

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

*Pinus brutia* Ten.'DA, *Tomicus destruens* Woll.'İN  
(COLEOPTERA: SCOLYTINAE) VARLIĞI VE FUNGAL  
TOPLULUKLARI İLE İLİŞKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GULNAR ASHYROVA

DENİZLİ, AĞUSTOS 2024

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



*Pinus brutia* Ten.'DA, *Tomicus destruens* Woll.'İN  
(COLEOPTERA: SCOLYTINAE) VARLIĞI VE FUNGAL  
TOPLULUKLARI İLE İLİŞKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GULNAR ASHYROVA

DENİZLİ, AĞUSTOS 2024

**Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinatörlüğü tarafından 2022FEBE056 no'lu proje ile desteklenmiştir.**

**Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.**

**GULNAR ASHYROVA**



# ÖZET

**"*Pinus brutia* Ten.'DA, *Tomicus destruens* Woll.'İN (COLEOPTERA: SCOLYTINAE) VARLIĞI VE FUNGAL TOPLULUKLARI İLE İLİŞKİSİ"**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**GULNAR ASHYROVA**

**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ GÜRÇAY KIVANÇ AKYILDIZ)**

**(EŞ DANIŞMAN: DR. ÖĞR. ÜYESİ REFİKA CEYDA BERAM)**

**DENİZLİ, AĞUSTOS 2024**

Çalışma kapsamında, Denizli Orman İşletme Müdürlüğü, Çivril Orman İşletme Şefliği, 216 no'lu Kızılcım Tohum Bahçesi'nde böcek-fungus-ağaç ilişkisi çalışılmıştır. İzleme çalışmaları, *Tomicus destruens*'in yaşam döngüsü dikkate alınarak Eylül 2022 - Haziran 2023 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Yapılan izolasyonlar sonucunda 84 fungal izolat elde edilmiştir. Ezme ve yürütme olmak üzere iki farklı izolat elde etme yöntemi arasında  $p = 0,037$  seviyesinde anlamlı fark tespit edilmiştir. Her taksondan temsili izolatlar, DNA izolasyonuna ve ardından ITS (Internal Transcribed Spacer) gen bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonuna tabi tutulmuştur. Bu izolatlardan hepsi Ascomycota şubesinden olmak üzere, 11 familyaya ait (Apiosporaceae, Aspergillaceae, Cladosporiaceae, Cordycipitaceae, Didymellaceae, Dothioraceae, Nectriaceae, Pleosporaceae, Saccotheciaceae, Sarocladiaceae, Stachybotryaceae) 14 farklı fungus taksonu tespit edilmiştir. Bu fungusların 9'u (*Cladosporium* sp., *Aureobasidium* sp., *Penicillium* sp., *Lecanicillium* sp., *Fusarium* sp., *Sarocladium* sp., *Albifimbria* sp., *Alternaria* sp., *Arthrinium* sp.) cins seviyesinde, 5 tanesi (*Sydowia polyspora*, *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus niger*, *Epicoccum layuense*, *Alternaria alternata*) tür seviyesinde teşhis edilmiştir. Bunlar içerisinde *Lecanicillium* sp., *T. destruens* için ilk kez rapor edilen entomopatojendir. En yaygın taksonlar sırasıyla; *Penicillium* sp. (%18,60), *Sarocladium* sp. (%13,95) ve *Sydowia polyspora* (%11,63) olarak belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada fungus türlerinin seyreltme derecelerine göre varlık/yokluk durumları incelenmiş ve tür zenginliği Shannon-Weiner çeşitlilik indeksi kullanılarak belirlenmiştir. Çalışma, orman ekosistemlerinin korunması ve biyolojik çeşitliliğin sürdürülebilir yönetimi için temel veriler sağlamaktadır.

**ANAHTAR KELİMELER:** Akdeniz orman bahçivanı, fungus, kabuk böceği, kızılçam, patojen.

# ABSTRACT

**"PRESENCE OF *Tomicus destruens* Woll.(Coleoptera: Scolytinae) AND ITS RELATIONSHIP WITH FUNGAL COMMUNITIES IN *Pinus brutia* Ten."**

**MSc THESIS**

**GULNAR ASHYROVA**

**PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE BIOLOGY**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. GÜRÇAY KIVANÇ AKYILDIZ)**

**(COVISOR: ASSIST. PROF. DR. ÜYESİ REFİKA CEYDA BERAM)**

**DENİZLİ, AUGUST2024**

In this study, the insect-fungus-tree relationship was investigated in the 216<sup>th</sup> *Pinus brutia* Seed Orchard, Denizli Forestry Directorate, Çivril Forest Management Chief. The monitoring studies were carried out between September 2022 and June 2023, taking into account the life cycle of *Tomicus destruens*. As a result of the isolations, 84 fungal isolates were obtained. A significant difference was found between the two different isolation methods, grinding and walk-over, at the level of  $p = 0.037$ . Representative isolates from each taxon were subjected to DNA isolation and then to Polymerase Chain Reaction of the ITS (Internal Transcribed Spacer) gene region. Fourteen different fungal taxa belonging to 11 families (Apiosporaceae, Aspergillaceae, Cladosporiaceae, Cordycipitaceae, Didymellaceae, Dothioraceae, Nectriaceae, Pleosporaceae, Saccotheciaceae, Sarocladiaceae, Stachybotryaceae), all from the Ascomycota phylum, were identified. Nine of these fungi (*Cladosporium* sp., *Aureobasidium* sp., *Penicillium* sp., *Lecanicillium* sp., *Fusarium* sp., *Sarocladium* sp., *Albifimbria* sp., *Alternaria* sp., *Arthrinium* sp.) were identified at the genus level, and five (*Sydowia polyspora*, *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus niger*, *Epicoccum layuense*, *Alternaria alternata*) at the species level. Among these, *Lecanicillium* sp. is the first reported entomopathogen for *T. destruens*. The most common taxa were determined as *Penicillium* sp. (18.60%), *Sarocladium* sp. (13.95%), and *Sydowia polyspora* (11.63%). Additionally, the presence/absence of fungal species was examined according to their dilution levels, and species richness was determined using the Shannon-Weiner diversity index. The study provides fundamental data for the conservation of forest ecosystems and the sustainable management of biological diversity.

**KEYWORDS:** Bark beetle, fungi, pathogen, pine shoot beetle, red pine.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

<b>1</b>		
<b>1</b>	<b>GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Pinus brutia</i> Ten. (Kızılcıam) Hakkında Genel Bilgi .....	3
1.2	Böcek-Fungus Birliktelikleri.....	5
1.3	Akdeniz Orman Bahçivanı, <i>Tomicus destruens</i> (Woll., 1865).....	7
1.4	Daha Önce Yapılmış Olan Benzer Çalışmalar .....	10
1.5	Çalışmanın Amacı .....	16
<b>2</b>	<b>MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>18</b>
2.1	Çalışma Alanı ve Örnekleme .....	18
2.1.1	Çalışma Alanına Ait İklimsel Özellikler .....	22
2.2	<i>Tomicus destruens</i> 'in Morfolojik Teşhisi .....	25
2.3	<i>Tomicus destruens</i> 'in Moleküler Teşhisi .....	26
2.3.1	<i>Tomicus destruens</i> Örneklerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) 27	
2.4	<i>Tomicus destruens</i> Örneklerinden Yürütme Yöntemi ile Fungusların İzolasyonu .....	28
2.4.1	<i>Tomicus destruens</i> Örneklerinden Ezme Yöntemi ile Fungusların İzolasyonu .....	30
2.5	Fungal İzolatların Morfolojik Olarak Gruplandırılması .....	32
2.6	Fungusların Moleküler Karakterizasyonu.....	32
2.6.1	Fungusların DNA izolasyonu .....	32
2.6.2	Fungusların Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	34
2.6.3	Agaroz Jel Elektroforezi İşlemi .....	35
2.7	DNA Dizileme Çalışmaları ve Tür Tayini.....	36
2.8	Moleküler Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	36
2.9	Shannon-Weiner Çeşitlilik İndeksi ve Frekansların Belirlenmesi .....	38
2.10	İzolatların Seyreltme Oranları.....	39
2.11	Ezme-Yürütme Etkisi.....	39
<b>3</b>	<b>BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>40</b>
3.1	<i>Tomicus destruens</i> 'in Yayılış Durumu .....	40
3.2	<i>Tomicus destruens</i> 'in Morfolojik ve Moleküler Teşhisi.....	44
3.3	Fungal İzolatların Morfolojik ve Moleküler Teşhisi .....	46
3.4	Çeşitlilik İndeksi ve Frekanslar.....	54
3.5	Seyreltme Oranları .....	55
3.6	Ezme-Yürütme Etkisinin Karşılaştırılması .....	56
3.7	Fungal izolatlara ait koloni görüntüleri.....	58
3.7.1	<i>Aureobasidium</i> sp. (Tip1).....	58
3.7.2	<i>Sydowia polyspora</i> (Tip2) .....	58
3.7.3	<i>Aspergillus niger</i> (Tip 3) .....	59
3.7.4	<i>Arthrinium</i> sp. (Tip4) .....	59
3.7.5	<i>Epicoccum layuense</i> (Tip5).....	60
3.7.6	<i>Alternaria alternate</i> (Tip6).....	60
3.7.7	<i>Cladosporium</i> sp. (Tip 7) .....	61
3.7.8	<i>Alternaria</i> sp. (Tip8) .....	61

3.7.9	<i>Penicillium</i> sp.(Tip9).....	62
3.7.10	<i>Albifimbria</i> sp. (Tip10).....	62
3.7.11	<i>Sarocladium</i> sp.(Tip11).....	63
3.7.12	<i>Fusarium</i> sp. (Tip12).....	63
3.7.13	<i>Aureobasidium pullulans</i> (Tip13) .....	64
3.7.14	<i>Lecanicillium</i> sp. (Tip14).....	64
<b>4</b>	<b>ÖNERİLER .....</b>	<b>65</b>
<b>5</b>	<b>KAYNAKÇA.....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>77</b>
	<b>GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Pinus brutia</i> Ten. (Kızılcıam) Hakkında Genel Bilgi .....	3
1.2	Böcek-Fungus Birliktelikleri.....	5
1.3	Akdeniz Orman Bahçivani, <i>Tomicus destruens</i> (Wollaston, 1865).....	7
1.4	Daha Önce Yapılmış Olan Benzer Çalışmalar .....	10
1.5	Çalışmanın Amacı .....	16
<b>2</b>	<b>MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>18</b>
2.1	Çalışma Alanı ve Örnekleme .....	18
2.1.1	Çalışma Alanına Ait İklimsel Özellikler .....	22
2.2	<i>Tomicus destruens</i> 'in Morfolojik Teşhisi .....	25
2.3	<i>Tomicus destruens</i> 'in Moleküler Teşhisi.....	26
2.3.1	<i>Tomicus destruens</i> Örneklerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR). .....	27
2.4	<i>Tomicus destruens</i> Örneklerinden Yürütme Yöntemi ile Fungusların İzolasyonu .....	28
2.4.1	<i>Tomicus destruens</i> Örneklerinden Ezme Yöntemi ile Fungusların İzolasyonu .....	30
2.5	Fungal İzolatların Morfolojik Olarak Gruplandırılması .....	32
2.6	Fungusların Moleküler Karakterizasyonu.....	32
2.6.1	Fungusların DNA izolasyonu .....	32
2.6.2	Fungusların Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	34
2.6.3	Agaroz Jel Elektroforezi İşlemi .....	35
2.7	DNA Dizileme Çalışmaları ve Tür Tayini.....	36
2.8	Moleküler Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	36
2.9	Shannon-Weiner Çeşitlilik İndeksi ve Frekansların Belirlenmesi .....	38
2.10	İzolatların Seyreltme Oranları.....	39
2.11	Ezme-Yürütme Etkisi.....	39
<b>3</b>	<b>BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>40</b>
3.1	<i>Tomicus destruens</i> 'in Yayılış Durumu .....	40
3.2	<i>Tomicus destruens</i> 'in Morfolojik ve Moleküler Teşhisi.....	44
3.3	Fungal İzolatların Morfolojik ve Moleküler Teşhisi .....	46
3.4	Çeşitlilik İndeksi ve Frekanslar.....	54
3.5	Seyreltme Oranları .....	55
3.6	Ezme-Yürütme Etkisinin Karşılaştırılması .....	56
3.7	Fungal izolatlara ait koloni görüntüleri.....	58
3.7.1	<i>Aureobasidium</i> sp. (Tip 1).....	58
3.7.2	<i>Sydowia polyspora</i> (Tip 2).....	58

