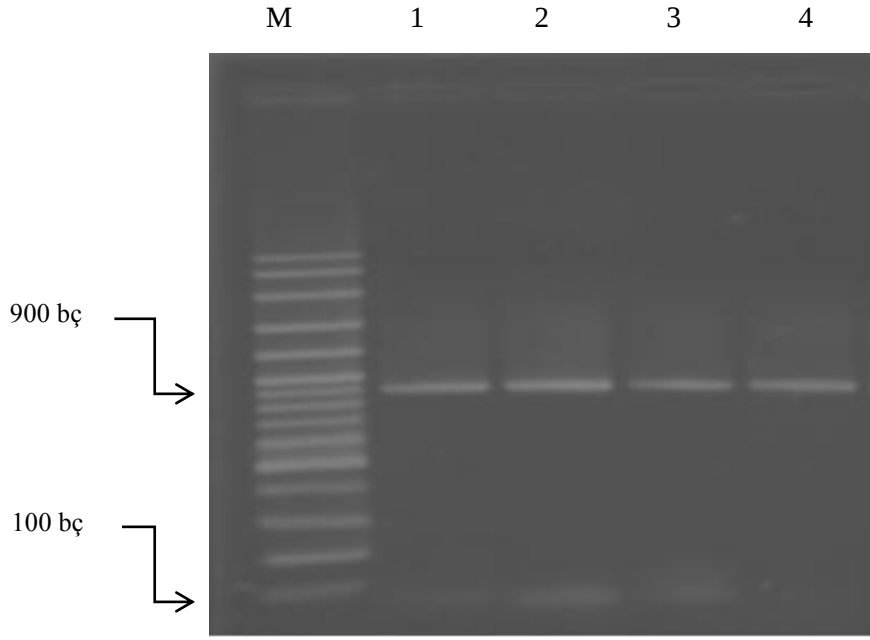
Şekil 4.7. NS 3 ve NS 6 primeri ile elde edilen DNA bantları. M; DNA ladder 100 bç, 1; Aksu.2010.C, 2; Aksu.2010.F, 3; Bk.2010.2C, 4; Bk.2010.1A, 5; Kapiçam.2010.E, 6; Kapiçam.2010.C, 7; Önsen.2010.B, 8; Bk.2010.3A.



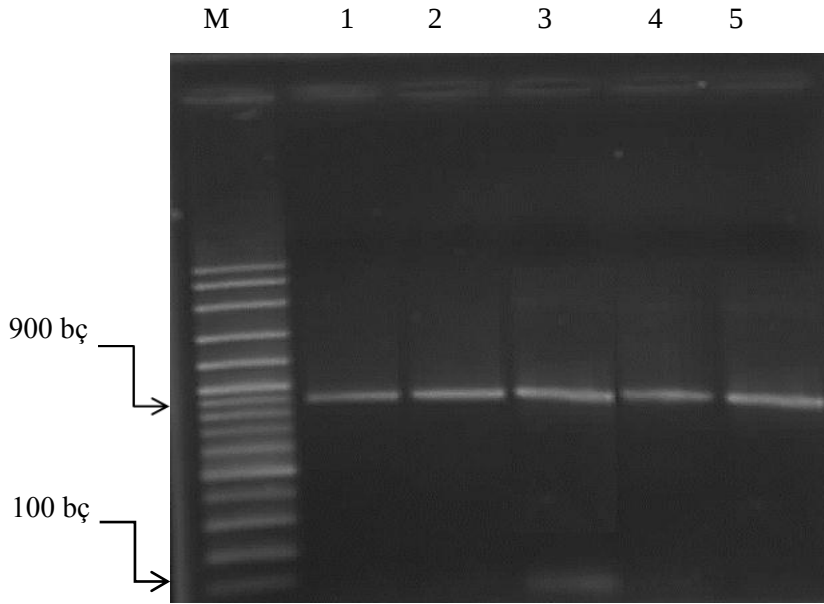
Şekil 4.8. ITS 1 ve ITS 4 primeri ile elde edilen DNA bantları, M; DNA ladder 100 bp, 1; Kılavuzlu.2010.B, 2; Kılavuzlu.2010.C, 3; Kürtül.2010.C



Şekil 4.9. NS 3 ve NS 6 primeri ile elde edilen DNA bantları. M; DNA ladder 100 bp, 1; Aksu.2011.2A, 2; Bk.2011.1C, 3; Bk.2011.2D 4; Bk.2011.3A, 5; Kılılı.2011.2A, 6; Kılılı.2010.A, 7; Kürtül.2011.2A, 8; Kılılı.2010.B



Şekil 4.10. NS 3 ve NS 6 primeri ile elde edilen DNA bantları. M; DNA ladder 100 bç, 1; Aksu.2011.2C, 2; Kapiçam.2011.1A, 3; Kılavuzlu.2011.2A, 4,, Kılavuzlu.2011.2B



Şekil 4.11. NS 3 ve NS 6 primeri ile elde edilen DNA bantları. M; DNA ladder 100 bç, 1; Önsen.2011.2B, 2; BK.2011.1B, 3; BK.2011.2B, 4; BK.2011.2K, 5; BK.2011.3E

4.2.2. Elde edilen fungus PCR ürünlerinin sekans analizleri

Yapılan PCR sonuçları doğrultusunda 7 farklı bölgeden izole edilen 28 izolatin tanımlanmasını teyit etmek amacı ile sekans çalışması yapılmıştır. Sekanslama işlemi 3.5.3'te detaylı bir şekilde belirtilen aşamalarda hazırlanmış ve örneklerin nükleotid dizileri belirlenmiştir. Bu elde edilen sonuçlar ise Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Üzerinde çalışılan fungus türlerinin Blast sonuçları

EPF'nin Laboratuvar Kodu	Sekans Analizi Sonuçlarına Göre İdentifikasyon
Kılavuzlu.2010.B	<i>B.bassiana</i>
Kılavuzlu.2010.C	<i>A. flavus</i>
Kürtül.2010.C	<i>B. bassiana</i>
Aksu.2010.C	<i>A. flavus</i>
Aksu.2010.F	<i>B. bassiana</i>
Kapıçam.2010.C	<i>B. bassiana</i>
Kapıçam.2010.E	<i>B. bassiana</i>
Önsen.2010.B	<i>B. bassiana</i>
Kılılı.2010.A	<i>F.oxysporum</i>
Kılılı.2010.B	<i>F. oxysporum</i>
Bk.2010.1A	<i>Beauveria</i> sp.
Bk.2010.2C	<i>B. bassiana</i>
Bk.2010.3A	<i>A. flavus</i>
Aksu.2011.2C	<i>B. bassiana</i>
Aksu.2011.2A	<i>F. oxysporum</i>
Kılavuzlu.2011.2A	<i>Penicillium</i> sp.
Kılavuzlu.2011.2B	<i>F. oxysporum</i>
Kapıçam.2011.1A	<i>B. bassiana</i>
Kılılı.2011.2A	<i>F. solani</i>
Kürtül.2011.2A	<i>Fusarium</i> sp.
Önsen.2011.2B	<i>B. bassiana</i>
Bk.2011.1B	<i>F. oxysporum</i>
Bk.2011.1C	<i>B. bassiana</i>
Bk.2011.2B	<i>A. flavus</i>
Bk.2011.2D	<i>F. oxysporum</i>
Bk.2011.2K	<i>B. bassiana</i>
Bk.2011.3A	<i>F. oxysporum</i>
Bk.2011.3E	<i>B. bassiana</i>

Morfolojik olarak tanımlanan 4 farklı bölgeden izole edilmiş *A. flavus* izolatları moleküler olarak teyit edilmiştir. Aksu.2010.C, Bk.2010.3A ve Bk. 2011. 2B örnekleri NS 3 ve NS 6 primerleriyle 18S gen bölgesi çoğaltılmış ve elde edilen sekans analiz sonuçları ile moleküler teyit yapılmıştır. Kılavuzlu.2010.C izolatu ITS 1 ve ITS 4 primerleriyle ITS bölgesi çoğaltılmış ve elde edilen sekans analiz sonucu ile bu örneğin *A. flavus* olduğu teyit edilmiştir. Sekans işlemleri ileri ve geri primerleri ile yapılmış ve elde edilen sonuçların tutarlılıkları Clone Manager 9 programı ile karşılaştırılmış ve dizi sonuçları Şekil 4.12-15'te verilmiştir.

```

1   gcagtaactgg tccggctgga ccttttccttc tggggaacct catggccttc actggctgtg
61  gggggaacca ggacttttac tgtgaaaaaa ttagagtgtt caaagcaggc ctttgctcga
121 atacattagc atggaataat agaataaggac gtgcggttct attttggttg tttctaggac
181 cgccgtaatg attaataggg atagtcgggg gcgtcagtat tcagctgtca gaggtgaaat
241 tcttggaattt gctgaagact aactactgcg aaagcattcg ccaaggatgt tttcattaat
301 cagggaacga aagttagggg atcgaagacg atcagatacc gtcgtagtct taaccataaa
361 ctatgccgac tagggatcgg gcggtgtttc tatgatgacc cgctcggcac cttacgagaa
421 atcaaagttt ttgggttctg ggcggagtat ggtcgcaagg ctgaaactta aagaaattga
481 cggaagggca ccacaaggcg tggagcctgc ggcttaattt gactcaaaca cggggaaact
541 caccagagtc cagacaaaat aaggattgac agattgaaaa gtccttttct tgatcctttt
601 gggatgggtg gtgcctggcc cgtccctcgt tgggggagtg attttgctct ccttaattgc
661 gataacgaac gagaccttcc gccccttaaa atagccccgg gccgcctttt ggccggggcc
721 ccctgggctt ctttaggggg gactatcccg cctcaagccg