3.7.3	<i>Aspergillus niger</i> (Tip 3) .....	59
3.7.4	<i>Arthrimum</i> sp. (Tip 4) .....	59
3.7.5	<i>Epicoccum layuense</i> (Tip 5) .....	60
3.7.6	<i>Alternaria alternata</i> (Tip 6) .....	60
3.7.7	<i>Cladosporium</i> sp. (Tip 7) .....	61
3.7.8	<i>Alternaria</i> sp. (Tip 8) .....	61
3.7.9	<i>Penicillium</i> sp. (Tip 9).....	62
3.7.10	<i>Albifimbria</i> sp. (Tip 10).....	62
3.7.11	<i>Sarocladium</i> sp. (Tip 11).....	63
3.7.12	<i>Fusarium</i> sp. (Tip 12).....	63
3.7.13	<i>Aureobasidium pullulans</i> (Tip 13) .....	64
3.7.14	<i>Lecanicillium</i> sp. (Tip 14) .....	64
<b>4</b>	<b>ÖNERİLER .....</b>	<b>65</b>
<b>5</b>	<b>KAYNAKÇA.....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>77</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. 1: <i>Pinus brutia</i> Ten. (Kızılcım) ormanı.....	4
Şekil 1. 2: Türkiye ve çevresinde Kızılcım yayılış alanları.....	5
Şekil 1. 3: <i>Tomicus destruens</i> yumurta, larva, pupa ve ergin karakterlerin görünüşleri.....	9
Şekil 2. 1: a-b) Denizli Orman İşletme Müdürlüğü'ne bağılı Çivril Orman İşletme Şefliğı sınırlarında bulunan 216 no'lu Kızılcım Tohum Bahçesi .....	19
Şekil 2. 2: Denizli Orman İşletme Müdürlüğü'ne bağılı Çivril Orman İşletme Şefliğı sınırlarında bulunan 216 no'lu Kızılcım Tohum Bahçesi yer buldu haritası. ....	20
Şekil 2. 3: a) Saha çalışması aşaması, b) İstilalı sürgünlerden <i>T. destruens</i> 'lerin tespiti, c) Morfolojik teşhis için ayrılan <i>T. destruens</i> örnekleri, d) Moleküler çalışmalar için ayrılan <i>T. destruens</i> örnekleri, e) <i>T. destruens</i> moleküler teşhisi, f-g) <i>T. destruens</i> örneklerinin petri üzerinde yürütülmesi, fungusların besi ortamında yetiştirilmesi, COI gen bölgesi çoğaltılarak, ITS1 ve ITS4 primerleri ile PZR işlemleri, h-1) Jel elektroforezi, görüntüleme. ....	21
Şekil 2. 4: a) Çalışma bölgesine ait aylık ortalama sıcaklık verileri, b) Çalışma bölgesine ait aylık ortalama yağış verileri.....	23
Şekil 2. 5: Çalışma bölgesine ait aylık ortalama rüzgar hızı verileri ve hakim rüzgar yönü.....	24
Şekil 2. 6: <i>Tomicus destruens</i> vücut ölçüleri.....	25
Şekil 2. 7: <i>Tomicus destruens</i> örneklerinin moleküler karakterizasyonu.....	27
Şekil 2. 8: <i>Tomicus destruens</i> örneklerinin PDA (Patates Dekstroz Agar) içeren petri kaplarında yürütülmesi süreci. ....	29
Şekil 2. 9: <i>Tomicus destruens</i> örneklerinin yürütüldüğü petri kaplarının 10-14 gün boyunca 25-30°C'de karanlık ortamda inkübasyonu yapılmıştır.....	29
Şekil 2. 10: Gelişen fungal kolonilerin selofan üzerinden kazınması süreci. ....	30
Şekil 2. 11: <i>Tomicus destruens</i> örneklerini ezme yönteminde örneklerin seyreltilmesi. ....	31
Şekil 2. 12: <i>T. destruens</i> örneklerinin tespit edildiğı klonlar.....	38
Şekil 3. 1: <i>Tomicus destruens</i> tarafından istila edilen ağaçların 2022 ve 2023 yıllarına göre oranı. ....	43
Şekil 3. 2: <i>Tomicus destruens</i> ergininin dorsal ve lateral yönlerden görüntüsü. ...	44
Şekil 3. 3: LCO1490F ve HCO2198R primer çifti ile gerçekleştirilen PZR amplifikasyon ürünleri. ....	45
Şekil 3. 4: <i>Tomicus destruens</i> örneklerinden izole edilen fungus kolonileri.....	47
Şekil 3. 5: ITS1-ITS4 primer çifti ile gerçekleştirilen PZR amplifikasyon ürünleri. ....	48
Şekil 3. 6: Tespit edilen fungus taksonlarına ait frekans dağılımı. ....	55
Şekil 3. 7: Fungus türlerinin seyreltme derecelerine göre varlık/yokluk durumu. 56	
Şekil 3. 8: Fungus türlerinin bolluk ve dağılımları. ....	57
Şekil 3. 9: <i>Aureobasidium</i> sp.....	58
Şekil 3. 10: <i>Sydowia polyspora</i> . ....	58
Şekil 3. 11: <i>Aspergillus niger</i> . ....	59
Şekil 3. 12: <i>Arthrimum</i> sp. ....	59
Şekil 3. 13: <i>Epicoccum layuense</i> .....	60
Şekil 3. 14: <i>Alternaria alternata</i> . ....	60

Şekil 3. 15: <i>Cladosporium</i> sp.....	61
Şekil 3. 16: <i>Alternaria</i> sp. ....	61
Şekil 3. 17: <i>Penicillium</i> sp. ....	62
Şekil 3. 18: <i>Albifimbria</i> sp. ....	62
Şekil 3. 19: <i>Sarocladium</i> sp.....	63
Şekil 3. 20: <i>Fusarium</i> sp. ....	63
Şekil 3. 21: <i>Aureobasidium pullulans</i> . ....	64
Şekil 3. 22: <i>Lecanicillium</i> sp.....	64



## TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. 1: <i>Tomicus destruens</i> 'in bilimsel sınıflandırması.....	8
Tablo 2. 1: COI gen bölgesi için kullanılan primer dizileri. ....	28
Tablo 2. 2: ITS gen bölgesi için kullanılan primer dizileri .....	34
Tablo 2. 3: Polimeraz Zincir Reaksiyonlarında kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları. ....	34
Tablo 2. 4: Polimeraz Zincir Reaksiyonlarına ait sıcaklık ve döngü koşulları. ....	35
Tablo 3. 1: 216 no'lu Kızılçam Tohum Bahçesi'nde yayılış gösteren <i>Tomicus destruens</i> türünün iki yıllık (Ocak 2022-Aralık 2023) çalışma sürecindeki biyolojik döngüsü. ....	43
Tablo 3. 2: <i>Tomicus destruens</i> örneklerinin morfolojik ve moleküler karakterizasyon sonuçları.....	46
Tablo 3. 3: <i>Tomicus destruens</i> erginlerinden elde edilen fungal izolatların morfolojik ve moleküler karakterizasyon sonuçları.....	49
Tablo 3. 4: Konakçılara göre tespit edilen türler ve indeks değerleri.. ....	54

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

<b>%:</b>	Yüzde
<b>°C:</b>	Santigrat Derece
<b>bp:</b>	Baz çifti
<b>dk:</b>	dakika
<b>DNA:</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>ELISA:</b>	Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Deneyi
<b>ITS:</b>	İç Transkripte Edilmiş Aralık
<b>ITS:</b>	Internal Transcribed Spacer
<b>kb:</b>	Kilobaz
<b>LSU:</b>	Büyük Alt Birim ribozomal RNA
<b>mL:</b>	Mililitre
<b>NCBI:</b>	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
<b>ng/µL:</b>	Nanogram/mikrolitre
<b>PI:</b>	Phoresy (taşıyıcılık) indeksi
<b>PZR:</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>qPCR:</b>	Kantitatif PCR
<b>RFLP:</b>	Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi
<b>RNA:</b>	Ribonükleik Asit
<b>RPB1:</b>	RNA Polimeraz II'nin en büyük alt birimi
<b>RPB2:</b>	RNA Polimeraz II'nin ikinci büyük alt birimi
<b>rpm:</b>	Dakikada tur sayısı
<b>RT-PZR:</b>	Ters Transkripsiyon PCR
<b>SNP:</b>	Tek Nükleotid Polimorfizmi
<b>SSU:</b>	Küçük Alt Birim ribozomal RNA
<b>TEF:</b>	Translasyon Uzatma Faktörü 1-alfa
<b>µL:</b>	Mikrolitre

## ÖNSÖZ

Bu tezin hazırlanması sürecinde bana destek olan, rehberlik eden ve teşvik eden birçok kişinin katkıları olmuştur. Bu nedenle, onlara içtenlikle teşekkür etmek istiyorum. Öncelikle, tez danışmanım Dr. Öğr. Ü. Gürçay Kıvanç AKYILDIZ'a ve eş danışmanım Dr. Öğr. Ü. Refika Ceyda BERAM'a, bana sağladıkları bilgi, deneyim ve sürekli destekleri için minnettarım. Kendileri, bu çalışmanın her aşamasında bana yol gösterici oldu ve tezimin tamamlanmasına büyük katkı sağladılar. Ayrıca, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne tez çalışmamı sağlamış olduğu proje desteği için teşekkürlerimi sunarım. Denizli Orman İşletme Müdürlüğü, Çivril Orman İşletme Şefliği, 216 no'lu Kızılçam Tohum Bahçesi'nde çalışmalarımı sürdürmemde yardımcı olan işletme şefliği çalışanlarına ve bu süreçte desteklerini esirgemeyen O.Z.M. Şube Müdürü Sayın İbrahim KARAŞAHİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte bana laboratuvar imkanları sunan ve araştırmamın gerçekleştirilmesine yardımcı olan Pamukkale Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Fungal Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışanlarına ve Hidrobiyoloji Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Ailem ve arkadaşlarım da bu süreçte bana büyük bir moral ve motivasyon kaynağı oldular. Özellikle, sürekli yanımda olan ve desteğini esirgemeyen aileme minnettarım. Onların sabrı, sevgisi ve inancı, bu tezin ortaya çıkmasında büyük bir rol oynadı.

Son olarak, bu çalışmayı gerçekleştirmemde emeği geçen, adını burada saymadığım herkese teşekkürlerimi sunarım. Onların katkıları ve destekleri olmadan bu çalışma tamamlanamazdı.

Teşekkürlerimle,

# 1 GİRİŞ

Ormanlar, ekolojik dengenin korunmasında önemli bir rol oynarlar ve ormanların sağlığı karasal ekosistemlerin sürdürülebilirliğinin ayrılmaz bir parçasıdır. İlk çağlardan itibaren insanların barınak, çit el aletleri (sanat ve savaş aletleri) yapımı, ahşap oyuncaklar, mobilya, gemi yapımı, yakıt ve kırtasiye gibi tarih boyunca kullandıkları en önemli doğal kaynaklardan bir tanesi ormanlar olmuştur (Keten ve Gürsoy 2020). Son buzul çağı bitimiyle (~10.000 yıl önce), yeryüzündeki kara alanının %57'sine ormanlık alanlar hakim olduğu bilinmektedir (Ritchie 2021). Bu oran 700'lü yıllarda %52, 1800'lü yıllarda %50, 1900'de %48, ve 1950'de %44 olarak belirtilmiş ve son 120 yılda yüzde 10'luk bir orman azalması kaydedilmiştir (Ritchie ve Roser 2021). Küresel ölçekte orman kaynaklarını düzenli olarak izleyen ve raporlayan Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)'ne göre Ocak 2022'deki son güncel bilgiler itibarıyla dünya kara alanının yaklaşık %31'i ormanlarla kaplıdır. Buna göre son 30 yılda 420 milyon hektar ormanlık alanının kaybedildiği ve logaritmik bir düşüş olduğu anlaşılmaktadır.

Orman ekosistemlerinin karmaşık dokusu içinde, çeşitli organizmalar arasındaki etkileşimler ekosistem dinamiklerini önemli ölçüde etkilemektedir. Ekosistemler, biyotik ve abiyotik işlevsel bileşenleri içerir ve enerji ile madde akışlarıyla birbirlerine bağlıdır. Farklı türlerden organizmaların ekosistemde enerji, madde ve bilgi akışlarıyla birbirleri arasında bağlantı oluşturan organizmalar "holobiont" olarak adlandırılmaktadır (Sanchez-Garcia ve diğ. 2017). Dolayısıyla, orman ekosistemleri farklı holobiontlar arasındaki etkileşimler ağı olarak görülebilir. Ayrıca orman ekosistemleri, heterojenlik, hiyerarşi, öz-örgütlenme, uyum, doğrusal veya doğrusal olmayan pek çok karmaşık sistem özelliklerine ev sahipliği yapmaktadır (Filotas ve diğ. 2014). Örneğin, saproksilik organizmalar (funguslar, böcekler ve diğerleri), ormanlardaki ölü odunların geri dönüşümü için önemli bir rol oynamaktadır, bu da ekosistem ağlarında madde ve enerjinin akışını kolaylaştırmaktadır (Yang ve Gratton 2014).

Kabuk böcekleri (Curculionidae, Scolytinae), orman ekosistemlerinin önemli bileşenleridir ve bu nedenle onların dahil olduğu semiyotik (göstergebilim) ağı çözümlenmek önemlidir. Kabuk böcekleri, çoğunlukla ağaçlar olmak üzere bitkilerin yaşayan ve ölü dokularında yaşayan binlerce türü içerir. İşlevsel olarak, bu böcek türleri, hedef ağacın saldırıya uğradığı türün uygunluğuna bağlı olarak birincil veya ikincil türler olarak sınıflandırılabilir: birincil türler, canlı dokuları işgal etmeye uzmanlaşmıştır, ikincil türler ise ölü veya yüksek derecede yaralanmış ağaçları kolonileştirmeyi tercih eder (Vega ve Hofstetter 2014). Bu süreçte ağaçta kolonileşen böcekler ile ağaçta yaşayan funguslar arasındaki ilişki ökaryotlar arasındaki en başarılı simbiyozlardan sayılabilir (Hulcr ve Dunn 2011). Bu ilişki, çeşitli böcek gruplarında birkaç ortak ihtiyaca tepki olarak bağımsız şekilde ortaya çıkmıştır. Bunlar arasında boynuzlu yabanarıları (Bovidae), odun kurtları (Lymexilidae), geviş böcekleri (Passalidae) ve genellikle kabuk ve Ambrosia böcekleri gibi geniş bir böcek grubu bulunmaktadır. Çeşitlilikleri ve ekolojik etkileri nedeniyle, kabuk ve ambrosia böcekleri bu sıralamada ilk sıraya yerleştirilir. Kabuk ve ambrosia böceklerinin funguslarla ilişkisi Tersiyer dönemde başlamış ve birbirinden bağımsız birden fazla soyda önemli olmuştur. Böylece geniş bir simbiyotik ilişki ağı kurulması mümkün olabilmiştir. Fungus yetiştiriciliği, fungusların ağaç dokusunun sindirilmesi ve fungusların böcekler tarafından taşınması gibi örnekler verilebilir. Bu ilişkiler, ekolojik bir bakış açısından dikkat çekicidir, ancak aynı zamanda daha sorunlu yönleri de vardır. Maalesef, bu tür simbiyotik organizmalar, dünyadaki en son istilacı ağaç zararlılarının çoğundan sorumludur.

Dünya’da kozmopolit olarak yayılış gösteren bu böcek grupları ülkemizin hemen hemen her yerinde, yaygın olarak ikincil (sekonder) zararlı olarak görülmektedir (Sarıkaya ve Avcı 2010). Bu böcekler, üremelerini arttıran veya azaltan faktörlerin etkisine bağlı olarak ağaç öldürücü veya meşcere tahripçisi olabilmektedir (Can 2005). Bazı kabuk böceği türleri zayıf düşmüş ve ölmekte olan ağaçlara bulaşırken, bazıları da sağlıklı bireylere bulaşarak ağacın zarar görmesine sebep olmaktadır. Kambiyumda yaşayan böcekler ergin hale geldiklerinde çoğalabilecekleri yeni konukçu ağaçlar bulmak üzere çevreye dağılırlar ve çok hızlı bir şekilde yayılarak epidemilere yol açarlar (McNee ve diğ. 2000). Bu epidemiler yalnızca ağaç sağlığı ve odun kalitesine zarar vermek ile

kalmayıp yaban hayatını ve orman alanlarının rekreasyonel kullanımını da olumsuz bir şekilde etkilemektedir (Mezei ve diğ. 2014).

Bunula beraber, kabuk böcekleri ağaçlara doğrudan zarar vermek ile beraber, ilişkide buldukları ve taşıdıkları bazı fungus türleri nedeniyle ormancılıkta daha fazla ekonomik kayıplara neden olabilmektedir. Funguslar ve kabuk böcekleri (Coleoptera, Scolytinae) arasındaki ekolojik etkileşimler oldukça karmaşık olabilmektedir (Six 2012). Kabuk böceklerinin hem larva, hem de ergin dönemlerinde bağırsak sistemlerinde ve diğer vücut bölgelerinde birçok fungal topluluğu içerdiği ve bu fungusların böcekler ile patojenik ilişkilerden zorunlu mutualistik ilişkilere kadar birçok farklı etkileşimde bulunduğu bilinmektedir (Dharne 2006). Bu karşılıklı ilişkide, böcekler farklı ağaçlara saldırdıkça funguslar da yeni konakçalarına basit yoldan ulaşmış olmaktadır ve böylelikle odun tahripçisi olan birçok patojen, bu böcekler sayesinde yeni konakçılarında dağılım gösterebilmektedir. Bu ilişkide fungus, ağaçtaki floem dokusunu bir habitat olarak böceğe uygun hale getirmek veya neslinin devamının sağlanması için böceğe besin kaynağı oluşturmak gibi avantajlı görevler üstlenebilmektedir. Ayrıca, bu simbiyotik ilişkide funguslar ağaç toksinlerini azaltarak ağaç savunmasını düşürmeye de katkıda bulunmaktadır. Böylelikle değişen koşullar altında kabuk böceğinin performansını farklı şekilde etkileyebilmektedirler (Graham 1967).

Scolytinae familyasının önemli bir üyesi olan *Tomicus destruens* (Woll., 1865), çam ormanlarının sağlığı ve canlılığı üzerindeki potansiyel etkisi nedeniyle dikkat çekmektedir (Gencal ve Sarıkaya 2023). Bu kabuk böceğinin dağılım modellerini ve bunun fungus topluluklarıyla olan ilişkisini anlamak, etkili orman yönetimi stratejileri geliştirmek için çok önemlidir.

### **1.1 *Pinus brutia* Ten. (Kızılçam) Hakkında Genel Bilgi**

*Pinus brutia*, ilk kez Michele Tenore (1780-1861) tarafından 1811 yılında tanımlanmıştır. Bu ağaç, Türkçede kızılçam olarak bilinirken, İngilizcede en çok “Calabrian Pine” ve “Turkish Red Pine” isimleriyle tanınır. Tür adı, Roma

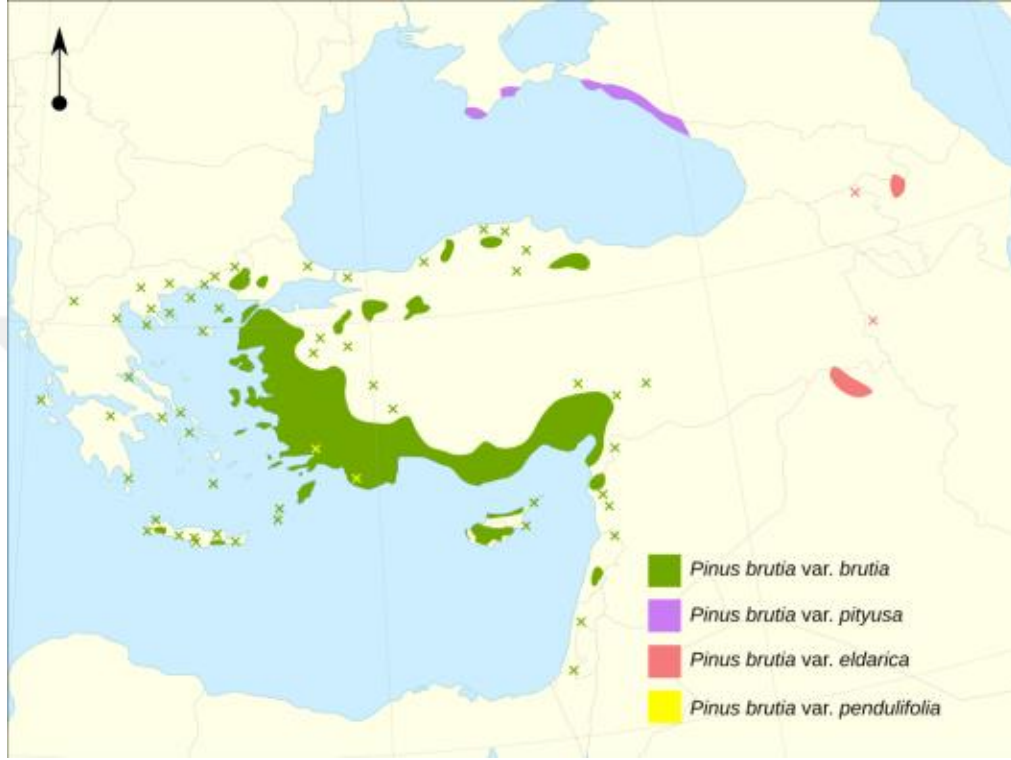
döneminde *Bruttium* olarak anılan günümüzdeki İtalyan Calabria bölgesinden esinlenilerek verilmiştir. Pinaceae familyasının bir üyesi olan Kızılçam (*P. brutia* Ten.), 20-25 metre yüksekliğe ulaşabilen ve 60 cm çapa kadar büyüeyebilen, görünüm olarak Halep çamına benzeyen, kalın dallı ve genellikle pürüzlü gövdesi olan bir ağaç türüdür (Anonim 2017), (Şekil 1. 1).



Şekil 1. 1: *Pinus brutia* Ten. (Kızılçam) ormanı.

Batı Anadolu ve Akdeniz bölgesinde geniş bir yayılışa sahip olan Kızılçam, aynı zamanda Erbaa yakınlarındaki Kelkit Çayı ile Yeşilirmak'ın birleştiği nokta, Ayancık, Sinop, Boyabat, Amasya ve Zonguldak gibi Akdeniz ikliminin etkili olduğu mikro klima bölgelerinde küçük adacıklar halinde bulunur. Türkiye'de en geniş yayılımı Akdeniz kıyı şeridi ile kıyıya yakın iç bölgeler ve Güneydoğu Anadolu'dadır. Ülkemizde 1500 metreye kadar yükselen alanlarda yetişir ve en yaygın çam türümüzdür (Şekil 1. 2) (Anonim 2013). Gençken piramit şeklinde bir görünüme sahipken, yaşlandıkça geniş tepeli bir yapıya bürünür. Genç ağaçların kabuğu düzgün ve gri renkteyken, yaşlandıkça kalın, kırmızımsı kahverengi bir kabuk oluşturur. Yeni sürgünler kırmızımsı renktedir ve bu nedenle Kızılçam adını almıştır. Yüksek sıcaklık gereksinimi olan bir türdür. Kışları ılıman, yazları sıcak ve kurak olan bölgelerde, zayıf, kayalık, kireçli ya da kumsal topraklarda yetişebilir. Ancak uygun iklim koşullarında ve balçıklı topraklarda kaliteli gövdeler oluşturur. Derinlere inen kazık kök sistemi vardır. Ülkemizde doğal olarak yetişen ve en hızlı büyüyen türdür. Rüzgara karşı dayanıklılığı düşüktür, bu nedenle rüzgar gövde ve tepe şekillenmesinde önemli bir rol oynar. Yetiştirildiği bölgelerde kar kırılması ve devrilmesi nadiren görülür. Sığ topraklarda fırtınalar zarar verebilir ve donlara karşı hassastır. Kalın kabuklu olması nedeniyle

örtü yangınlarından az zarar görür. Reçinesinden yararlanan tek çam türüdür. Kolay işlenebilirliği nedeniyle yapı malzemesi, mobilya ve ambalaj sanayisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Anonim 2013, Anonim 2017).



Şekil 1. 2: Türkiye ve çevresinde Kızılcçam yayılış alanları (Caudullo ve diğ. 2017'den değiştirilmiştir).

## 1.2 Böcek-Fungus Birliktelikleri

Yapılan araştırmalara göre böcek-fungus birlikteliği ilk olarak Geç Paleozoik çağ, Karbonifer dönemde (359 Milyon - 299 Milyon yıl önce) ortaya çıkmıştır (Beaver 1989; Ayres ve diğ. 2000; Farrel ve diğ. 2001). Ağaçlar, Karbonifer dönemden bu yana, floem, ksilem veya kabuk gibi çeşitli yapıları ile Dünya'nın bitki biyokütlesi ve besin maddelerinin çoğunu sağlamıştır. Dönem ve şartlar itibari ile böcekler bu durumdan ilk faydalananlar olmuştur. Böcekler bu besin kaynaklarına erişmek için çeşitli stratejiler geliştirmişlerdir. Ancak buna karşılık ağaçlar da pasif kalmamış ve öncelikle özel kimyasallar, reçineler ve

lateksler üreterek kendilerini savunmak için basitten karmaşığa çeşitli stratejiler geliştirmişlerdir. Bitkiler tarafından üretilen bu stratejik savunma ürünlerine ikincil metabolitler de denmektedir. Bu nedenle, canlı ve sağlıklı ağaçlarda çok az böcek kolonizasyonu görülürken, kabuk, floem veya odun çürümesini beslenme kaynağı olarak kullanan çoğu böcek türü, ancak ağaç öldükten sonra bunu gerçekleştirebilecek imkan bulurlar. Bununla beraber, ağacın yaşamsal faaliyetleri sonlansa bile, onu tüketmek isteyen böcekler için dirençli bir ortam sağlayabilir. Kabuk ve floemde bulunan birçok savunma kimyasalı ve reçine son derece dayanıklı, sağlam bileşiklerdir. Odun çürümesine karşı dirençli polimerlerin çoğunu ksilem de oluşturabilir. Tam da bu noktada, funguslar böceklerin yardımına yetişir ve böcek-fungus birlikteliği ortaya çıkmış olur. Uzun ve tekrarlanan denemeler sonucunda, odun delici böcekler ile funguslar arasında simbiyozun evrimleştiği görülür. Bu birlikteliğin sonucunda, ölü ağaçlardaki kalıntı savunma sistemleri yenilebilir hale gelmiştir (Klepzig ve diğ. 2009; Ma ve diğ. 2010; Hulcr ve Dunn, 2011).

İlk zamanlarda, kabuk böceklerinin beslenme kaynağı genellikle henüz canlılığını yitirmiş yara yapıları olduğu ve en yaygın fungus ilişkisinin zayıf patojenik funguslar ile sağlandığı tespit edilmiştir. Yıllar geçtikçe, bu durum birçok farklı ilişkiye tekrar tekrar evrimleşmiştir. En dikkate değer örnek, böcek açısından çok az veya hiç fayda olmadan, böceğin ölü bir ağaçtan fungusları alarak, başka bir ölü ağaca taşınmasıdır. Bu ilişki, belirli kabuk böcekleri suşlarında da karşılıklı bir ilişkiye evrimleşmiştir. Burada funguslar taze kolonileşmiş bir ağaca aşılansın ve yetişkin böceklerin larvaları tarafından tüketilmiştir. Floem üzerinde kolonileşen böcek larvalarının floemin kendisinden ziyade fungusları daha çok tükettiği belirlenmiştir (Klepzig ve diğ. 2009; Ma ve diğ. 2010).