```

Şekil 4.12. Aksu.2010.C (*A. flavus*) örneğine ait yapılan 18S gen bölgesi sekans dizilenmesi

```

1   gaacttaaca ttttttagctc tcaacataga agcagcggcc gcaacgcgga ccgggctatt
61  taagggttta ggtctcgttc gttatcgcaa ttaagcgaca aatcactcca ccaactaaga
121 acggccatgc accacctcca aaagatcaag aaagagctct caatctgtca atccttattt
181 tgtctggacc tggtaggttt cccgtgttg agtcaaatta agccgcaggc tccacgcctt
241 gtggtgccct tccgtcaatt tctttaagtt tcagccttgc gaccatactc ccccagaac
301 ccaaaaactt tgattttctg taagggtgcc agcgggtcat cataaaacac cgcccgatcc
361 ctagtgcgca tagtttatgg ttaagactac gacggtatct gatcgtcttc gatcccctaa
421 ctttcgttcc ctgattaatg aaaacatcct tggcgaatgc ttctgcagta gttagtcttc
481 agcaaatcca agaatttcac ctctgacagc tgaatactga cgccccgcac tatccctatt
541 aatcattacg gcggtcctag aaaccaacaa atagaaccgc acgtcctatt cta

```

Şekil 4.13. Bk.2010.3A (*A. flavus*) örneğine ait 18S gen bölgesi sekans dizilenmesi

```

1   gtagttgaac cttgggtctg gctggccggt ccgcctcacc gcgagtactg ggtccggctg
61  gacctttcct tctggggaac ctcatggcct tcaactggctg tggggggaac caggactttt
121 actgtgaaaa aattagagtg ttcaaagcag gcctttgctc gaatacatta gcatggaata
181 atagaatagg acgtgcggtt ctattttgtt ggtttctagg accgccgtaa tgattaatag
241 ggatagtcgg ggcgtcagt attcagctgt tcagaggatga aattcttgga tttgctgaag
301 actaactact gcgaaagcat tcgccaagga tgttttcatt aatcagggaa cgaaagttag
361 gggatcgaag acgatcagat accgtcgtag tcttaacat aaactatgcc gactagggat
421 cgggcgggtg tttatgatga cccgtcggc accttacgag aaatcaaagt ttttgggttc
481 tggggggagt atggctgcaa ggctgaaact taaagaaatt gacggaagg caccacaagg
541 cgtggagcct gcggcttaat ttgactcaac acggggaaac tcaccaggtc cagacaaaat
601 aaggattgac agattgagag ctctttcttg atcttttgga tgggtgtgca tggccgttct
661 tagttgggtg agtgatttgt ctgcttaatt gcgataacga agagcctcgg cccttaataa
721 gccgggtccg cgtttgcggg ccgctgagac ccgaaccctt ttatgc

```

Şekil 4.14. Bk. 2011. 2B (*A. flavus*) örneğine ait 18S gen bölgesi sekans dizilenmesi

```

1   aacccatatt gcttcgttgg gttctagcga gcccaacctc ccacccgtgt ttactgtacc
61  ttagttgctt cggcgggccc gccattcatg gccgcggggg gctctcagcc cggggcccgc
121 gcccgcggga gacaccacga actctgtctg atctagttaa gtctgagttg attgtatcgc
181 aatcagttaa aactttcaac aatggatctc ttgggtccgg catcgatgaa gaacgcagcg
241 aaatgcgata actagtgtga attgcagaat tccgtgaatc atcgagtctt tgaacgcaca
301 ttgcgcccc ttgtattccg gggggcatgc ctgtccgagc gtcattgctg cccatcaagc
361 acggcttgtg tgttgggtcg tctccctc tccggggggg acgggcccc aaggcagcgg
421 cggcaccgcg tccgatcctc gagcgtatgg ggctttgtca cccgctctgt aggccgggcc
481 ggcgcttgcc gaacgcaaat caatcttttt ccaggttgac ctcgcatca

```

Şekil 4.15. Kılavuzlu.2010.C (*A. flavus*) örneğine ait ITS bölgesi sekans dizilenmesi

Morfolojik olarak *F. oxysporum* tanımlanmış 7 izolat (Aksu.2011.2A, BK.2011.1B, BK.2011.2D, BK.2011.3A, Kılavuzlu.2011.2B Kılılı.2010.A ve Kılılı.2010.2A) 18S gen bölgesi (900 bp) NS 3 ve NS 6 primerleri ile çoğaltılmış ve her iki yönde (ileri ve geri) dizilenmiştir. Konsensus dizi sonuçları Blast yapılarak morfolojik tanımlama moleküler olarak teyit edilmiştir. Bu izolatlara ait konsensus diziler Clone Manager 9 programı ile hizalanmış ve sonuçlar toplu olarak Şekil 4.16’de verilmiştir.

```

AKSU.2011.2A      1   gttgttgtggttaaaagctcgtagttgaaccttgggctggctggtgggtccgcctcaccgcgtgtactgg
BK.2011.1B       1   gttgttgtggttaaaagctcgtagttgaaccttgggctggctggagggtccgcctcaccgcgtgtactgg
BK.2011.2D       1   gttgttgtggttaaaagctcgtagttgaaccttgggctggctggcggtccgcctcaccgcgtgtactgg
BK.2011.3A       1   gttgttgtggtt-aaagctcgtagttgaaccttgggctggctggtgggtccgcctcaccgcgtgtactgg
KILAVUZLU.2011.2B 1   gttgttgtggttaaaagctcgtagttgaaccttgggctggctgggggtccgcctcaccgcgtgtactgg
KILILI.2010.A    1   gttgttgtggtt-aaagctcgtagttgaaccttgggctggctggcggtccgcctcaccgcgtgtactgg
KILILI.2011.2A   1   gttgttgtggttaaaagctcgtagttgaaccttgggctggctggcggtccgcctcaccgcgtgtactgg

AKSU.2011.2A     71  tccggccgggcccctttccctctgtggaaccccatgcccttcactgggtgtggcggggaaacaggactttta
BK.2011.1B       71  tccggccgggcccctttccctctgtggaaccccatgcccttcactgggtgtggcggggaaacaggactttta
BK.2011.2D       71  tccggccgggcccctttccctctgtggaaccccatgcccttcactgggtgtggcggggaaacaggactttta
BK.2011.3A       70  tccggccgggcccctttccctctgtggaaccccatgcccttcactgggtgtggcggggaaacaggactttta
KILAVUZLU.2011.2B 71  tccggccgggcccctttccctctgtggaaccccatgcccttcactgggtgtggcggggaaacaggactttta
KILILI.2010.A    70  tccggccgggcccctttccctctgtggaaccccatgcccttcactgggtgtggcggggaaacaggactttta
KILILI.2011.2A   71  tccggccgggcccctttccctctgtggaaccccatgcccttcactgggtgtggcggggaaacaggactttta

AKSU.2011.2A     141 ctgtgaaaaaattagagtgtccaggcaggcctatgctcgaatacattagcatggaataatagaatagga
BK.2011.1B       141 ctgtgaaaaaattagagtgtccaggcaggcctatgctcgaatacattagcatggaataatagaatagga
BK.2011.2D       141 ctgtgaaaaaattagagtgtccaggcaggcctatgctcgaatacattagcatggaataatagaatagga
BK.2011.3A       140 ctgtgaaaaaattagagtgtccaggcaggcctatgctcgaatacattagcatggaataatagaatagga
KILAVUZLU.2011.2B 141 ctgtgaaaaaattagagtgtccaggcaggcctatgctcgaatacattagcatggaataatagaatagga
KILILI.2010.A    140 ctgtgaaaaaattagagtgtccaggcaggcctatgctcgaatacattagcatggaataatagaatagga
KILILI.2011.2A   141 ctgtgaaaaaattagagtgtccaggcaggcctatgctcgaatacattagcatggaataatagaatagga

AKSU.2011.2A     211 cgtgtggttctattttgttggtttctaggaccgcgtaatgattaatagggacagtcgggggcatcagta
BK.2011.1B       211 cgtgtggttctattttgttggtttctaggaccgcgtaatgattaatagggacagtcgggggcatcagta
BK.2011.2D       211 cgtgtggttctattttgttggtttctaggaccgcgtaatgattaatagggacagtcgggggcatcagta
BK.2011.3A       210 cgtgtggttctattttgttggtttctaggaccgcgtaatgattaatagggacagtcgggggcatcagta
KILAVUZLU.2011.2B 211 cgtgtggttctattttgttggtttctaggaccgcgtaatgattaatagggacagtcgggggcatcagta
KILILI.2010.A    210 cgtgtggttctattttgttggtttctaggaccgcgtaatgattaatagggacagtcgggggcatcagta
KILILI.2011.2A   211 cgtgtggttctattttgttggtttctaggaccgcgtaatgattaatagggacagtcgggggcatcagta

AKSU.2011.2A     281 ttcaattgtcagaggtgaaattcttggatttattgaagactaactactgcgaaagcatttgccaaggatg
BK.2011.1B       281 ttcaattgtcagaggtgaaattcttggatttattgaagactaactactgcgaaagcatttgccaaggatg
BK.2011.2D       281 ttcaattgtcagaggtgaaattcttggatttattgaagactaactactgcgaaagcatttgccaaggatg
BK.2011.3A       280 ttcaattgtcagaggtgaaattcttggatttattgaagactaactactgcgaaagcatttgccaaggatg
KILAVUZLU.2011.2B 281 ttcaattgtcagaggtgaaattcttggatttattgaagactaactactgcgaaagcatttgccaaggatg
KILILI.2010.A    280 ttcaattgtcagaggtgaaattcttggatttattgaagactaactactgcgaaagcatttgccaaggatg
KILILI.2011.2A   281 ttcaattgtcagaggtgaaattcttggatttattgaagactaactactgcgaaagcatttgccaaggatg

AKSU.2011.2A     351 ttttcattaatcaggaacgaaagtttaggggatcgaagacgatcagataccgtcgtagtcttaaccataaa
BK.2011.1B       351 ttttcattaatcaggaacgaaagtttaggggatcgaagacgatcagataccgtcgtagtcttaaccataaa