Birçok kabuk böceği, sürekli bir fungus enfeksiyonu sağlamak için fungus kesesi (mycangia) geliştirmiştir (Paine ve diğ. 1997; Six 2003; Hulcr ve diğ. 2007). Bu yapıların adı dahi henüz bilimsel literatürde tartışma konusudur. İki terim; mycetangia ve mycangia bulunmaktadır. İkisi de kabuk böceklerinde fungus sporlarını taşıyan kutiküler girintileri ifade eder ve aynı anlama gelmektedir (Vega ve Biedermann 2019).

Funguslar (çoğunlukla ophiostomatoid Ascomycetes'ler) ve Kabuk böcekleri (Curculionidae, Scolytinae) arasındaki etkosimbiyozlar yaygın ve çeşitli olabilmektedir. Aralarındaki birliktelik şekli mutualizmden kommensale, fakültatifden zorunluya kadar çeşitlilik gösterebilir. Bazı funguslar oldukça spesifik olduğundan yalnızca tek bir böcek türüyle ilişkilendirilebilir. Bazıları ise pek çok böcek türüyle birliktelik kurabilir.

Yaygın olarak kabuk böcekleri ile ilişkili dört teleomorf cinsi ön plana çıkmaktadır, bunlar: *Ophiostoma*, *Ceratocystiopsis*, *Grosmannia* ve *Ceratocystis* cinsleridir (Diana 2012). Bunlar kendi arasında farklı monofiletik gruplar oluşturabilirler. *Ophiostoma*, *Ceratocystis* ve *Grosmannia* tek bir monofiletik grup iken, Ophiostomatales takımı üyeleri, *Ceratocystis*'den ayrılarak Microascales takımı içerisinde yer alır. Ophiostomatales takımına ait funguslar çoğunlukla kozalaklı ağaçlarla ilişkilendirilirken, *Ceratocystis* cinsi genellikle angiospermilerle ilişkilidir. Dolayısıyla konakçı böcek tek bir tür iken (örn; *T. destruens*) etkosimbiyoz fungusları farklı popülasyonlar temsil edebilmektedir (Six ve diğ. 2011).

### 1.3 Akdeniz Orman Bahçivanı, *Tomicus destruens* (Woll., 1865)

Böcek, fungus ve çam ormanları üçgeni açısından değerlendirildiğinde, ülkemizde çam ormanlarında zarar yapan *Tomicus* cinsine ait üç tür (*T. destruens*, *Tomicus minor*, *Tomicus piniperda*) arasında Akdeniz Orman Bahçivanı [*T. destruens* (Wol., 1865)] kızılçam ormanları başta olmak üzere çam sahalarında yaptıkları zararlarla oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle sekonder zararlı olan bu böcek, genellikle Akdeniz ve Ege Bölgesinde kurak geçen dönemlerin ardından primer karakter kazanabilmektedir. Bu yörelerden özellikle kızılçam sahalarının en önemli ve yaygın türlerinden birisi olarak karşımıza çıkmaktadır. Spesifik biyolojisi hakkında çok fazla çalışma olmamasıyla birklikte (Sarıkaya ve Avcı 2010), nesil başına iki dağılma fazının meydana gelmesi nedeniyle muhtemelen yüksek dağılma kapasitesine sahip olduğu düşünülmektedir. Yaşam döngüsü, iç kabukta yumurtlama ve larva gelişimini izleyen bir gövde saldırısı evresinden ve olgunlaşma beslemesi için ılık mevsimde sürgün saldırısı

evresinden oluşur ve *T. destruens* üreme koşulları için kesinlikle çamlara bağlıdır (Chararas 1962).

Kuvaterner dönemden günümüze cereyan edan iklimsel salınımlar dünya genelinde pek çok türün dağılımına etki ettiği gibi *T. destruens*'in de dağılımına etki etmiştir. Bu dağılım esnasında türün filogenetik yapısı bağımlı oldukları ana konakçılara bağlı olarak (*Pinus halepensis*, *P. pinaster*, *P. radiata*, *P. pinea*, *P. brutia*) üç farklı hatta yayılım göstermiştir (Korol ve diğ. 2002): Doğu Akdeniz (Türkiye, Ürdün, İsrail), doğu Avrupa (Yunanistan ve İtalya) ve batı Akdeniz (Fas, İspanya ve Fransa) hatlarıdır.

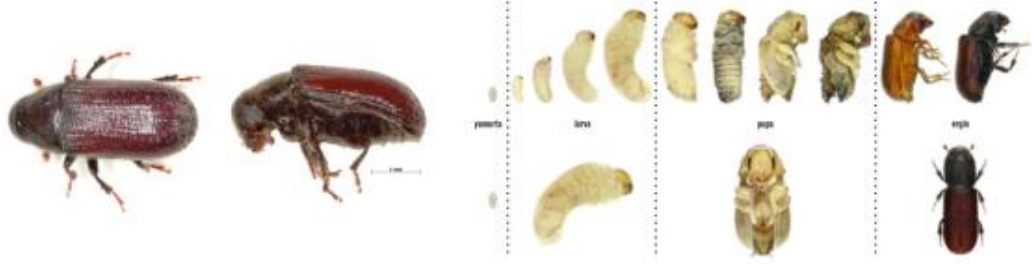
*T. destruens* popülasyonu kabuk böcekleri ortak adıyla bilinen Scolytinae (Coleoptera, Curculionidae) alt ailesinde yer almaktadır (Tablo 1. 1). Ancak yaşam döngüsü ve zarar verme potansiyelleri göz önüne alındığında, bu popülasyon daha çok “çam sürgün böceği” (pine shoot beetle) ismiyle anılmaktadır (Branco ve diğ. 2010). Türkçede bilinen yaygın adı Akdeniz Orman Bahçivanı olarak geçmektedir. Bu popülasyon Akdeniz havzası ve Kuzey Afrika'nın Atlantik bölgelerinde coğrafik yayılım göstermektedir. Popülasyonun konakçılarını çamlar oluşturmaktadır. Ülkemizde ise Kızılcım (*Pinus brutia* Ten.) ve Karaçam (*Pinus nigra* Arnold.) ormanlarında yayılış gösterdiği bilinmektedir (Sarıkaya ve Avcı 2010).

Tablo 1. 1: *Tomicus destruens*'in bilimsel sınıflandırması.

<b>Alem</b>	Animalia
<b>Şube</b>	Arthropoda
<b>Sınıf</b>	Insecta
<b>Takım</b>	Coleoptera
<b>Aile</b>	Curculionidae
<b>Alt Aile</b>	Scolytinae
<b>Cins</b>	Tomicus
<b>Tür</b>	<i>T. destruens</i>
<b>Binomial isim</b>	<i>Tomicus destruens</i> (Woll., 1865)

**Morfolojileri:** Yetişkinlerin gövdesi, longitudinal noktalı çizgilerle kaplı mavimsi bir toraks ve kahverengi abdomen ile 3-5 mm uzunluğundadır. Son anten

segmentleri kulüp şeklindedir. Larvalar apodöz, mavimsi gri, kahverengi başlı, yaklaşık 5 mm uzunluğundadır (Şekil 1. 3) (Faccoli 2006).



Şekil 1. 3: *Tomicus destruens* yumurta, larva, pupa ve ergin karakterlerin görünüşleri (Faccoli 2009'dan değiştirilmiştir).

**Yaşam Şekilleri:** Düşük rakımlı alanlarda (0-300 m) Kasım ayında yumurtlama faaliyetine başlarlar ve Nisan ayından itibaren genç erginler görülür. Larva dönemi Şubat başından Mart ortasına kadar sürerken, pupa dönemi Mart ortası ile Nisan ortası arasında gerçekleşir. Yılda tek bir üreme döngüsüne sahiptirler. 2 mm genişliğindeki bir giriş deliğinden başlayarak, dikey tipte bir ana yol oluştururlar. Bu ana yol, bir çiftleşme odası ile başlayan bir tür baston başına benzer yapıdadır. Giriş deliği etrafında reçine hunileri oluşur. Larva yolları 5 ila 7 cm uzunluğundadır. Olgun larvalar, larva yollarının sonunda bulunan oval pupa beşiklerinde pupa olurlar. Erginler, sürgünlerde olgunlaşma beslemesi yaparlar. Bu nedenle, sürgünler kuruyarak kızıl-kahverengi bir görünüm kazanır. Yaz aylarında, türün tanınmasında önemli bir rol oynayan kurumalar ve sürgünlerdeki giriş delikleri özellikle sürgünlerin uç kısımlarında meydana gelir (Faccoli 2006, Anonim 2016).

Genç ergin *T. destruens* bireyleri salgılanan etken maddelerin etkisi ve beslenme isteğiyle sağlıklı sürgünlere doğru çekilirler. Daha sonra zayıflamış ağaçların dallarını ve gövdelerini ararlar. İç kabuk ve dış diri odun üzerinde kemirme yöntemiyle kendilerine galeriler açarlar ve yumurtalarını bırakırlar. Larvalar burada beslenir, gelişir ve galerilerin sonunda pupa haline geçer. Genellikle tek yıllık bir nesli vardır. Sonbaharda yumurtlama meydana gelir ve genç bireyler kış aylarını galerilerinde beslenerek geçirir. Ergin bireyler uçuş yoluyla dağılım gösterebilirler.

Akdeniz Orman Bahçivanının (*T. destruens*) genellikle Akdeniz ve Ege Bölgelerinde çoğunlukla da kızılçam (*Pinus brutia*) sahalarının önemli bir zararlısı olduğu dikkati çekmekle beraber Türkiye'deki yayılış yerleri bu çalışmaya kadar net bir şekilde ortaya konulamamıştır. Türkiye'de yılda bir jenerasyona sahip olduğu bilinen türün aktif uçuş periyodu yükselti basamaklarına göre değişmekle beraber Kasım ayı ile Şubat ayları arasında gerçekleşmektedir. Böceğin aktif uçuş periyodunun ülkemizde zararlı olan diğer kabuk böceklerinin aksine kış aylarını içerisine alan periyotta gerçekleşmesi genelde, üretimin kış aylarına planlandığı çam sahalarında böceğin epidemi koşullarını birlikteliğinde getirmekte ve önemli ekonomik zararlar ortaya çıkabilmektedir (Sarıkaya ve diğ. 2022).

Küresel iklim değişimi sebebiyle canlıların yayılış alanlarını değiştirmeye meyilli oldukları bilinmektedir. *T. destruens* türünün ülkemizdeki yayılış sınırlarının tam olarak bilinmemesi ve iklim değişimine bağlı olarak ülkemizdeki yayılış alanının genişletme potansiyelinin bulunması çalışmada türün yayılışı ile ilgili olarak elde edilen yeni noktaların tespitinin önemini daha da arttırmaktadır. Elde edilen yeni kayıtlarla, türün yaygın olarak bulunduğu bilinen Akdeniz ve Ege Bölgelerinin yanısıra, Karadeniz Bölgesi başta olmak üzere, Marmara ve İç Anadolu Bölgesi'nde de varlığının belirlenmesi bu anlamda büyük role sahiptir (Sarıkaya ve diğ. 2022).

#### **1.4 Daha Önce Yapılmış Olan Benzer Çalışmalar**

Türkiye'de *T. destruens*'in konukçuları üzerine yapılan gözlemlerde, esas olarak Kızılçam (*P. brutia*) zararlısı olduğu, ancak Karaçam (*P. nigra*)'da da zararının tespit edildiği görülmektedir. Böceğin yayılışı ile ilgili olarak, özellikle Akdeniz ve Ege Bölgelerinde Kızılçam sahalarının önemli bir zararlısı olduğu tespit edilmiştir (Sarıkaya ve Avcı 2007; Sarıkaya 2008; Balay 2015; Sánchez-García ve diğ. 2015).

Son yıllarda iklim değişikliği, araştırmacıların dikkatini çeken önemli bir konu haline gelmiş ve çevresel etkilerini inceleyen birçok çalışmaya konu

olmuştur. Özellikle *T. destruens*'in yayılışı ve zararları ile ilgili veriler son yıllarda artış göstermiştir. Küresel iklim değişikliğinin bu böceğin yayılış alanı üzerinde belirgin etkiler yarattığı, güncel araştırmalarla ortaya konmuştur (Horn ve diğ. 2012; Sánchez-García ve diğ. 2015). Bu çalışmalar, iklim değişikliğinin *T. destruens*'in habitat tercihlerini, popülasyon dinamiklerini ve zarar potansiyelini nasıl etkilediğini araştırmakta ve bu etkilerin ekosistemler üzerindeki uzun vadeli sonuçlarını vurgulamaktadır. Özellikle sıcaklık ve nem değişimleri gibi iklimsel faktörlerin, bu böceğin yayılışını ve zararlılığını artırabileceği öngörülmektedir.

Faccoli (2005)'nin yapmış olduğu çalışmada, İtalya'da *T. destruens*'in bu zamana kadar ülkenin Akdeniz'e yakın bölgelerinde sadece *Pinus pinaster*'de bulunduğunu, *T. piniperda*'nın ise karasal bölgelerde yayılış yapan *P. sylvestris* ve *P. nigra*'da, hem de Akdeniz havzasında yayılışı olan *P. pinaster*'de tespit edildiğini bildirmiştir.