```

BK.2011.2D	351	ttttcattaatcaggaacgaaagtttaggggatcgaagacgatcagataaccgtcgtagtctttaaccataaa
BK.2011.3A	350	ttttcattaatcaggaacgaaagtttaggggatcgaagacgatcagataaccgtcgtagtctttaaccataaa
KILAVUZLU.2011.2B	351	ttttcattaatcaggaacgaaagtttaggggatcgaagacgatcagataaccgtcgtagtctttaaccataaa
KILILI.2010.A	350	ttttcattaatcaggaacgaaagtttaggggatcgaagacgatcagataaccgtcgtagtctttaaccataaa
KILILI.2011.2A	351	ttttcattaatcaggaacgaaagtttaggggatcgaagacgatcagataaccgtcgtagtctttaaccataaa
AKSU.2011.2A	421	ctatgccgactagggatcggacggtgttattttttgaccggttcggcaccttacgagaaatcaaagtgtct
BK.2011.1B	421	ctatgccgactagggatcggacggtgttattttttgaccggttcggcaccttacgagaaatcaaagtgtct
BK.2011.2D	421	ctatgccgactagggatcggacggtgttattttttgaccggttcggcaccttacgagaaatcaaagtgtct
BK.2011.3A	421	ctatgccgactagggatcggacggtgttattttttgaccggttcggcaccttacgagaaatcaaagtgtct
KILAVUZLU.2011.2B	421	ctatgccgactagggatcggacggtgttattttttgaccggttcggcaccttacgagaaatcaaagtgtct
KILILI.2010.A	420	ctatgccgactagggatcggacggtgttattttttgaccggttcggcaccttacgagaaatcaaagtgtct
KILILI.2011.2A	421	ctatgccgactagggatcggacggtgttattttttgaccggttcggcaccttacgagaaatcaaagtgtct
AKSU.2011.2A	491	tgggctccagggggagtagtggtcgcaaggctgaaacttaagaaattgacggaagggcaccaccaggggt
BK.2011.1B	491	tgggctccagggggagtagtggtcgcaaggctgaaacttaagaaattgacggaagggcaccaccaggggt
BK.2011.2D	491	tgggctccagggggagtagtggtcgcaaggctgaaacttaagaaattgacggaagggcaccaccaggggt
BK.2011.3A	490	tgggctccagggggagtagtggtcgcaaggctgaaacttaagaaattgacggaagggcaccaccaggggt
KILAVUZLU.2011.2B	491	tgggctccagggggagtagtggtcgcaaggctgaaacttaagaaattgacggaagggcaccaccaggggt
KILILI.2010.A	490	tgggctccagggggagtagtggtcgcaaggctgaaacttaagaaattgacggaagggcaccaccaggggt
KILILI.2011.2A	491	tgggctccagggggagtagtggtcgcaaggctgaaacttaagaaattgacggaagggcaccaccaggggt
AKSU.2011.2A	561	ggagcctgcggccttaatttgactcaacacggggaaactcaccaggtccagacacaaatgaggattgacaga
BK.2011.1B	561	ggagcctgcggccttaatttgactcaacacggggaaactcaccaggtccagacacaaatgaggattgacaga
BK.2011.2D	561	ggagcctgcggccttaatttgactcaacacggggaaactcaccaggtccagacacaaatgaggattgacaga
BK.2011.3A	560	ggagcctgcggccttaatttgactcaacacggggaaactcaccaggtccagacacaaatgaggattgacaga
KILAVUZLU.2011.2B	561	ggagcctgcggccttaatttgactcaacacggggaaactcaccaggtccagacacaaatgaggattgacaga
KILILI.2010.A	560	ggagcctgcggccttaatttgactcaacacggggaaactcaccaggtccagacacaaatgaggattgacaga
KILILI.2011.2A	561	ggagcctgcggccttaatttgactcaacacggggaaactcaccaggtccagacacaaatgaggattgacaga
AKSU.2011.2A	631	ttgagagctctttcttgattttgtgggtggtggtgcatggccgttcttagttggtggagtatttgtctg
BK.2011.1B	631	ttgagagctctttcttgattttgtgggtggtggtgcatggccgttcttagttggtggagtatttgtctg
BK.2011.2D	631	ttgagagctctttcttgattttgtgggtggtggtgcatggccgttcttagttggtggagtatttgtctg
BK.2011.3A	630	ttgagagctctttcttgattttgtgggtggtggtgcatggccgttcttagttggtggagtatttgtctg
KILAVUZLU.2011.2B	630	ttgagagctctttcttgattttgtgggtggtggtgcatggccgttcttagttggtggagtatttgtctg
KILILI.2010.A	630	ttgagagctctttcttgattttgtgggtggtggtgcatggccgttcttagttggtggagtatttgtctg
KILILI.2011.2A	631	ttgagagctctttcttgattttgtgggtggtggtgcatggccgttcttagttggtggagtatttgtctg

Şekil 4.16. *F. oxysporum* türüne ait 18S gen bölgesi sekans hizalaması

Morfolojik olarak *F. Solani* olarak tanımlanmış Kılılı.2011.2A örneği NS 3 ve NS 6 primerleriyle 18S gen bölgesi çoğaltılmış ve elde edilen sekans analiz sonucu ile morfolojik sonuç teyit edilmiştir. Karşılaştırılmalı ileri ve geri primerleri kullanılarak elde edilen nükleotid diziler Clone Manager 9 programı ile karşılaştırılmış ve konsensus dizi Şekil 4.17’de verilmiştir.

1	aattaagttg	ttgtggttaa	aagctcgtag	ttgaaccttg	ggcctggctg	gccgggtccgc
61	ctcaccgcgt	gtactggtcc	ggccgggcct	ttccctctgt	ggaaccccat	gcccttcact
121	gggtgtggcg	gggaaacagg	acttttactg	tgaaaaaatt	agagtgtcc	aggcaggcct
181	atgctcgaat	acattagcat	ggaataatag	aataaggacg	gtggttctat	tttgttggtt
241	tctaggaccg	ccgtaatgat	taataaggac	agtccggggc	atcagtattc	aattgtcaga
301	ggtgaaattc	ttggatttat	tgaagactaa	ctactgcaa	agcatttgcc	aaggatgttt
361	tcattaatca	ggaacgaaag	ttaggggatc	gaagacgatc	agataccgtc	gtagtcttaa
421	ccataaaacta	tgccgactag	ggatcggacg	gtgttatatt	ttgaccggtt	cggcacctta
481	cgagaaatca	aagtgccttg	gctccagggg	gagtatggtc	gcaaggctga	aacttaaaga
541	aattgacgga	agggcaccac	caggggtgga	gcctgcccgt	taatttgact	caacacgggg
601	aaactcacca	ggtccagaca	caatgaggat	tgacagattg	agagctcttt	cttgatcttg
661	tg					

Şekil 4.17. *F. solani* türüne ait 18S gen bölgesi sekans dizilenmesi

Morfolojik olarak *B. bassiana* türü olarak tanımlanan 7 tane (Aksu.2010.F, Aksu.2011.2C, Bk.2010.1A, Bk.2011.1C, Kıpıçam.2010.E, Önsen.2010.B ve Önsen.2011.2B) örnek NS 3 ve NS 6 primerleriyle 18S gen bölgesi çoğaltılmış ve elde

edilen sekans dizi sonuçlarıyla bu örneklerin *B. bassiana* olduğu moleküler olarak teyit etmiştir. Bu örneklerle ait nükleotid dizi sonuçları Clone Manager 9 programı ile analiz edilmiş ve hizalanarak Şekil 4.18’de verilmiştir.

Aksu.2010.F	1	tgttggtggttaaaaagctcgtagttgaaccttgggcctggctggcggtccgcctcaccg
Aksu.2011.2C	1	tgttggtggtt-aaaagctcgtagttgaaccttgggcctggctggcggtccgcctcaccg
Bk.2010.1A	1	-----ccttgggcc-----
Bk.2011.1C	1	tgttggtggttaaaaagctcgtagttgaaccttgggcctggctggcggtccgcctcaccg
Kapıçam.2010.E	1	tgttggtggttaaaaagctcgtagttgaaccttgggcctggctggcggtccgcctcaccg
Önsen.2010.B	1	tgttggtggttaaaaagctcgtagttgaaccttgggcctggctggcggtccgcctcaccg
Önsen.2011.2B	1	tgttggtggttaaaaagctcgtagttgaaccttgggcctggctggcggtccgcctcaccg
Aksu.2010.F	61	cgtgtactggtccggccgggcccctttccctctgtggaacctcatgcccttcactgggtgtg
Aksu.2011.2C	60	cgtgtactggtccggccgggcccctttccctctgtggaacctcatgcccttcactgggtgtg
Bk.2010.1A	10	ggtgtact-----gccgggcccctttccctctgtggaacctcatgccc-tcactgggtgtg
Bk.2011.1C	61	cgtgtactggtccggccgggcccctttccctctgtggaacctcatgcccttcactgggtgtg
Kapıçam.2010.E	61	cgtgtactggtccggccgggcccctttccctctgtggaacctcatgcccttcactgggtgtg
Önsen.2010.B	59	cgtgtactggtccggccgggcccctttccctctgtggaacctcat---cttcactgggtgtg
Önsen.2011.2B	61	cgtgtactggtccggccgggcccctttccctctgtggaacctcatgcccttcactgggtgtg
Aksu.2010.F	121	gcggggaaacaggacttttactttgaaaaaattagagtgtccaggcaggcctatgctcg
Aksu.2011.2C	120	gcggggaaacaggacttttactttgaaaaaattagagtgtccaggcaggcctatgctcg
Bk.2010.1A	63	gcggggaaaca-gacttttactttgaaaaaattaga-----aggcctatgctcg
Bk.2011.1C	121	gcggggaaacaggacttttactttgaaaaaattagagtgtccaggcaggcctatgctcg
Kapıçam.2010.E	121	gcggggaaacaggacttttactttgaaaaaattagagtgtccaggcaggcctatgctcg
Önsen.2010.B	116	gcggggaaacagg--ttttactttgaaaaaattagagtgtccaggcaggcctatgctcg
Önsen.2011.2B	121	gcggggaaacaggacttttactttgaaaaaattagagtgtccaggcaggcctatgctcg
Aksu.2010.F	181	aatacattagcatggaataataaaaataggacgcgtggttctattttgttggtttctagga
Aksu.2011.2C	180	aatacattagcatggaataataaaaataggacgcgtggttctattttgttggtttctagga
Bk.2010.1A	111	aatac----gcatggaataataaaaataggacgcgtggttctattttgttggtttct-gga
Bk.2011.1C	181	aatacattagcatggaataataaaaataggacgcgtggttctattttgttggtttctagga
Kapıçam.2010.E	181	aatacattagcatggaataataaaaataggacgcgtggttctattttgttggtttctag-a
Önsen.2010.B	174	aatacattagcatggaataataaaaataggacgcgtggttctattttgttggtttctagga
Önsen.2011.2B	181	aatacattagcatggaataataaaaataggacgcgtggttctattttgttggtttctagga
Aksu.2010.F	241	ccgccgtaatgattaatagggacagtcgggggcatcagtattcaattgtcagaggtgaaa
Aksu.2011.2C	240	ccgccgtaatgattaatagggacagtcgggggcatcagtattcaattgtcagaggtgaaa
Bk.2010.1A	166	ccgccgtaatgattaatagggg-----gcatcagtattcaattgtc-gaggtgaaa
Bk.2011.1C	241	ccgccgtaatgattaatagggacagtcgggggcatcagtattcaattgtcagaggtgaaa
Kapıçam.2010.E	240	ccgccgtaatgattaatagggacagtcgggggcatcagtattcaattgtcagaggtgaaa
Önsen.2010.B	234	ccgccgtaatgattaatagggacagtcgggggcat-agtattcaattgtcagaggtgaaa
Önsen.2011.2B	241	ccgccgtaatgattaatagggacagtcgggggcatca-tattcaattgtcagaggtgaaa
Aksu.2010.F	301	ttcttagatttattgaagactaactactgcgaaagcatttgccaaggatgttttcattaa
Aksu.2011.2C	300	ttcttagatttattgaagactaactactgcgaaagcatttgccaaggatgttttcattaa
Bk.2010.1A	216	ttcttagatttattgaagactaactactgcgaaagcatttgccaaggatgttttcattaa
Bk.2011.1C	301	ttcttagatttattgaagactaactactgcgaaagcatttgccaaggatgttttcattaa
Kapıçam.2010.E	300	ttcttagatttattgaagactaactactgcgaaagcatttgccaaggatgttttcattaa
Önsen.2010.B	293	ttcttagatttatt--aagactaactactgcgaaagcatttgccaa--atgttttc-----
Önsen.2011.2B	300	ttcttagatttattgaagactaactactgcgaaagcatttgccaaggatgttttcattaa
Aksu.2010.F	361	tcaggaacgaaagttaggggatcgaagacgatcagataccgctcgtagtcttaaccataaa
Aksu.2011.2C	360	tcaggaacgaaagttaggggatcgaagacgatcagataccgctcgtagtcttaaccataaa
Bk.2010.1A	276	tc-----ttaggggatcgaagacg-tcagataccgctcgtagtcttaaccataaa
Bk.2011.1C	361	tcaggaacgaaagttaggggatcgaagacgatcagataccgctcgtagtcttaaccataaa
Kapıçam.2010.E	360	tcaggaacgaaagttaggggatcgaagacgatca-ataccgctcgtagtctta-ccataaa
Önsen.2010.B	345	tcaggaacgaaagttaggggatcgaagacgatca-----cgtagtcttaaa-----aaa
Önsen.2011.2B	360	tcaggaacgaaagttaggggatcgaagacgatcagataccgctcgtagtcttaaccataaa
Aksu.2010.F	421	ctatgccgactagggatcggacgatgttattttttgacgcgttcggcaccttacgagaaa
Aksu.2011.2C	420	ctatgccgactagggatcggacgatgttattttttgacgcgttcggcaccttacgagaaa
Bk.2010.1A	324	ctatgccgactagggatcggacgatgttattttttgacgcgttcggcaccttacgagaaa
Bk.2011.1C	421	ctatgccgactagggatcggacgatgttattttttgacgcgttcggcaccttacgagaaa
Kapıçam.2010.E	418	ctatgccgactagggatcggacgatgttattttttgacgcgttcggcaccttacgagaaa

ÖNSEN.2010.B	396	ctatgccgacta-----cggacgatgttattttttgacgcgttc-----cgagaaa
Önsen.2011.2B	420	ctatgccgactagggatcggacgatgttattttttgacgcgttcggcaccttacgagaaa
Aksu.2010.F	481	tcaaagtgccttgggctccagggggagtagtggtcgcaaggctgaaacttaaagaaattgac
Aksu.2011.2C	480	tcaaagtgccttgggctccagggggagtagtggtcgcaaggctgaaacttaaagaaattgac
Bk.2010.1A	384	tcaaa-----ggctccagggggagtagtggtcgcaaggctgaaacttaaagaaattga-
Bk.2011.1C	481	tcaaagtgccttgggctccagggggagtagtggtcgcaaggctgaaacttaaagaaattgac
Kapıçam.2010.E	478	tcaaagtgccttgggctccagggggagtagtggtcgcaaggctgaaacttaaagaaattgac
Önsen.2010.B	442	tcaaagtgcctt--gctccagggggagtagtggt---aaggctgaaacttaaagaaattga-
Önsen.2011.2B	480	tcaaagtgccttgggctccagggggagtagtggtcgcaaggctgaaacttaaagaaattgac
Aksu.2010.F	541	ggaagggcaccaccaggggtggagcctgcggcttaatttgactcaacacggggaaactca
Aksu.2011.2C	540	ggaagggcaccaccaggggtggagcctgcggcttaatttgactcaacacggggaaactca
Bk.2010.1A	436	ggaagggcaccaccaggggtggagcctgcggcttaatttgactcaacacgg-----
Bk.2011.1C	541	ggaagggcaccaccaggggtggagcctgcggcttaatttgactcaacacggggaaactca
Kapıçam.2010.E	538	ggaagggcaccaccaggggtggagcctgcggcttaatttgactcaacacggggaaactca
Önsen.2010.B	496	-----gcaccaccaggggtggagcctgcggcttaatttgactcaacacggggaaactca
Önsen.2011.2B	540	ggaagggcaccaccaggggtggagcctgcggcttaatttgactcaacacggggaaactca
Aksu.2010.F	601	ccaggtccagacacaaatgaggattgacagattgagagctctttcttgattttgtgggtgg
Aksu.2011.2C	600	ccaggtccagacacaaatgaggattgacagattgagagctctttcttgattttgtgggtgg
Bk.2010.1A	487	--aggtccagacacaaatgaggattgacagattgagagctctttcttgattttgtgggtgg
Bk.2011.1C	601	ccaggtccagacacaaatgaggattgacagattgagagctctttcttgattttgtgggtgg
Kapıçam.2010.E	598	cc--gtcca-acacaatgaggattgaca-attgagagctctttcttgattttgtgggtgg
Önsen.2010.B	550	ccaggtccagacacaaatgaggattgacaga-----gggtgg
Önsen.2011.2B	600	ccaggtccagacacaaatgaggattgacagattgagagctctttcttgattttgtgggtgg
Aksu.2010.F	661	tggtgcatggccgttcttagttggtggagtgatttgtctg--ctt-cattgcgataacga
Aksu.2011.2C	660	tggtgcatggccgttcttagttggtggagtgatttgtctg--ctt-cattgcgataacga
Bk.2010.1A	545	tggtgcatggccgttcttagttggtggagtgatttgtctg--ctt-cattgcgataac--
Bk.2011.1C	661	tggtgcatggccgttcttagttggtggagtgatttgtctg--ctt-cattgcgataacga
Kapıçam.2010.E	654	tggtgcatggccgttctta-ttgggggagtgatttgtctg--ctttcattgcgataacga
Önsen.2010.B	585	tggtgcatggccgttc-tagttggcggagtgatttgtctggcctt-cattgcgataacga
Önsen.2011.2B	660	tggtgcatggccgttctta-----

Şekil 4.18. *B. bassiana* türüne ait 18S gen bölgesi sekans hizalaması

Morfolojik olarak *B. bassiana* tanımlanan ancak hizalamada farklılık gösteren Sizolata (BK.2010.2C, BK.2011.2K, BK.2011.3E, . Kapıçam.2010.C, Kapıçam.2011.1A) ait diziler ayrı olarak Şekil 4.19-23’de verilmiştir.