Sarıkaya ve Avcı (2010) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *T. destruens*'in biyolojisi, dağılımı ve zararının belirlenmesi amacıyla 2006-2008 yılları arasında Batı Akdeniz Bölgesi'ndeki *P. brutia* ve *P. nigra* meşcerelerinde araştırmalar yapılmıştır. Çalışmada, Antalya, Isparta, Burdur, Afyonkarahisar ve Muğla illerinde *P. brutia* ve *P. nigra*'nın böceğin konukçuları olarak belirlendiği ve *T. destruens*'in biyolojisinin yüksekliklere göre farklılık gösterdiği bulunmuştur. Böcek yılda bir nesil vermekte olup, uçuş dönemi düşük yüksekliklerde kasım, yükseklerde ise şubat aylarında bildirilmiştir. *T. destruens*'in, özellikle Kızılcım ağaçlandırma alanlarında ağaçların gövde ve sürgünlerinde oldukça önemli zarar verdiği belirtilmiştir. Araştırmacılar, *T. destruens*'i Batı Türkiye'nin Akdeniz bölgesinin Scolytinae faunası için yeni tür olarak bildirmiştir (Sarıkaya ve Avcı 2011).

Orman böcekleri ve mikroorganizmalar arasındaki ilişki, dünya çapında ağaçlara verilen biyotik hasarın "temel anahtarı" olarak görülmektedir. Çoğu kabuk böceği türü, *Pinus* spp.'leri enfekte etmekte ve bu böceklerin birçoğu, ölü, hastalıklı veya zayıflamış ağaçları kolonize eden ikincil davetsiz misafirler olarak kabul edilmektedir (Wood ve Bright 1992; Ye ve Ding 1999). Kabuk böcekleri ve özellikle bu tezin konusunu oluşturan *Tomicus* cinsi ile ilgili olarak böcek fungus birlikteliği çalışmalarına ulaşmak mümkündür.

Gibbs ve Inman (1991), 1987'deki büyük fırtınadan sonra, güney İngiltere'de rüzgarla devrilen çam ağaçlarında mavi lekeye neden olan fungus türlerinin vektörü olarak *T. piniperda*'nın rolünü çeşitli agar ortamlarında bu böceği kültürleyerek incelemişlerdir. Bu çalışmada tespit edilen başlıca fungal tür *Leptogreaphium wingfield*'i olup, *L. lundbergii* türü de hem böceklerde, hem de ağaçlarda tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada *L. huntii*, *L. procerum* ve tanımlanamayan bir *Leptographium* türü kaydedilmiştir. Çalışmada *Hormonema dematioides* ve *Aureobasidium pullulans* fungusları ile sıklıkla karşılaşılmıştır.

Benzer bir çalışmayı Sabbattini ve diğerleri (2006) yılında İtalya'nın Toskana bölgesindeki ormanlık alanda gerçekleştirmiştir. Çalışmada *T. destruens* ve *Leptographium* cinsi fungusları arasındaki ilişkiyi araştırmak için *P. pinea* ve *P. pinaster* ağaçlarından yetişkin *T. destruens* örnekleri ve aynı zamanda istila edilmiş bu ağaçlardan çam dokuları örnekleri alınmıştır. Çalışmanın sonucunda çam sürgünlerinde olgunlaşma-beslenme sırasında (ilkbahardan yaz) fungusu taşıma kapasitesi azalma eğiliminde olduğundan dolayı, sonbaharda üreme sırasında popülasyonun sadece küçük bir bölümünün *Leptographium* cinsi fungusları çam ağaçlarına taşıyabileceğinin kanıtına varmışlardır.

Villari ve diğerleri (2006) yılında İtalya-Toskana bölgesinde yapmış oldukları çalışmada, *P. pinea*, *P. pinaster* ve *P. nigra* ağaçlarında bulunan kabuk böcekleriyle ilişkili fungus patojenlerinin varlığını araştırmışlardır. *T. destruens* ile ilişkili en yaygın bulunan fungusları *Leptographium* cinsine ait fungus türleri olarak rapor etmişlerdir.

Jama ve diğerleri (2007) yılında yaptığı çalışmada yetişkin *T. piniperda* bireylerinden ve galerilerinden fungal izolasyonlar gerçekleştirilmiştir. *T. piniperda* ve galerilerinden *L. wingfieldii*, *Ophiostoma minus* ve *Ophiostoma ips* elde edilmiştir. *Ophiostoma minus*, *T. piniperda* ile en sık ilişkilendirilen tür olup, böceklerde en sık bulunan tür olmuştur. Bu tür, araştırılan ormanların çoğundan toplanmışken, *O. ips* ve *L. wingfieldii* yalnızca Tunus'un Orta ve Kuzey bölgelerindeki ormanlardan elde edilmiştir. *T. piniperda* ile ilişkilerinin sıklığı genellikle düşük kalarak, *O. ips* için yalnızca bir kez %11,1'e ulaşmıştır. Çalışmada ayrıca fungal izolatların virulansı Halep çamı (*Pinus halepensis* Mill.)

üzerinde test edilmiş ve *L. wingfieldii*'nin en virulent tür, *Ophiostoma minus*'un ise en az virulans gösteren tür olduğu belirlenmiştir.

Jankowiak ve diğerleri (2008) yılında yaptığı çalışmada, Polonya'da rüzgar nedeniyle devrilmiş ve *T. minor* böcekleri tarafından istila edilmiş *Pinus sylvestris* ağaçlarından böcek ve odun dokularını örneklemiştir. Böceklerin vücutlarından 38 türü temsil eden 799 fungus izolatu elde edilmiştir. Baskın funguslar arasında *Ophiostoma canum* (böceklerin %57'sinden izole edilmiş), *Hormonema dematioides* (%23) ve *Ambrosiella tingens* bulunmuştur. *O. minus*, *O. piceae* ve *Graphium* türleri gibi diğer reçine lekesi yapan funguslar ise çalışmada daha düşük sıklıkta bulunmuştur. *Penicillium* spp. ve *Trichoderma harzianum* gibi yaygın funguslar da çalışmada sıkça izole edilmiştir. Galeri sistemlerinden ise 40 türü temsil eden 2081 fungus izolatu elde edilmiştir. Galerilerden elde edilen baskın funguslar arasında *O. canum* (odun parçalarının %59'undan izole edilmiş), *A. tingens* (%18) ve *H. dematioides* bulunmuştur. *L. lundbergii*, *L. procerum*, *O. minus* ve *O. piceae* gibi diğer türler daha az sıklıkla izole edilmiştir. Galerilerden *L. hoffmannii* ve *Penicillium* gibi türler de izole edilmiştir.

Silva ve diğerleri (2015) yılında yapmış olduğu çalışmada *P. sylvestris* türü ile ilişkili *T. piniperda* böceklerini kullanmıştır. Çalışmada morfolojik teşhisin yanı sıra moleküler teşhis teknikleri de kullanılmıştır. Çalışmada elde edilen funguslar arasında *Arthriniium sacchari*, *Beauveria bassiana*, *Candida boleticola*, *Candida* sp., *Dipodascaceae* sp., *Grosmannia* sp., *Kuraishia* sp., *Ophiostoma canum*, *Ophiostoma minus*, *Penicillium velutinum*, *P. raistrickii*, *Phoma poolensis*, *Sydowia polyspora*, *Trichoderma viride*, *Mortierella verticillate*, *Mucorales* sp., *Umbelopsis* sp. türleri bulunmaktadır.

Munoz ve diğerleri (2015<sup>a</sup>) yılında yaptığı çalışmada, İspanya'nın Kuzeyindeki Cantabria bölgesinde *Tomicus* spp. tarafından açılmış çam sürgünlerini örneklemiştir. İlk örnek alanı saf Monteri Çamı (*Pinus radiata* D. Don) plantasyonundan, ikinci örnek alanı ise Avrupa Karaçamı (*Pinus nigra* Arnold. subsp. *salzmannii*) ve Sarıçam (*Pinus sylvestris* L.) karışık meşcerelerinden oluşmuştur. Toplamda 499 çam sürgünü toplanmış ve her sürgünde bir böcek bulunmuştur, böcek işgal oranı %9,82 olarak rapor edilmiştir. Böcek sıklığı Monteri çamlarında %5,17, Avrupa karaçamlarında %18,07 ve

Sarıçamda %9,30 olarak tespit edilmiştir. Saf Monteri çamı meşceresinde yakalanan iki böcek sadece *T. destruens* (%13,33; toplam böceklerin %4,08'i) iken, karışık meşceredeki böceklerin tamamı *T. piniperda* olarak bildirilmiştir.

Munoz ve diğerleri (2017) yılında yapmış olduğu çalışmada, *T. piniperda* ve *T. destruens* böcekleri ile ilişkili toplamda 113 saf fungus kültürü izole etmiştir ve bunlar 13 morfolojik OTU'ya ait olarak bildirilmiştir. Tür tanımlaması ITS dizileri kullanılarak gerçekleştirilmiş ve toplamda 11 takson (her böcekte ortalama  $1,33 \pm 0,05$  takson) ortaya çıkarılmıştır. Çalışmada elde edilen fungal türler *Cladosporium* sp., *Fusarium lateritium*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium* sp., *Mucor hiemalis*, *Ophiostoma canum*, *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phaeomoniella effuse*, *Phoma herbarum* ve *Sydowia polyspora* olarak bildirilmiştir. *Sydowia polyspora*, tüm topluluğa hakim tür olarak bildirilmiştir. Çalışmanın PI (taşıyıcılık indeksi) genel olarak çok düşük olup, funguslar ile *Tomicus* spp. arasında düşük taşıyıcı ilişkiler gösterilmiştir. Ancak Dunn testi sonuçlarına göre *S. polyspora*'nın PI değeri diğer taksonlardan anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (tüm durumlarda  $p < 0.01$ ).

Wang ve diğerleri (2019) yılında yaptığı çalışmada Çin'deki *Pinus yunnanensis* ve *Pinus kesiya* ağaçlarında *T. brevipilosus*, *T. minor* ve *T. yunnanensis* böcek türlerini örnekleyerek bu *Tomicus* cinsi ile ilişkili ophiostomatoid fungusların kapsamlı bir araştırmasını yapmışlardır. Yetişkin böceklerden ve galerilerinden 772 ophiostomatoid fungus suşu izole edilmiştir. Çalışmada beş cinse ait toplam on bir tür tanımlanmıştır. Bu türler arasında, altı bilinen tür olan *Esteya vermicola*, *Leptographium yunnanense*, *Ophiostoma brevipilosi*, *O. canum*, *O. minus* ve *O. tingens* ile dört yeni takson olan *Graphilbum anningense*, *O. aggregatum*, *Sporothrix pseudoabietina* ve *S. macroconidia* bulunmaktadır. Ayrıca bir suş *Ophiostoma* sp. olarak tür seviyesinde tanımlanamamıştır. Ophiostomatoid topluluk genel olarak üç tür tarafından domine edilmiştir ve toplam izolatların %87,3'ünü temsil etmektedir; bu türler *O. canum*, *O. brevipilosi* ve *O. minus*'tur. Her böceğin ophiostomatoid topluluğu, tür çeşitliliği göstermesine rağmen, tek bir fungus türü tarafından baskın hale gelmiştir; *Ophiostoma canum*, *T. minor*'un ophiostomatoid topluluğunu domine ederken, *O. brevipilosi* ve *O. minus* sırasıyla *T. brevipilosus* ve *T. yunnanensis*'in

topluluklarında baskın türler olmuştur. Kalan %12,7'lik kısmı temsil eden sekiz ek tür ise marjinal veya nadir olarak görülmüştür. Bu sonuçlar, *Tomicus* cinsi popülasyonlarının belirli fungus türleri tarafından domine edildiğini ve bu türlerin bazı düzeyde özgülük veya münhasırlık gösterdiğini öne sürmektedir.

Moumeni ve diğerleri (2021) yapmış oldukları çalışmada, Cezayir'in Kuzey Doğu yarı kurak bölgesinde *Pinus halepensis* üzerinde kabuk böceklerinin yaygınlığını araştırarak kabuk böceklerinin doğrudan etkileyen çam ağaçlarından örnekleme yapmışlardır. Çalışma sonucunda Scolytinae alt familyasına ait altı kabuk böceği türü tespit edilmiş ve *T. detruens* ile *Orthotomicus erosus* türlerinin çalışılan üç meşcerede geniş bir şekilde yayılmış olduğu gözlemlenmiştir. *Crypturgus numidicus*, *C. mediterraneus*, *H. ligniperda* ve *H. micklitzii* sadece ölü ağaçları kolonize ettiğini raporlamışlardır. Bu ksilofag böceklerle ilişkili mikrofungusların gelecekte tanımlanmasıyla birlikte, bu veriler Doğu Cezayir'in bazı bölgelerinde gözlenen Halep çam ormanlarının azalmasıyla mücadele etmek için önleyici tedbirler için kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Hui-min ve diğerleri (2022), kuzeydoğu Çin'de *Pinus koraiensis*'i istila eden *Tomicus pilifer* ile ilişkili ophiostomatoid fungusların tanımlanmasını ve *T. pilifer*'in taksonomik durumunu aydınlatmayı amaçlamışlar. Çalışmada *Granulomato usinterstitiale* ve *Ophiostomatales fuscum'un* Çinde bulunan *T. pilifer* ile ilişkili ophiostomatoid fungus çeşitliliğinin ilk raporu olduğunu belirtmişlerdir.

Wu ve diğerleri (2023) yılında yaptıkları araştırmada *Tomicus minor* ve *Tomicus yunnanensis*'in mekânsal dağılımlarını *Pinus yunnanensis* (Yunnan Çamı) meşceresinde incelemişlerdir. Çalışmadaki farklı ağaçlarda *Tomicus destruens* ile ilişkili spesifik fungus türlerini *Ophiostoma ips*, *Leptographium procerum*, *L. wingfieldii*, *Grosmannia alacris*, *Ophiostoma minus* ve *L. terebrantis* olarak belirtmişlerdir. Çalışmada ayrıca *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. ve *Cladosporium* spp. gibi fungusları izole etmişlerdir.