1	tgtactggtc	ggccgggcct	ttccctctgt	ggaacctcat	gcccttcact	gggtgtggcg
61	gggaaacagg	acttttactt	tgaaaaaatt	agagtgtctc	aggcaggcct	atgctcgaat
121	acattagcat	ggaataataa	aataggacgc	gtgggttctat	tttggttggtt	tctaggaccg
181	ccgtaatgat	taatagggac	agtcgggggc	atcagtattc	aattgtcaga	ggtgaaattc
241	ttagatttat	tgaagactaa	ctactgcgaa	agcatttgcc	aaggatgttt	tcattaatca
301	ggaacgaaag	ttaggggatc	gaagacgatc	agataccgtc	gtagtcttaa	ccataaaata
361	tgccgactag	ggatcggacg	atgttatttt	ttgacgcgtt	cggcacctta	ccagaaatca
421	aagtgccttg	gctccagggg	gagtagtggtc	gcaaggctga	aacttaaaga	aattgacgga
481	agggcaccac	caggggtgga	gcctgcggct	tattttgact	caaacacggg	gaaaactcca
541	ccaggtccca	gacacaatga	ggatttgaca	gaatgaaagc	tcctttcttt	gatttttgtg
601	ggggggtggt	agcatggccg	ttcttttagtg	gggggagagg	attttggtct	gctttcattg
661	caataacgaa	acgagaacct	taacc			

Şekil 4.19. BK.2010.2C (*B. bassiana*) örneğine ait 18S gen bölgesi sekans dizilenmesi

```

1   gtggggcctta ataccgtata ttaagttggt gtgggttaaag ctcgtagttg aaccttgggc
61  ctggctggcc ggtccgcctc accgcgtgta ctgggtccggc cgggcctttc cctctgtgga
121 acctcatgcc cttcactggg tgtggcgggg aaacaggact tttactttga aaaaattaga
181 gtgctccagg caggcctatg ctccaataca ttagcatgga ataataaaat aggacgcgtg
241 gttctatttt gttggtttct aggaccgccg taatgattaa tagggacagt cgggggcatc
301 agtattcaat tgtcagaggt gaaattctta gatttattga agactaacta ctgcgaaagc
361 atttgccaag gatgttttca ttaatcagga acgaaagtta ggggatcgaa gacgatcaga
421 taccgtcgta gtcttaacca taaactatgc cgactaggga tcggacgatg ttatTTTTTg
481 acgcgttcgg caccttacga gaaatcaaag tgcttgggct ccagggggag tatggtcgca
541 aggctgaaac ttaaagaaat tgacggaagg gcaccaccag ggggtggagc tcggtgctta
601 tttgactcaa cacggggaaa ctcaccacgt ccagacacaa tgaggattga cagattgaga
661 gctctttctt ga

```

Şekil 4.20. BK.2011.2K (*B. bassiana*) örneğine ait 18S gen bölgesi sekans dizilenmesi

```

1   cttctagttg aaccttgggt ctggctggcc ggtccccttc accgcgagta ctgggtccgg
61  ctggaccttt ccttctgggg aacctcatgg ccttcccttg ctgtgggggg aaccaggact
121 tttactgtga aaaaattaga gtgttcaaag cacgcctttg ctcccctaca ttagcatgga
181 ataatagaat aggacgtgcg gttctatttt cctggtttct aggaccgcc taatgattaa
241 tagcgatagt cggcggcctc agtattcagc tggtcagaag tgaaattctt ggatttgctg
301 aagactaact actgcgaaag cattcgccca ggattttttc attaatacaa gaactaaagt
361 tagtggatcc aagacgatca gatacccgcg tagtcttaaa cataaacaat gccactag
421 gatcgggcgg tgttttatga tgaccgcccc cgcaccttac tagaaatt

```

Şekil 4.21. BK.2011.3E (*B. bassiana*) örneğine ait 18S gen bölgesi sekans dizilenmesi

```

1   ccgatgaacg cttattaaag ttgttgggt taaaagctcg tagttgaaac cttgggcctg
61  gctggccggg cgcctcacc gcgtgtactg gtccggcccg ggcctttccc tctgtggaac
121 ctcatgccct tcaactgggtg tggcggggaa acaggacttt tactttgaaa aaattagagt
181 gctccaggca ggcctatgct cgaatacatt agcatggaat aataaaatag gacgcgtggt
241 tctatTTTTg ttgtttctag gaccgccgta atgattaata gggacagtcg ggggcatcag
301 tattcaattg tcagaggtga aattcttaga tttattgaag actaactact gcgaaagcat
361 ttgccaagga tgttttcatt aatcaggaac gaaagttagg ggatcgaaag cgatcagata
421 ccgtcgtagt cttaaccata aactatgccg actagggatc ggacgatgtt attttttgac
481 gcgttcggca ccttacgaga aatcaaagtg cttgggctcc agggggagta tggtcgcaag
541 gctgaaactt aaagaaattg a

```

Şekil 4.22. Kapiçam.2010.C (*B. bassiana*) örneğine ait 18S gen bölgesi sekans dizilenmesi

```

1   tattaaagtt gttgtgggta aaaagctcgt agttgaacct tgggcctggc tggccgggtcc
61  gcctcaccgc gtgtactggg ccggccgggc ctttccctct gtggaacctc atgcccttca
121 ctgggtgtgg cggggaaaca ggactttttac tttgaaaaaa ttagagtgtc ccaggcaggc
181 ctatgctcga atacattagc atggaataat aaaataggac gcgtggttct attttgttgg
241 tttctaggac cgccgtaattg attaataggg acagtcgggg gcatcagtat tcaattgtca
301 gaggtgaaat tcttagattt attgaagact aactactgcg aaagcatttg ccaaggatgt
361 tttcattaat caggaacgaa agttagggga tcgaagacga tcagataccg tcgtagtctt
421 aaccataaac tatgccgact agggatcgga cgatgttatt ttttgacgcg tttcggcacc
481 ttacgagaaa tcaaagtgtc tgggctccag ggggagtatg gtccgcaagg ctgaaactta
541 aagaaattga cggaagggca ccaccagggg tgagcctgc ggcttatttt gactcaacac
601 ggggaaactc accaggtccc gacacaaatga ggattgacag attgagagct cttttctttg
661 attttgtggg g

```

Şekil 4.23. Kapiçam.2011.1A (*B. bassiana*) örneğine ait 18S gen bölgesi sekans dizilenmesi

Ayrıca Kılavuzlu.2010.B ve Kürtül.2010.C örnekleri ITS 1 ve ITS 4 primerleri ile ITS bölgesi çoğaltılmış ve elde edilen sekans sonuçları ile *B. bassiana* olduğu teyit edilmiştir. Bu iki izolata ait dizi sonuçları karşılaştırılmalı olarak Şekil 4.24’de verilmiştir.

Kılavuzlu.2010.B	1	ctacgctccctaacccttctgtgacctacatatcggttgcttcggcggaactcgccccagcccggaacgcgga
Kürtül.2010.C	1	tttcgctccctaacccttctgtgacctacatatcggttgcttcggcggaactcgccccagcccggaacgcgga
Kılavuzlu.2010.B	71	cgggaccagcgcccgccgggacctcaaaactcttgattccagcatcttctgaatacgccgcaaggcaa
Kürtül.2010.C	71	ctggaccagcgcccgccgggacctcaaaactcttgattccagcatcttctgaatacgccgcaaggcaa
Kılavuzlu.2010.B	141	aacaaatgaatcaaaactttcaacaacggatctcttggctctggcatcgatgaagaacgcagcgaaaccg
Kürtül.2010.C	141	aacaaatgaatcaaaactttcaacaacggatctcttggctctggcatcgatgaagaacgcagcgaaaccg
Kılavuzlu.2010.B	211	ataagtaatgtgaattgcaaatccatgaatcatcaatctttgaacgcacattgcgcccgccagcattctg
Kürtül.2010.C	211	ataagtaatgtgaattgcaaatccatgaatcatcaatctttgaacgcacattgcgcccgccagcattctg
Kılavuzlu.2010.B	281	gcgggcatgcctgttcagcgtcatttcaaccctcgacctccccttggggaggtcgcggttggggaccggc
Kürtül.2010.C	281	gcgggcatgcctgttcagcgtcatttcaaccctcgacctccccttggggaggtcgcggttggggaccggc
Kılavuzlu.2010.B	351	agcacaccgcccgcctgaaatggagtggcgcccgctccgcggcgacctctgcgcagtaattcgtctcgc
Kürtül.2010.C	351	agcacaccgcccgcctgaaatggagtggcgcccgctccgcggcgacctctgcgcagtaatacggctcgc
Kılavuzlu.2010.B	421	accggaaccgcgacgcggccacgcgcgtaaaaacaccaacttctgaacggttgacctcgaatcggttaggac
Kürtül.2010.C	421	accggaaccgcgacgcggccacgcgcgtaaaaacaccaacttctgaacggttgacctcgaatcaggtaggac
Kılavuzlu.2010.B	491	taccgctgaactt
Kürtül.2010.C	491	taccgctgaactt