## 1.5 Çalışmanın Amacı

Kabuk böcekleri ile funguslar arasındaki istilacı simbiyotiklik, küresel boyutta meyve ve kereste endüstrilerinin yanı sıra orman ekosistemleri için kontrol edilemez bir tehdit olarak ortaya çıkmaktadır. Artık günümüzde bu ilişkinin sonuçlarının küresel ölçekte bazı büyük sorunları beraberinde getirdiği göz ardı edilemez. Ancak, böcek-fungus etkileşimleri son derece kompleks olmakla birlikte pekçok farklı grupları kapsamaktadır.

Bu ilişkinin ilk tespit edilmesi 1800'lü yıllara dayanıyor olsa da, spesifik ölçekte çalışmalar moleküler yaklaşımların da gelişmesiyle son yıllarda artış kazanmıştır. Diğer taraftan, moleküler çalışmaların gelişmesiyle bu kompleks durum yeni bir hal almış, haplotiplik ve polimorfizm gibi çalışmalarının önünü açmıştır. Böylelikle neden-sonuç ve buna bağlı olarak müdahale seçenekleri için daha ayrıntılı yorumlama ve öneriler yapılabilmektedir.

Dünyamızda önemli bir alanı kaplayan ormanlarımız oksijen kaynağı, su varlığını koruması ve düzenlemesi, erozyonu önlemesi, odun kaynağı, beden ve ruh sağlığımız üzerinde yarattığı olumlu etkiler, ikincil ürün (tıp, kozmetik, kimya ve boya sanayi) veya hammadde olarak, iş ve geçim kaynağı olarak, asıl orman ürünleri (tomruk, tel direği, maden direği, sanayi odunu, kağıtlık odun, lif yonda odunu, sırik, çubuk, yakacak odun) ve ikincil orman ürünleri (reçine, çıra, sığla yağı, defne, şimşir, kök odunu, kekik, adaçayı, çam fıstığı, funguslar, kozalak) olarak hayati öneme sahiptir. Dünyanın geleceği için korunması gereken öncelikli alanlardan biri olan ormanlar, biyotik ve abiyotik birçok faktör nedeniyle zarar görmekte ve bir bölümü de yok olma tehlikesi altındadır. Biyotik faktörlerden biri olan böceklerin ekolojik koşullara bağlı olarak önemli derecede zarar oluşturabildikleri ve beraberinde bazı fungal hastalık etmenlerine de vektörlük yaptığı bilinmektedir. Bu soruna çözüm oluşturabilmek için böcek ve fungus ilişkilerinin net bir şekilde ortaya çıkartılması günümüzde birincil hedeflerden biri olmalıdır.

Bu bakış açısıyla tezin amaç ve hedefleri;

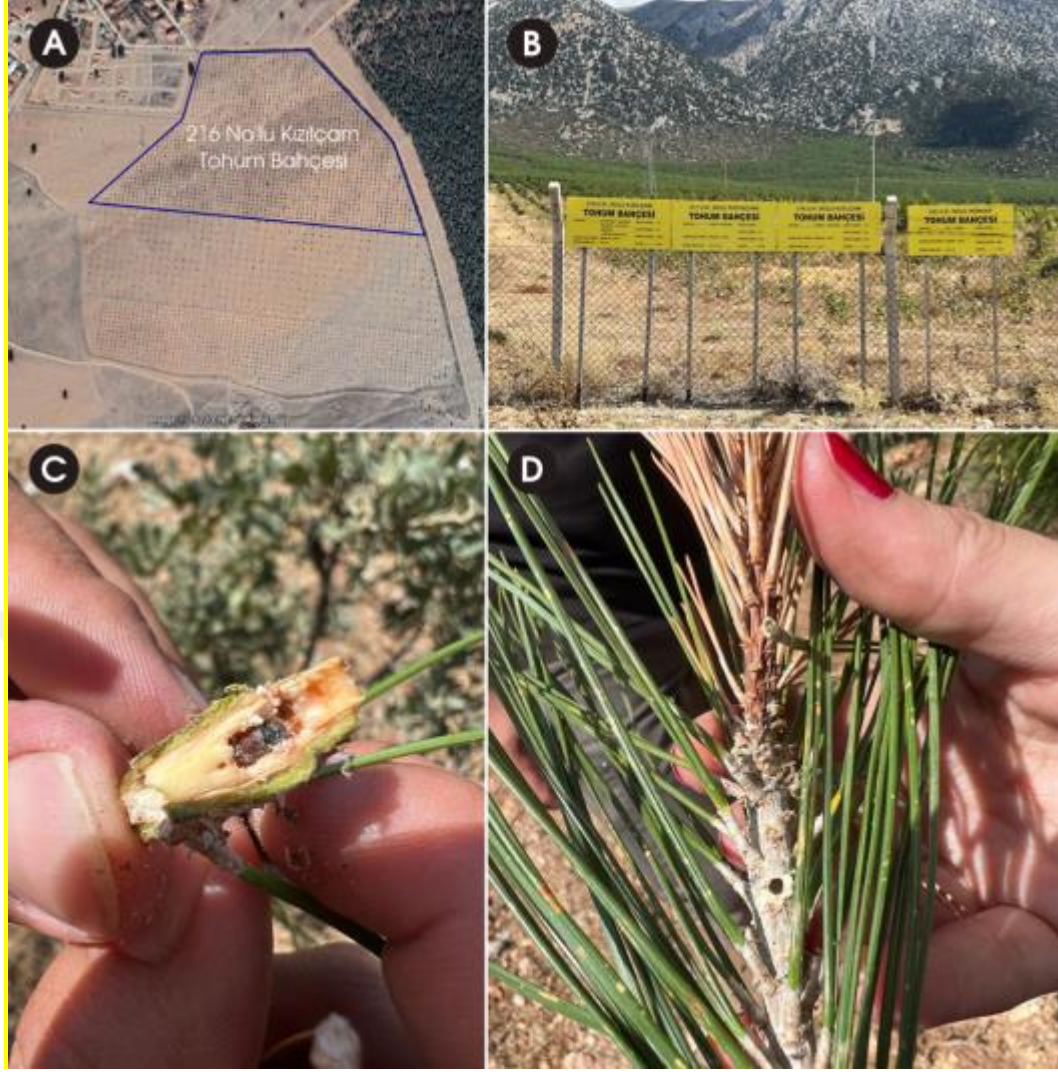
- *T.destruens* (Woll., 1865) (Clooptera: Scolytinae) türünün morfolojik ve moleküler yöntemlerle karakterizasyonu,
- *T. destruens* populasyonlarının vücut yüzeyinde ve vücut içinde bulunan fungal türlerin izolasyonu,
- İzole edilen fungal türlerin morfolojik ve moleküler yöntemlerle karakterizasyonu şeklindedir.



## 2 MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1 Çalışma Alanı ve Örneklem

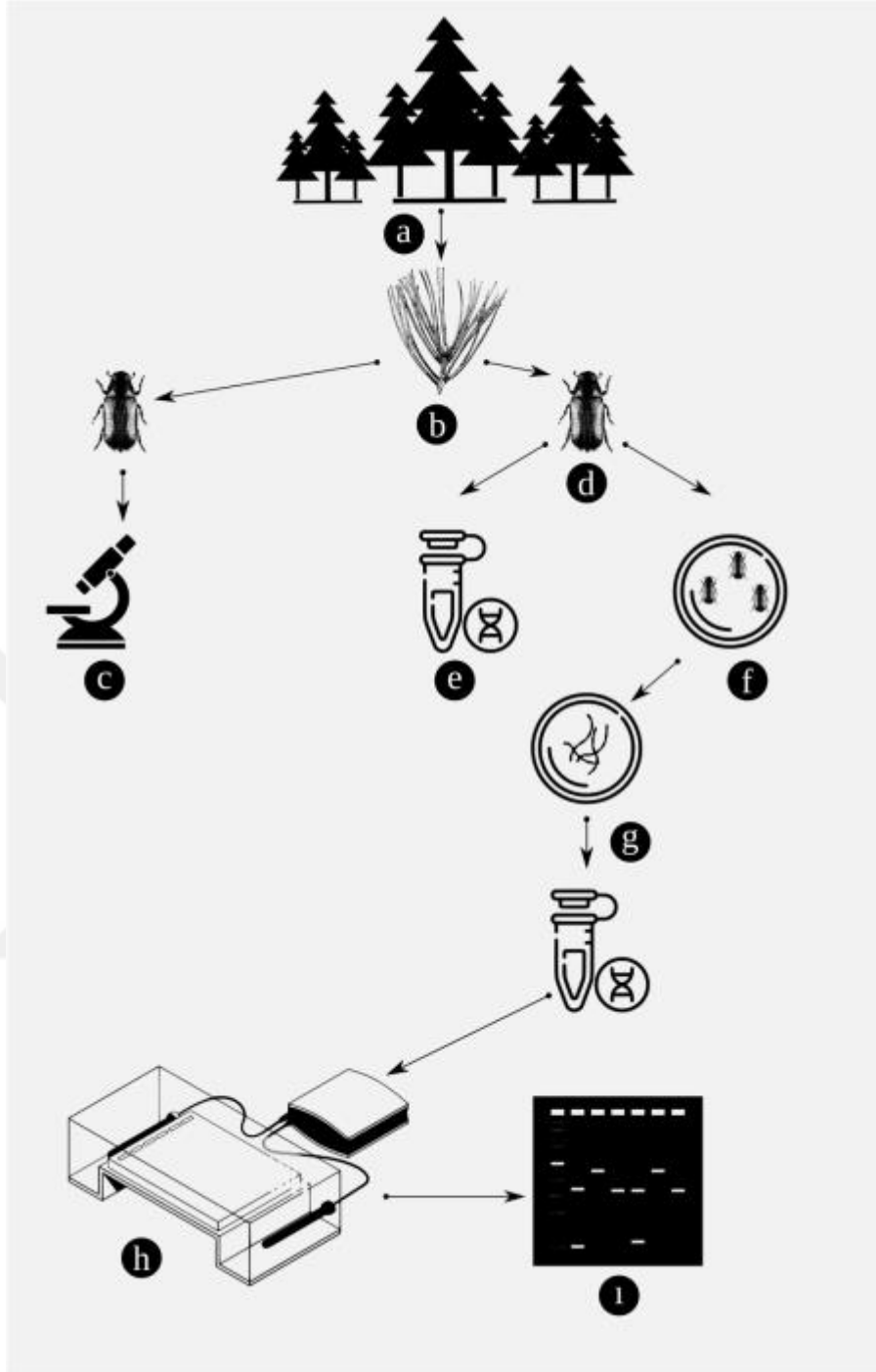
Çalışma kapsamında arazi ve örneklem çalışmaları Denizli Orman İşletme Müdürlüğü'ne bağlı Çivril Orman İşletme Şefliği sınırlarında bulunan 216 no'lu Kızılcım Tohum Bahçesinde yürütülmüştür (Şekil 2. 1, a-b, Şekil 2. 2). Aralık 2015 tarihinde kurulan 216 no'lu Kızılcım tohum bahçesi orjini Acıpayam, Bozdağ, Kelekçi, Fethiye ve Üzümlü'dür. Klon adedi 47 olup, bahçede başlangıç dikim adedi 1768'dir. Tohum bahçesi rakımı 925 m. - 980 m. arasında değişiklik göstermektedir. Çalışma takvimi, *Tomicus destruens*'in yaşam döngüsü dikkate alınarak 2022 Eylül - 2023 Haziran tarihleri arasında Çivril Orman İşletme Şefliği gözetiminde izleme çalışmaları yapılmıştır (Şekil 2. 1, c-d). Çalışma kapsamında, böceğin ergin dönemi takip edilerek uygun görülen Eylül 2022 döneminde tür tespitleri yapılmıştır. Hem *T. destruens* bireyleri, hem de funguslar çalışılacağından örnekler iki farklı şekilde toplanmıştır (Şekil 2. 3). Böcek ile ilgili yürütülecek çalışma kapsamında bireyler (n=20) toplanarak, seri şekilde ayrı ayrı steril falkon tüplerde İzopropil Alkol (Merck 100983) içerisine alınarak steril eppendorflarda fikse edilmiştir. Fungal çalışmalar için ise bireyler (n=20) canlı olarak steril falkon tüplere steril pens kullanılarak ayrı ayrı ivedilikle alınmış ve soğutulmuş yalıtımlı saklama dolabı içerisinde laboratuvar ortamına taşınmıştır. Örnek sayıları, literatüre (Beaver 1989; Gallego ve Galian 2001; Ben Jamaa ve diğ. 2007; Chang ve diğ. 2017) ve laboratuvar çalışmalarında öngörülen replike ekim sayısına bağlı optimum imkanlar göz önünde bulundurularak belirlenmiştir.



Şekil 2. 1: a-b) Denizli Orman İşletme Müdürlüğü'ne bağlı Çivril Orman İşletme Şefliği sınırlarında bulunan 216 no'lu Kızılcam Tohum Bahçesi, c-d) Kızılcam sürgünlerinden tespit edilen *Tomicus destruens* (Woll., 1865) örneği ve galerisi.



Şekil 2. 2: Denizli Orman İşletme Müdürlüğü'ne bağlı Çivril Orman İşletme Şefliği sınırlarında bulunan 216 no'lu Kızılcam Tohum Bahçesi yer buldu haritası.



Şekil 2. 3: a) Saha çalışması aşaması, b) İstilalı sürgünlerden *T. destruens*'lerin tespiti, c) Morfolojik teşhis için ayrılan *T. destruens* örnekleri, d) Moleküler çalışmalar için ayrılan *T. destruens* örnekleri, e) *T. destruens* moleküler tespiti, f- g) *T. destruens* örneklerinin petri üzerinde yürütülmesi, fungusların besi ortamında yetiştirilmesi, COI gen bölgesi çoğaltılarak, ITS1 ve ITS4 primerleri ile PCR işlemleri, h- i) Jel elektroforezi, görüntüleme.

### 2.1.1 Çalışma Alanına Ait İklimsel Özellikler

Böcek, fungus ve ağaç ilişkisi çalışılırken, çalışma bölgesine ait iklim verilerinin önemi büyüktür. İklim verileri, ekosistem dinamiklerini ve organizmalar arasındaki etkileşimleri anlamak için kritik bir rol oynar. Sıcaklık, böceklerin, fungusların ve ağaçların yaşam döngülerini doğrudan etkiler. Çeşitli böcek türleri, belirli sıcaklık aralıklarında aktif olur ve bu sıcaklıklar, onların üreme, beslenme ve yayılma hızlarını belirler. Funguslar da sıcaklık değişimlerine hassastır; bazı türler soğuk iklimlerde gelişirken, diğerleri daha sıcak ve nemli koşullarda yayılır. Ağaçlar ise fotosentez, büyüme ve su kaybı süreçlerinde sıcaklık değişimlerine tepki verir. Sıcaklık verileri, bu organizmaların optimum yaşam koşullarını belirlemek ve iklim değişikliklerine verdikleri tepkileri anlamak için kullanılır. Yağış miktarı ve dağılımı, böceklerin, fungusların ve ağaçların su teminini ve dolayısıyla yaşamlarını etkiler. Böcekler, nemli ortamlarda daha aktif olabilirken, kurak dönemlerde popülasyonları azalabilir. Funguslar ise genellikle nemli koşulları tercih eder ve yağış miktarı, fungus çeşitliliği ve bolluğunu doğrudan etkiler. Ağaçlar, suyu kökleriyle alarak büyürler ve yeterli yağış olmadığında su stresi yaşayarak büyüme oranları düşer veya hastalıklara daha açık hale gelirler. Yağış verileri, ekosistemdeki su döngüsünü ve organizmaların suya erişimini anlamak için kritiktir.

Rüzgar, tozlaşma, tohum yayılması ve böceklerin taşınması gibi süreçlerde önemli bir rol oynar. Rüzgar yönü ve hızı, böceklerin yayılma alanlarını ve fungus sporlarının taşınma mesafelerini belirler. Ağaçlar, rüzgarla gelen tohumlar sayesinde yeni alanlara yayılabilir. Ayrıca, rüzgarın şiddeti ve yönü, ağaçların fiziksel dayanıklılığını ve dolayısıyla orman yapısını etkileyebilir. Rüzgar verileri, bu süreçlerin modellenmesi ve ekosistem dinamiklerinin anlaşılması için gereklidir.

İklimsel verilerin temininde Meteostat veri tabanı kullanılmıştır. Meteostat, hava ve iklim verilerinin açık erişimini sağlayan online bir platformdur. Binlerce hava istasyonuna uzun vadeli zaman serilerinde erişim imkanı sunmaktadır. Bu çalışma kapsamında Ocak 2022 – Aralık 2023 tarihleri arasındaki iklimsel verilere ait ortalamalar kullanılmıştır. Bu dönem içerisinde en

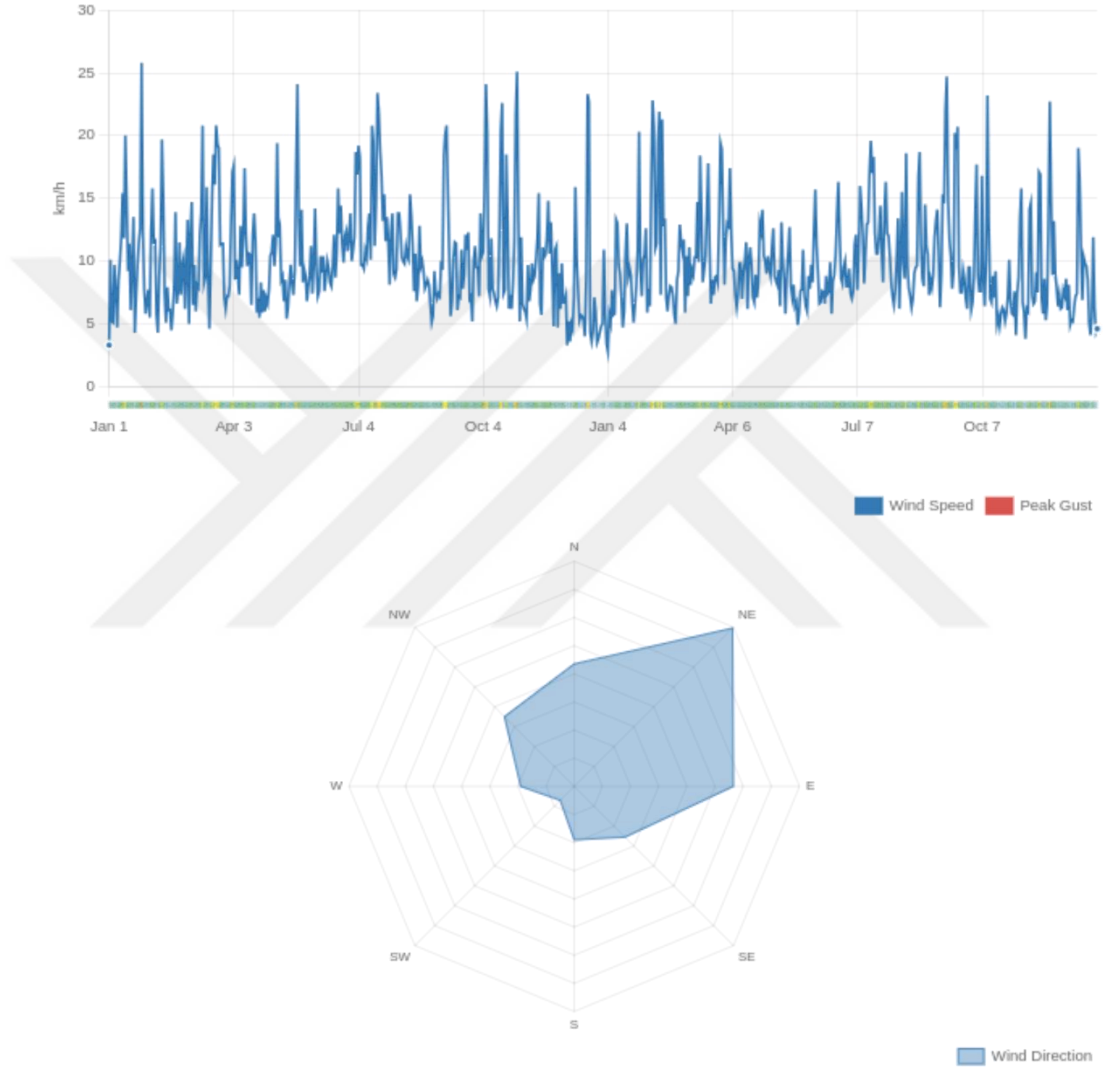
yüksek ortalama sıcaklıklar Temmuz ve Ağustos aylarında 31,6°C ve en düşük sıcaklık Ocak ayı içerisinde -1°C olarak ölçülmüştür (Şekil 2. 4-a).

Çalışma bölgesine ait yağış verilerine bakıldığında, en düşük yağış miktarının sırasıyla Ağustos (ortalama 11 mm) ve Temmuz (ortalama 16,4 mm) aylarında olduğu görülmektedir. En yüksek yağış miktarı Aralık ayında ortalama 72,5 mm olarak tespit edilmiştir. Yağış oranları genel olarak Aralık-Nisan ayları arasında yüksek trend izlerken, Mayıs-Eylül arasında düşüş trendini izlemektedir (Şekil 2. 4-b).



Şekil 2. 4: a) Çalışma bölgesine ait aylık ortalama sıcaklık verileri, b) Çalışma bölgesine ait aylık ortalama yağış verileri. Grafikler Meteostat uygulamasından temin edilmiştir.

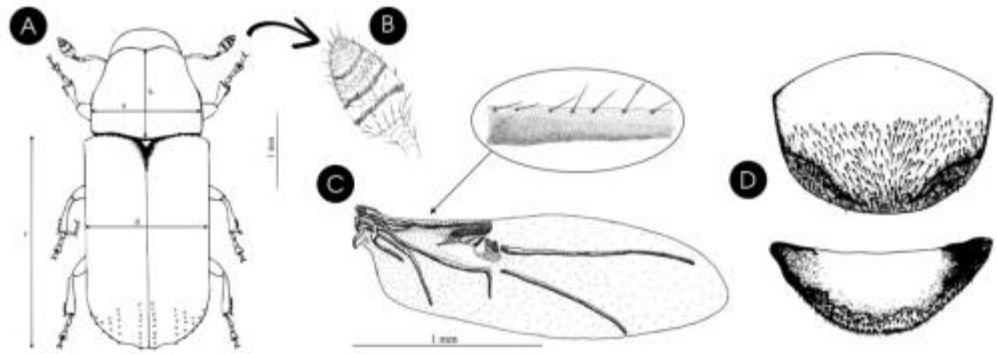
Ortalama rüzgar hızı bölgede 12-14 km/s arasında değişebilmektedir. En düşük rüzgar hızı 03.01.2023 tarihinde 3,4 km/s olarak ölçülürken, en yüksek rüzgar hızı 25.01.2022'de 25,1 km/s olarak ölçülmüştür. Bölgenin hakim rüzgar yönü Kuzey-Doğu ekseninde Poyraz şeklindedir (Şekil 2. 5).



Şekil 2. 5: Çalışma bölgesine ait aylık ortalama rüzgar hızı verileri ve hakim rüzgar yönü.

## 2.2 *Tomicus destruens*'in Morfolojik Teşhisi

Çalışmanın yaygın etkisi ve katma değeri göz önünde bulundurularak, ileri aşamada yapılması planlanan filocoğrafik çalışmalara bir altlık oluşturması amacıyla tespit edilen *T. destruens* bireylerine morfolojik teşhis yapılmıştır. Fungus izolasyonu için kullanılacak bireyler (n=20) izolasyon sonrasında morfolojik teşhis için kullanılmıştır. Teşhis ve ölçümlerde stereo (Olympus CX-51 ve U-TV0.5XC-3 entegre kamera) ve binoküler mikroskop (Olympus CX22) kullanılmıştır. Morfolojik karakterler açısından *T. destruens* için belli bazı karakterler ön plana çıkmaktadır. Bunlar, elitra rengi, anten kulübü rengi, anten kulübü setasyon formasyonu, elitral intersetalar arası seta uzunlukları ve dağılımları, elitral eğim boyunca deliklerin dağılımı, elitral eğim yapısı, kostal damarın setasyonu, vücut oranları gibi özelliklerdir (Şekil 2. 6). Morfo karakterlerin belirlenmesinde Faccoli (2006)'dan yararlanılmıştır.



Şekil 2. 6: A) *Tomicus destruens* vücut ölçüleri: a – pronotumun posterior kısmının eni; b – pronotum uzunluğu; c – elitra uzunluğu, d – elitra eni, B) Antennal kulüp, C) Zar kanat yapısı ve setasyonu, D) erkek tergit (üst), dişi tergit (alt). Çizimler vektörel formatta Faccoli (2006)'dan değiştirilmiştir.

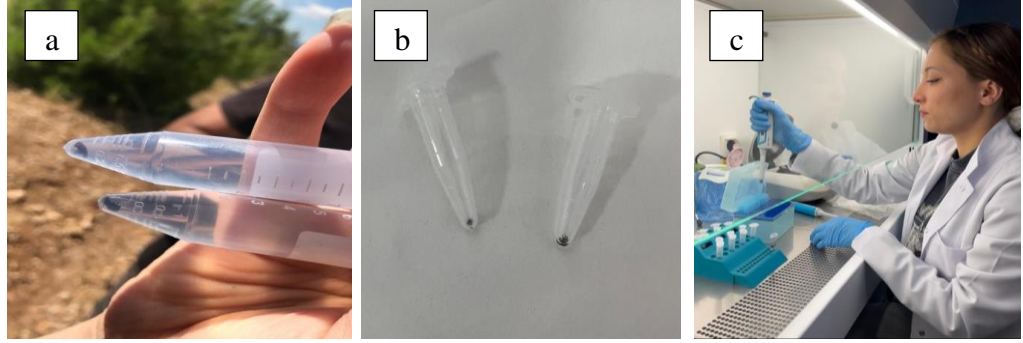
### 2.3 *Tomicus destruens*'in Moleküler Teşhisi

Çalışma kapsamında *T. destruens* örneklerinin toplanması, muhafaza edilmesi ve DNA izolasyonu aşamaları detaylandırılmıştır. Farklı ağaçlardan toplanan böcek örnekleri (n=5) steril falkon tüplere alınarak izopropil alkol (%99,5) içerisinde fikse edilmiştir. Örnekler -20°C derin dondurucu içerisinde Pamukkale Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Hidrobiyoloji Laboratuvarında muhafaza edilmiştir. İzolasyon aşamasında, örnekler oda sıcaklığında bekletilerek işleme hazır hale getirilmiştir. DNA izolasyonu (Roche, Almanya) kitine ait protokole göre gerçekleştirilmiş, ancak üreticinin protokolünde bazı değişiklikler yapılmıştır. İzolasyon işlemlerinde kullanılan yöntemler aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır (Şekil 2. 7). Böcek örneklerinin hazırlanması süreci Pamukkale Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Fungal Biyoteknoloji Laboratuvarında steril oda içerisinde gerçekleştirilmiştir.