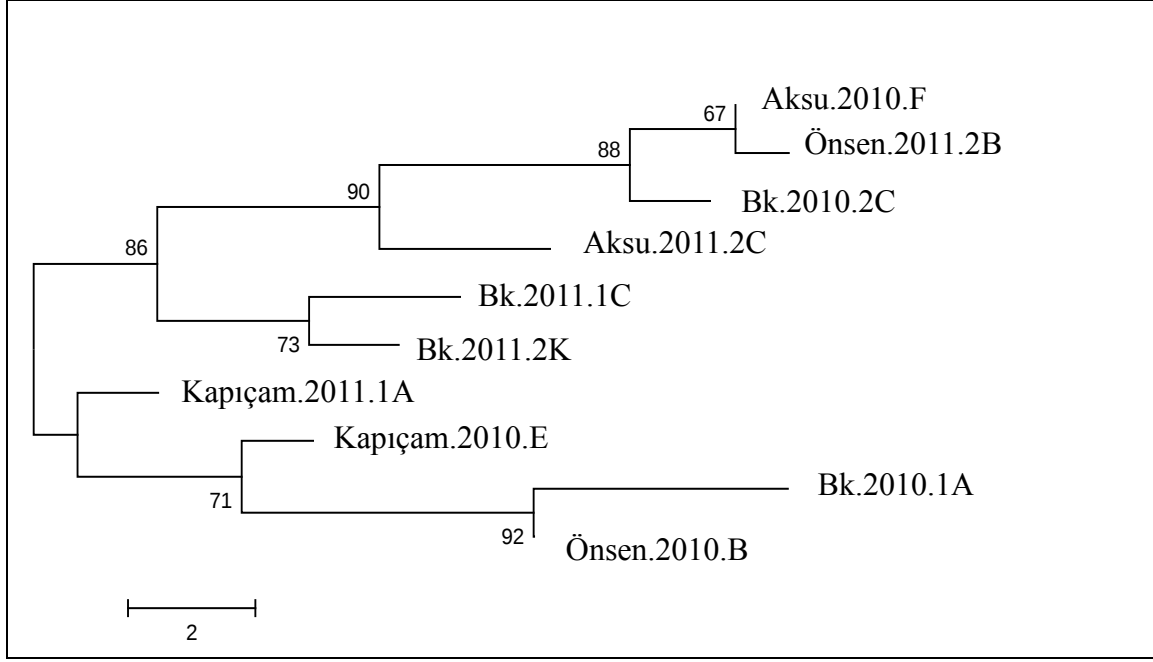
Şekil 4.24. *B. bassiana* türüne ait ITS gen bölgesi sekans hizalaması

Çalışmamızda *Penicillium* sp. türüne ait sadece bir adet izolasyon yapılmıştır. Bu izolat (Kılavuzlu.2011.2A) moleküler tanımlama için NS 3 ve NS 6 primerleri ile 18S gen bölgesi çoğaltılmış ve elde edilen nükleotid dizi sonuçları bu örneğin *Penicillium* sp. olduğunu moleküler olarak göstermiştir. Teyit edilmiş dizi sonuçları Şekil 4.25’de verilmiştir.

1	aatcgcaacc	caaaatttta	taaagtttgt	ttgctgtaaa	gctcgtagtt	gaaccttggg
61	cctggctggc	cggtccgcct	caccgcgagt	actgggtccg	ctgggccttt	ccttctgggg
121	acctcatggc	cttcaactgg	tgtgggggga	accaggactt	ttactgtgaa	aaaattagag
181	tgttcaaagc	aggcctttgc	tcgaatacat	tagcatggaa	taatagaata	ggacgtgcgg
241	ttctattttg	ttggttttcta	ggaccgccgt	aatgattaat	agggatagtc	gggggctca
301	gtattcagct	gtcagaggtg	aaattcttgg	atttgctgaa	gactaactac	tgcgaaagca
361	ttcgccaagg	atgtttttcat	taatcaggga	acgaaagtta	ggggatcgaa	gacgatcaga
421	taccgtccta	gtcttaacca	taaactatgc	ccgactaggg	atcggaagg	attctatgat
481	gaccgcgtcc	gcaccttacg	agaaatcaaa	gtttttgggt	tctgggggga	gtatggtccg
541	ccaggctgaa	acttaaagaa	attgacggaa	gggcaccaca	aggcctggag	cctgcctgct
601	taatttgact	cacacgggga	aactcccccg	ggtccagaca	aaataaggat	tgacagaatt
661	gagaagctcc	ttttctttga	acccttttgg	atgggtgggt	gccatggggc	cgttcttcgt
721	tggggggag					

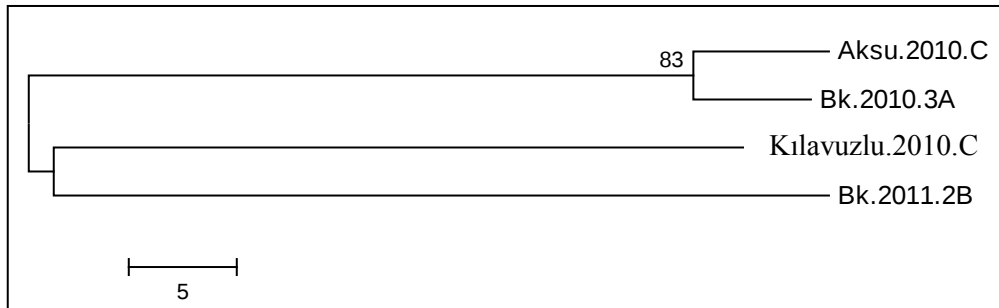
Şekil 4.25. Kılavuzlu.2011.2A (*Penicillium* sp.) örneği ne ait 18S gen bölgesi sekans dizilenmesi

Sekans çalışması sonucunda farklı bölgelerden izole edilen *B. bassiana*, *A. flavus* ve *Fusarium sp.*'nin SSU rDNA (18S) bölgelerinin yaklaşık 900 baz çifti uzunluğunda ki diziler kullanılarak aynı tür olarak tanımlanan izolatların birbirlerine genetik benzerlikleri Mega 4.1 programı kullanılarak NJ (Neighbour-joining) yöntemi ile çizilen filogenetik ağaçlar ile belirlenmiş ve filogenetik ağaçlar Şekil 4.26-28'de verilmiştir.



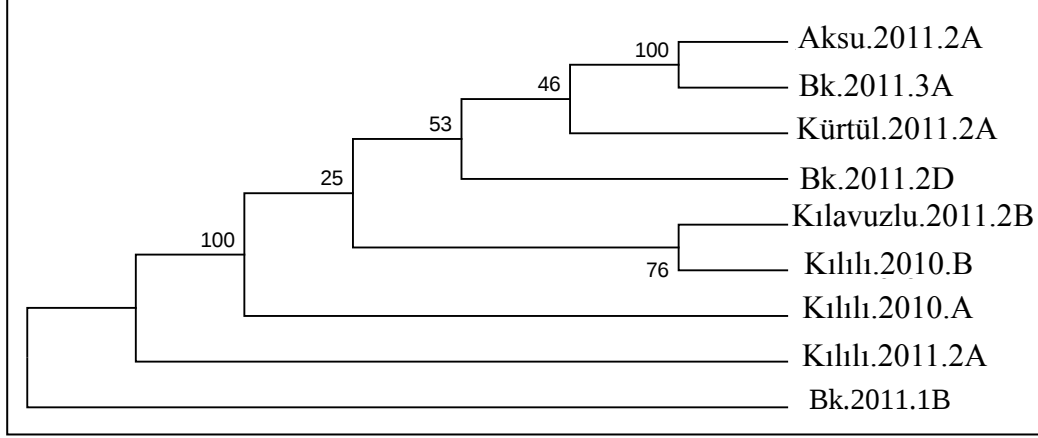
Şekil 4.26. *B. bassiana* türlerinin 18S gen bölgesi temel alınarak çizilen filogenetik ağaç

B. bassiana türlerinde 18S gen bölgesi temel alınarak elde edilen dendrogramda aynı bölgelerden elde edilmiş izolatların kendi aralarında bir grup oluşturmadığı gözlenmiştir. Analiz sonucunda Boot Strap (Seç dağıt testi) değeri Bk.2010.1A ve Önsen.2010B için oldukça yüksektir (%92). Aksu.2010F, Önsen 2011.2B, Bk.2010.2C, Aksu.2011.2C, Bk.2011.1C ve Bk.2011.2K grubu %86'lık Boot Strap değeri ile diğer gruptan ayrılmıştır.



Şekil 4.27. *A. flavus* türlerinin 18S gen bölgesi temel alınarak çizilen filogenetik ağaç

A. flavus türlerinde 18S gen bölgesi temel alınarak elde edilen dendrogramda aynı bölgelerden elde edilmiş izolatların kendi aralarında bir grup oluşturmadığı gözlenmiştir. Kılavuzlu.2010.C ile Bk.2011.2B ve Bk.2010.3A ile Aksu.2010.C ayrı iki grup oluşturmuştur. Analiz sonucunda Boot Strap (Seç dağıt testi) değeri Bk.2010.3A ve Aksu.2010.C için %83 değerle oldukça yüksektir.



Şekil 4.28. *F. oxysporum* ve *F. solani* türlerinin 18S gen bölgesi temel alınarak çizilen filogenetik ağaç

F. oxysporum ve *F. solani* türlerinde 18S gen bölgesi temel alınarak elde edilen dendrogramda aynı bölgelerden elde edilmiş izolatların kendi aralarında bir grup oluşturmamaktadır. Bk.2011.1B örneği dendrogramda diğer bireylerden farklı bir grupta tek başına yer almıştır.

Yapılan bu çalışmada elde edilen EPF tür sayısı diğer yapılan çalışmalara kıyasla sayıca azdır ve onların izole ettiği bazı fungus türlerinin bazıları izole edilememiştir. Şahin (2006), yaptığı çalışmada Kahramanmaraş ilinin değişik topraklarında *Paecilomyces* ve *Beauveria* cinsine ait EPF izole etmiştir. Er ve Mart (2009) yaptıkları çalışmada, Kahramanmaraş'ın değişik bölgelerinden alınan toprak örneklerinde *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Metarhizium* cinsine bağlı fungusları izole etmişlerdir. Sevim ve ark., (2009), fındık yetiştiriciliğinin çok olduğu arazilerde yapmış oldukları çalışmada, *M. anisopliae* var. *anisopliae* çok yaygın bulmuşlardır ve bu türün yanı sıra *B. bassiana*, *Evlachovaea* sp., *Metarhizium* sp. türlerinde varlığını belirlemişlerdir. *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *B. bassiana*, *Evlachovaea* sp. türlerini hem tarım alanlarında hem tarım alanları dışında izole etmişlerdir. Keller ve ark. (2003), *M. anisopliae*'yi ekilebilir tarlalarda ve çayırarda tespit etmişlerdir. Meyling ve Elinberg (2006) yaptıkları çalışmalarda *I. fumosorosea* 'yı çit topraklarında çok yaygın bulmuşlarken *B. bassiana*'yı tarımsal alanlarda çok yaygın olarak bulmuşlardır. Onlar yapmış oldukları çalışmada *M.*

anisopliae'yi çok nadir olarak bulmuşlardır. Çin'in ormanlık alanlarındaki topraklarda en fazla *P. fumosoroseus*, *B. bassiana* ve *M. anisoplae* entomopatojen fungus türleri izole edilmiştir (Bing-Da Sun ve ark., 2008). Irak'ın kuzey bölgesinde Gara dağlarında bitkilerin üzerinde yaşayan böceklerde *A. flavus*, *A. niger*, *B. bassiana* entomopatojen funguslar yüksek oranda bulunurken fırsatçı patojen olan, *Alternaria alternata* (Fr.), *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Humicola* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb:Fr.), *Ulocladium atrum* (Pers.), *Trichoderma* sp., izole edilmiştir (Assaf ve ark., 2011). Bu çalışmalara göre entomopatojenik fungus türlerinin oluşması ve dağılması bölgeler ve toprak örneklerinin farklılığından kaynaklanmaktadır.

Böcek patojenleri içerisinde önemli olan *B. bassiana* yapmış olduğumuz çalışmada çok bulunurken fırsatçı patojen olarak bilinen *A. flavus* ve ikincil koloni oluşturan *F. oxysporum*, *F. solani* ve *Penicillium* sp. türleri de bulunmuştur. Ali-Shtayeh ve ark. (2002), zorunlu zayıf patojen fungusların çoğu kez böcekleri hastalığa önceden hazırlamaya yardımcı olan etmen olarak ilişkilendirmişlerdir. Yapmış oldukları ön patojenite testinde *G. mellonella* larvalarının *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Mucor* tarafından enfekte edildiğini belirlemişlerdir. Gerçekte de toprakta ki konak böcekler birçok patojenik türe maruz kalırlar. Sun ve Liu (2008), toprak örneklerinde *Galleria* tuzak metodu kullanılarak yaptıkları çalışmada, zayıf ya da yaralanmış larvaların fırsatçı patojenler ile enfekte olabileceğini ve aynı zamanda *G. mellonella* larvaları öldükten sonra ölü böcek üzerinde ikincil çoğalan türlerin koloni oluşturabileceğini belirlemişlerdir. İzgi ve Koz (2012) tarafından yapılan çalışmada topraktan fungus izolasyonu aşamasında *G. mellonella* larvaları kullanılmıştır. Bu larvalar toprağa inoküle edilmeden önce pupaya dönüşmelerinde yardımcı olan ipek ağlarının örülmesini engellemek için 50 °C de 15 sn bekletilip sonra soğuk su banyosunda 15 sn bekletilmiştir ve sonrasında toprağa inoküle edilmiştir. Bu esnada larvalarda zayıflık, stres oluşmuş olabilir ve bu da toprakta var olan fırsatçı patojenlerin larvayı enfekte etmesine sebep olmuş olabilir.

Günümüzde karşılaştığımız olumsuz örnekler kimyasal ilaçlar kullanılarak yapılan tarımın sürdürülebilir olmadığını ve tarımda alternatif yöntemlerin uygulanması gerektiğini ortaya koymuştur. Bu da mikrobiyal kontrol ajanları ve çevreyle dost diğer alternatif zararlı mücadele yöntemlerinin kullanımına bağlı olacaktır. Dünyada mikrobiyal kontrol ajanları ile ilgili çalışmalar hızla ilerlerken Türkiye'de bu kontrol ajanlarının önemi yeni anlaşılmıştır. Kahramanmaraş bölgesinde entomopatojen fungusların tespitine yönelik çalışmalar yapılmış fakat geniş kapsamlı morfolojik ve moleküler karakterizasyon

yapılmamıştır. Çalışmamızda, Kahramanmaraş'ın merkez köylerinden ve Kahramanmaraş Başkonuş ormanlık alanlarından izole edilen EPF'lerin morfolojik ve moleküler karakterizasyonu yapılarak EPF çeşitliliği belirlenmiştir. Gelecekte yapılacak geniş çaptaki çalışmalar farklı entomopatojen fungusların varlığı ortaya çıkarabilir.

KAYNAKLAR

- Ali-Shtayeh, M.S., Mara, A.B.B.M., Jamous, R.M., 2002. Distribution, occurrence and characterization of entomopathogenic fungi in agricultural soil in the Palestinian area. *Mycopathologia* 156, 235–244s.
- Apaydın, O., Yenidünya, A.F., Harsa, S., Güneş, H., 2005. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats in Turkey,. *World journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 285-292s.
- Aquino de Muro, M., Elliott, S., Moore, D., Parker, B.L., Skinner, M., Reid, W., El Bouhssini, M., 2005. Molecular characterisation of *Beauveria bassiana* isolates obtained from overwintering sites of Sunn Pest (*Eurygaster* and *Aelia species*). *Mycological Research*, 109:294-306s.
- Asensio, L., Carbonell, T., Lo´pez-Jime´nez, J.A., Lo´pez-Llorca, L.V., 2003. Entomopathogenic fungi in soils from Alicante province. *Spanish Journal of Agricultural Research* 3: 37–45s
- Aslım, B., Sağlam, N., Beyatlı, Y., 2002. Determination of some properties of *Bacillus* isolated from Soil. *Turk J Biol* 26 41-48s.
- Assaf, L.H., Haleem, R.A., Abdullah, S.K., 2011. Association of Entomopathogenic and Other Opportunistic Fungi with Insect in Dormant Locations, *Jordan Journal of Biological Sciences*, 4(2): 87-92.
- Atkins, S.D., Clarck, I.M., 2004. Fungal molecular diagnostics: a mini review, *J. Appl. Genet.* 45(1), pp. 3-15, UK.
- Aung, O. M., Soyong, K., Hyde, K. D., 2008. Diversity of entomopathogenic fungi in rainforests of Chiang Mai Province, Thailand. *Fungal Diversity*, 30: 15-22s.
- Baverstock, J., Roy, H.E., Pell, J.K., 2010. Entomopathogenic fungi and insect behaviour: from unsuspecting hosts to targeted vectors, *BioControl*, 55:89-102, UK. *Biological Sciences*, 4(2): 87-92.

- Boucias, D. G., Tigano, M. S., Sosa-Gomez, D. R., Glare, T. R., Inglis, P. W., 2000. Genotypic properties of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. Biol Control; 19: 124–138s.
- Charudattan, R., Chandramohan, S., Wyss, G.S., 2002. “Biological Control”, Chapter 2, Pesticides in Agriculture and the Enviroment. Edited: Willis B. Wheeler, University of Florida Gainesville, Florida, U.S.A.
- Çınar, C., Apaydın, O., Yenidünya, A. F., Harsa, S., Güneş, H., 2008. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from olive-related habitats in Turkey, Journal of Applied Microbiology, 104: 515-525s.
- Deacon, J.V., 1983. Microbial control of pests and diseases Van nostrand. New York, p. 43.
- Demir, İ., Sezen, K., Demirbağ, Z., 2002. The firts study on bacterial flora and biological control agent of *Anoplus roboris* (Sufr., Coleoptera). J.Microbiol., 40 (2): 104-108s.
- Edel, V., 1998. Use of PCR and RFLP in Fungal Systematics, Institut National de la Recherche Agronomique, Dijon, France, 51-55s.
- Entz, S.C., Johnson, D.L., Kawchuk, L.M., 2005. Development of a PCR- based diagnostic assay fort he specific detection of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *Acridium*, Mycol. Res. 109 (11): 1302-1312s, Canada.
- Er, M. K., Tunaz, H., Işıkber, A. A., Satar, S., Mart, C., Uygun, N. 2008. Pathogenicity of Entomopathogenic Fungi to *Coccinella septempunctata* L. (Col: Coccinellidae) and A Survey of Fungal Diseases of Coccinellids. KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 11: 118-122s.
- Er, M.K., Mart, C. 2009. Kahramanmaraş İlinde Belirlenen Bazı Entomopatojen Funguslar ve İlin Entomopatojen Fungus Kullanımı Bakımından Değerlendirilmesi. KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi, 12 (2): 52-58s.
- Erlich, H. A. 1989. PCR Technology. Stockton Press. NY.
- Estrada, M.E., Camacho, M.V., Benito, C., 2007. The Molecular Diversty of Different Isolates of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. As Assessed Using Inter-

Microsatellites (ISSRs), Celular& Molecular Biology Letters, Volume, 12, pp, 240- 252s.

Goettel, M.S, Eilenberg, J., Glare, T., 2010. Entomopathogenic Fungi and their Role in Regulation of Insect Populations, 387- 419s.

Griffin, C. T., Chaerani, R., Fallon, D., Reid, A.P., Downes, M. J., 2000. Occurrence and distribution of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis indica* in Indonesia. Journal of Helminthology 74: 143–150s.

Hazır, S., Keskin, N., Stock, S. P., 2003a. Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Turkey. Biodiversity Conserv. 12: 375- 386s.

Hazır, S., Stock, S. P., Keskin, N., 2003b. A new entomopathogenic nematode, *Steinernema anatoliense*. n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), from Turkey. Syst. Parasitol. 55: 211-220s.

Humber, R. A., 1997. Fungi: identification. In: Lacey LA (ed) Manual of techniques in insect pathology. Academic Press, San Diego, Chapter V-1, pp 153–185s.

İzgi, Ü., 2012. Kahramanmaraş Başkonuş Ormanlık Alanlarından Alınan Toprak Örneklerinden İzole Edilen Entomopatojen Funguslar, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş, 41s.

Jackson, M.A., Jaronski, S.T., 2009. Production of microsclerotia of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects, Mycological Research II 3, 842-850s.

Kalkar, Ö., Carner, G.R., Scharf, D., Boucias, D.G., 2006. Characterization of an Indonesian isolate of *Paecilomyces reniformis*, Mycopathologia 161: 109-118.

Keller, S., Zimmerman, G., 1989. Mycopathogens of soil insects. In: Wilding, N., Collins, N.M., Hammond, P.M., Webber, J.F. (Eds.), Insect-Fungus Interactions. Academic Press, London, pp. 240–27s.

- Keller, S., Kessler, P., Schweizer, C., 2003. Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol* 48: 307–319s.
- Kılıç, E., Yıldırım, E., İskender, N. A., Algur, Ö. F., 2009. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Viilemin, 1826 (Deuteromycotina: Hypomycetes) Isolates to Various Development Stages of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae)] *Bio-science research Bulletin*, 25 (1): 17-28s.
- Kılıçoğlu, M.Ç., Özkoç, İ., 2008. Fungal Sistematikteki Moleküler Gelişmeler, OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 23(1):65-72 J. of Fac. of Agric., OMU, 23(1):65-72.
- Kıvan, M., 2007. Entomopatojen Fungus *Beauveria bassiana* ve *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes)'nin *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutelleridae) üzerinde patojenitesi. *Entomol gener* 30 (1), 063-069; Stuttgart.
- Kocatürk, S., Barış, M., Özmen, O., Tuncer, G., 1998. Orta Anadolu Bölgesi'nde kımıl (*Aelia rostrata* Boh.)'da saptanan entomopatojen funguslar ve etkinlikleri üzerine araştırmalar, Türkiye 3. Biyolojik Mücadele Kongresi, 25-28 Ocak 1994, İzmir.
- Koz, C., 2012. Kahramanmaraş Merkez Köylerindeki Buğday Tarlalarından İzole Edilen Entomopatojen Funguslar, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş, 42s.
- Lacey, L.A., 1997. *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press, San Diego.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K., Vail, P., 2001. Insect Patjogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future?, *Biological Control* 21, 230-248s.
- Leger, R.J. ST., Wang, C., 2009. Entomopathogenic Fungi and the Genomics Era, *Insect Pathogens: Molecular Approaches and Techniques* 1- 21s.
- Liao, C. Y., Tang, L. C., Pai, C. F., Hsiao, W. F., Briscoe, B. R., Hou, R. F. A., 2001. New isolate of the entomopathogenic nematode, *Steinernema abbasi* (Nematoda: Steinernematidae), from Taiwan. *Journal of Invertebrate Pathology* 77: 78–80s.

- Medo, J., Cagan, L., 2011. Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods, *Biological Control* 59: 200–208s.
- Meyling, N. V., Eilenberg, J., 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological Control*, 43, 145–155s.
- Meyling, N., Eilenberg, J., 2006. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agric. Ecosyst. Environ.* 113, 336–341s.
- Meyling, V.N., 2008. PCR-based characterization of entomopathogenic fungi for ecological studies. Deliverable 5.2 from VegQure. Denmark.
- Minitab, 1993. Release 15., Minitab Inc. 3081 Enterprise Drive State College, PA, USA.
- Moraga, E.Q., Navas-Cortes, J., 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, *Micological Research* III, 947-966s, Spain.
- Muştu, M., Demirci, F., Koçak, E., 2011. Mortality effects of *Isaria farinosa* (Holm.) and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Sordariomycetes: Hypocreales) on *Aelia rostrata* Boh. (Hemiptera: Pentatomidae), *Türk. Entomol. Derg.*, 2011, 35 (4): 559-568s.
- Nalcacioğlu, R., Yaman, M., Dulger, S., Belduz, A.O, Demirbağ, Z., 2002. Isolation and Chracterisation of *Bacillus thuringiensis* Isolated from the Hazelnut Fields in Turkey. *Frieus Environmental Bulletin*, 11 (7): 337-341s.
- Özer, N., Keskin, N., Kirbas, Z., 1995. Occurrence of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae: Heterorhabditidae) in Turkey. *Nematologica* 41: 639-640s.
- Pace, N.R., 2009. Mapping the Tree of Life: Progress and Prospects, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, American Society for Microbiology, 73 (4):565–576s.

- Samson, R. A., Evans, H. C., Latge, J. P., 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer- Verlag, New York.
- Sevim, A., 2010. Doğu Karadeniz bölgesinden entomopatojenik fungusların izolasyonu, karakterizasyonu ve virölanslarının belirlenmesi, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 168s.
- Sevim, A., Demir, I., Höfte, M., Humber, R. A., Demirbağ, Z., 2009. Isolation and characterization of entomopathogenic fungi from hazelnut-growing region of Turkey. BioControl, 55(2):279-297s.
- Sevim, A., Höfte, M., Demirbağ, Z., 2010. Genetic variability of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* isolates obtained from the Eastern Black Sea Region of Turkey, Turk J Biol, 36:255-265s.
- Sezen, K., Demir, İ., Demirbağ, Z., 2007b. Identification and pathogenicity of entomopathogenic bacteria from common cockcfer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae). New Zeal J Crop Hort, 35:79–85s.
- Sezen, K., Demirbağ, Z., 2007a. Mayıs Böceği (*Melolontha melolontha*) (Coleoptera: Scarabaeidae)'nin Biyolojik Kontrol Ajanının Araştırılması. Ekoloji. 16: 34-40s.
- Sezen, K., Demirbağ, Z., 2006. A new isolate of *Melolontha melolontha* entomopoxvirus in Turkey: morphology, infectivity and prevalence in the field. Appl Entomol Zool 41:471–477s.
- Shah, P. A., Pell, J. K., 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. Appl. Microbiol. Biotechnol, 61: 413-423s.
- Shtayeh, M.S.A., Mara'i, A.B.B.M, Jamous, R.M, 2003. Distribution, occurence and characterization of entomopathogenic fungi in agricultural soil in the Palestinian area, mycopathologia 154: 235-244s.
- Soylu, E. N., Gönülol, A., 2012. Morphological and 18S rRNA analysis of coccoid green algae isolated from lakes of Kızılırmak Delta, Turk J Biol, 36: 247-254s.

- Stock, S. P., Pryor, B. M., Kaya, H. K., 1999. Distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in natural habitats in California, USA. *Biodiversity Conserv.* 8, 535-549s.
- Sun, B. D., Han-Ying, Y., Chen, A. J., Liu, X. Z., 2007. Insect-associated fungi in soils of field crops and orchards. *Crop Protection*, 27 1421–1426s.
- Sun, B. D., Liu, X. Z., 2008. Occurrence and diversity of insect-associated fungi in natural soils in China. *Applied Soil Ecology*, 39: 100–108s.
- Sun, B. D., Yu, H.Y., Chen, A.J., Liu, X.Z., 2008. Insect-associated fungi in soils of field crops and orchards. *Crop Prot.*, 27:1421-1426s.
- Susurluk, A., Dix, I., Stackebrandt, E., 2001. Identification and ecological characterisation of three entomopathogenic nematodebacterium complexes from Turkey. *Nematology*. 3: 833-841s.
- Şahin, H., 2006. Çam kesetirtılı (*Thaumetopoea pityocampa* (Den&Schiff)) (Lepidoptra Thaumetopoeidae)’na karşı entomopatojen fungus izolatlarının etkinliklerinin araştırılması, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 23s.
- Talwar, B.H., 2005. Isolation and Characterisation of Entomopathogenic Fungi and their Effectiveness, Doctor of Philosophy, Dharward University of Agricultural Sciences, Department of Agricultural Microbiology, College of Agriculture, Dharward-580 005.
- Tanada, Y., Kaya, H. K., 1993. *Insect pathology*. Academic Press, Inc., USA, 633s.
- Thungrabeab, M., Tongma, S., 2007. Effect of Entomopathogenic Fungi, *Beauveria bassiana* (Balsam) and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) on Nontarget Insects, KMITL Sci. Tech. J. Vol. 7. S1 Nov.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor. J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press, San Diego, 315-322s.

- Yaman, M., Nalçacıoğlu, R., Demirbağ, Z., 2001. Viral Control of The European Pine Sawfly, *Neodiprion sertifer* (Geoffroy) in Turkey, Tr. J. Biology, 25: 419-425s.
- Zimmermann, G., 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*, Biocontrol Science and Technology, 17(5/6): 553-596s.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı soyadı : Fatma Gül ÖZÇELİK
Uyruğu : T.C
Doğum tarihi : 1.06.1988 Kahramanmaraş
Medeni hali : Bekâr
Telefon :
e-posta : gulozcelik@ksu.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	KSÜ/ BİYOLOJİ BÖLÜMÜ	2012
Lisans	OGÜ/ BİYOLOJİ BÖLÜMÜ	2010
Lise	FATİH LİSESİ	2005

İş Denevimi

Yıl	Yer	Görev
-----	-----	-------

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1.

2

Hobiler

Doğa bilimleri, Yüzme, Satranç