#### Böcek Örneklerinin Hazırlanması:

- Böceklerin vücut kısımları ayrılarak -20 °C'de yaklaşık 1 gün bekletilmiştir.
- Eppendorf tüpüne 25-50 mg numune eklenmiştir.
- Tüpe 200 µl Lysis Buffer eklenmiştir.
- Tüpe 40 µl Proteinaz-K eklenerek, 55 °C'de 1 saat bekletilmiştir.
- 200 µl Binding Buffer eklenerek, 70 °C'de 10 dakika bekletilmiştir.
- 100 µl İzopropanol eklenerek yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- Santrifüjlemeden sonra filtre tüpünü yeni bir koleksiyon tüpüne aktararak, diğer kısımatılmıştır.
- 500 µl İnhibitor Removal Buffer eklenerek, 9000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
- Tekrar filtre tüpü çıkartılarak diğer kısım atılmıştır.
- 500 µl Wash Buffer eklendikten sonra, 9000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenerek, bu adım tekrarlanmıştır.
- 10 saniye full speed'de santrifüjlenmiştir.
- Koleksiyon tüpü atılmıştır.

Santrifüj tüpüne filtre tüpünü koyduktan sonra, üzerine 100-50 µl Elution Buffer eklenmiştir. Bu yöntemler, DNA izolasyonunun verimliliğini artırmak ve kontaminasyonu minimize etmek amacıyla optimize edilmiştir. Elde edilen DNA, moleküler analizlerde kullanılmak üzere güvenli bir şekilde saklanmıştır.



Şekil 2. 7: *Tomicus destruens* örneklerinin moleküler karakterizasyonu a) *Tomicus destruens* örneklerinin izopropil alkol içinde sabitlenmesi, b) örneklerden etil alkolün uzaklaştırılması, c) DNA izolasyonlarının gerçekleştirilmesi

### 2.3.1 *Tomicus destruens* Örneklerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Mitokondriyal DNA'nın (mtDNA) sitokrom oksidaz I (COI) geninin kısmi fragmanı, Folmer ve arkadaşları (1994) tarafından tanımlanan evrensel barkod primerleri LCO1490F ve HCO2198R, kullanılarak amplifiye edilmiştir. PZ reaksiyonları, firmanın protokol talimatlarına göre Xpert Fast Hotstart Mastermix (Grisp, Portekiz) ile gerçekleştirilmiştir. Her bir PZR karışımı, 25 µL'lik bir hacim için, 12,5 µL Master Mix (Xpert Fast Hotstart Mastermix, Grisp), 3 µL DNA matriksi, 1 µL ileri primer, 1 µL geri primer ve 25 µL'ye tamamlanacak şekilde distile su içermiştir. Her PZ reaksiyonunda, genomik DNA hariç tüm reaktiflerin eklendiği negatif kontroller kullanılmıştır. PZR, Kyratec PZR Cycler kullanılarak gerçekleştirilmiştir: 95°C'de 3 dakika; ardından beş döngü boyunca 94°C'de 15 saniye, 50°C'de 15 saniye ve 72°C'de 1 dakika; ardından 35 döngü daha ve son olarak 72°C'de 10 dakika ek uzatma şeklindedir. PZR ürünlerinin kalitesi, numunelerin %1,5 agaroz jellerinde ve TBE tamponunda elektroforezlenmesi ve Xpert Green DNA Boyası (Grisp, Portekiz) ile boyanmasıyla incelenmiştir (Tablo 2. 1).

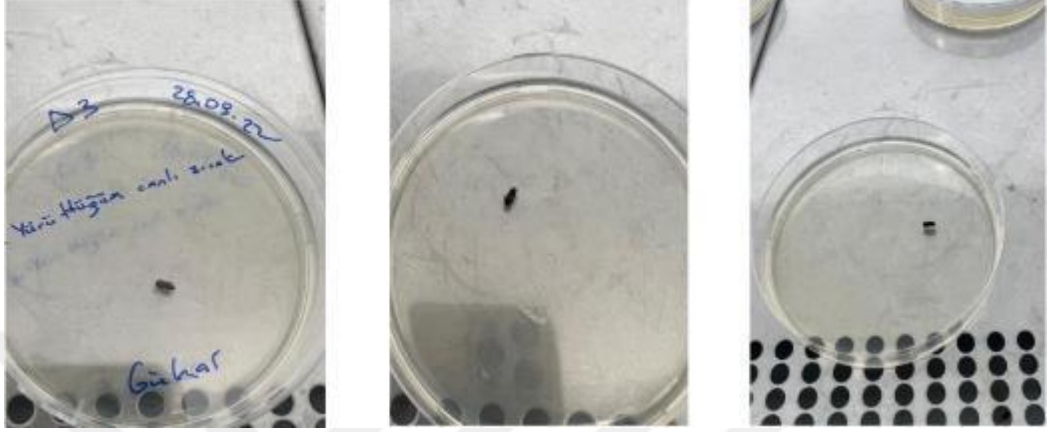
Tablo 2. 1: COI gen bölgesi için kullanılan primer dizileri.

Primer	Yönü	Primer dizisi	Fragment Uzunluğu	Referans
LCO1490F	ileri	5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG3'	653 bp	Folmer ve diğ. (1994)
HCO2198R,	geri	5'TAAACTTCAGGCTGACCAAAAAATCA3'	653 bp	Folmer ve diğ. (1994)

Amplifiye edilen COI gen bölgesi, tür tayini ve filogenetik analizlerde kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir.

#### 2.4 *Tomicus destruens* Örneklerinden Yürütme Yöntemi ile Fungusların İzolasyonu

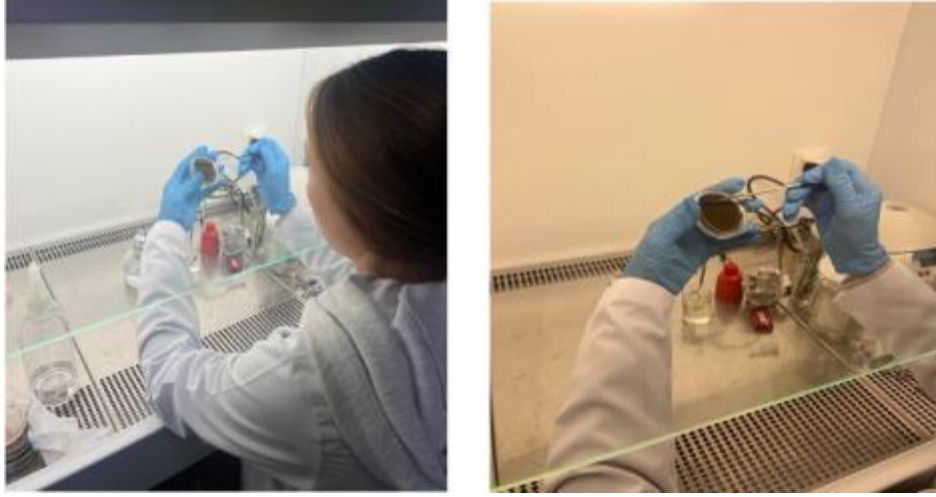
Laboratuvara getirilen böcek örneklerinden fungal izolasyon, Dohet ve diğerleri (2016)'nın kullandığı metod izlenerek gerçekleştirilmiştir. Toplam 20 adet *T. destruens* örneği yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmadan önce, yüzeylerinde bulunan fungusların çoğaltılabilmesi amacıyla PDA (Patates Dekstroz Agar) içeren petri kaplarında 2 saat boyunca yürütülmüştür (Şekil 2. 8). Bu sürede böcek örneklerinin sırtının, antenlerinin besi ortamına temas etmeleri sağlanmıştır. Örnekler 2 saatin sonunda, steril pensler yardımı ile besi ortamından, eppendorf tüplerine alınmış olup, eppendorf tüpler ve petri kapları numaralandırılmış ve bir sonraki aşama için +4 dereceye kaldırılmıştır. Böceklerin yürüdüğü petri kapları parafilmle sarılarak, 10-14 gün boyunca 25-30°C'de karanlık ortamda inkübasyona bırakılmışlardır (Şekil 2. 9). Bu işlemden sonra, petri kapları 24°C'de yaklaşık 10-20 gün boyunca karanlıkta inkübasyona bırakılmış ve günlük kontroller yapılmıştır. Stereomikroskop altında incelenen fungal koloniler, üzerine selofan yerleştirilmiş PDA besi ortamı içeren petri kaplarına aktarılmış ve gelişmeye bırakılmıştır.



Şekil 2. 8: *Tomicus destruens* örneklerinin PDA (Patates Dekstroz Agar) içeren petri kaplarında yürütülmesi süreci.



Şekil 2. 9: *Tomicus destruens* örneklerinin yürütüldüğü petri kaplarının 10-14 gün boyunca 25-30°C’de karanlık ortamda inkübasyonu yapılmıştır.



Şekil 2. 10: Gelişen fungal kolonilerin selofan üzerinden kazınması süreci.

#### 2.4.1 *Tomicus destruens* Örneklerinden Ezme Yöntemi ile Fungusların İzolasyonu

Yürütülen 20 adet *T. destruens* örneği yürütme işlemi tamamlandıktan sonra ezme işlemine tabi tutulmuştur. Laboratuvara getirilen böcek örneklerinin besi ortamında yürütülmüş olan vücut içi funguslarının belirlenebilmesi için Dohet ve diğerleri (2016)'nin kullandığı metot izlenmiştir. Böceklerin her biri ayrı ayrı %70'lik etil alkol ile yüzey sterilizasyonunu gerçekleştirilmiştir. Sonrasında her bir böcek steril distile su ile durulanmıştır. Distile suya tabi tutulan böceklerin her biri yeni ve steril olan eppendorf tüplerine alınmış 500µl fosfat buffer solüsyonu beraberliğinde mikropestil yardımı ile manuel olarak ezilmiştir. Süpernatant kısımları da hızlıca 10mM'lık MgSO<sub>4</sub> (Carlo Erba: 1460012) ile 8 kat seyreltilmiştir (Dohet ve diğ. 2016) (Şekil 2. 11). Seyreltilmiş çözelti, önceden hazırlanmış olan Streptomisin (aminoglikozid sınıfından bir antibiyotik) içeren PDA besi ortamına dökülmüştür. Ezme işlemine (Dohet ve diğ. 2016)ait protokol aşağıda belirtildiği şekildedir:

**Yüzey Sterilizasyonu:** %70'lik etil alkol içeren 1000 µl tüplere böcek örnekleri yerleştirilmiş ve 30 dakika boyunca etanol içerisinde bekletilmiştir.

**Distile Su ile Yıkama:** Örnekler, diğer eppendorf tüplerine aktarılmış ve 500 µl distile su ilave edilerek iyice çalkalanmış, yüzeylerin temizlenmesi ve etanolden arındırılması sağlanmıştır.

**Fosfat Buffer Solüsyonu:** Temiz eppendorf tüplerine 500 µl fosfat buffer solüsyonu eklenmiş ve steril çubuk yardımıyla böcek örnekleri iyice ezilmiştir.

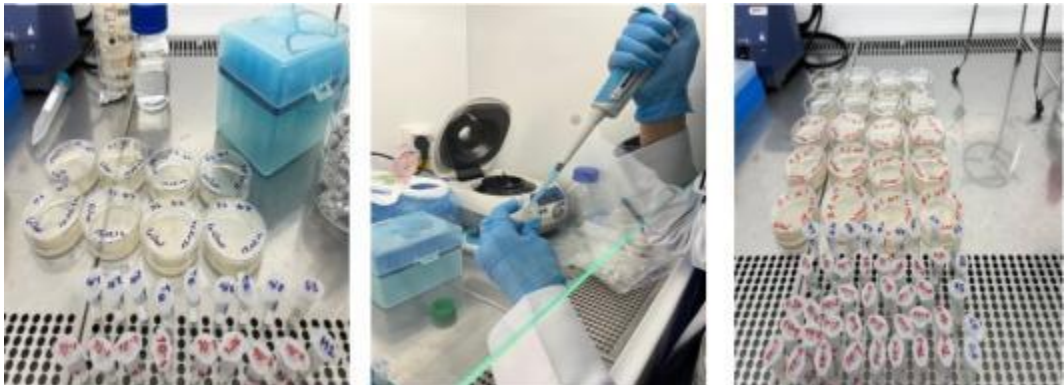
**MgSO<sub>4</sub> Eklenmesi:** Ardından 900 µl MgSO<sub>4</sub> temiz eppendorf tüplerine ilave edilmiştir. Toplamda 5 böcek örneği için 40 adet eppendorf tüp hazırlanarak, her böcek için 8 tüp kullanılmıştır.

**Seyreltme İşlemi:** Hazırlanan örnekten 100 µl alınarak MgSO<sub>4</sub> içeren eppendorf tüpüne ilave edilmiştir (Tüp kapağına 10<sup>-1</sup> olarak not alınmıştır). Diğer eppendorf tüpleri ise 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-8</sup> şeklinde numaralandırılmıştır.

**Homojenize Ekme:** Seyreltilmiş tüplerden 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-8</sup> sıralama şeklinde notlar alınarak 100 µl alınıp temiz besi ortamına homojenize bir şekilde damlatılmıştır.

**İnkübasyon:** Petrilerin kapakları açık bırakılarak hücre kabininde 1 gün boyunca bekletilmiştir.

Bu işlemten sonra, petri kapları 24°C'de yaklaşık 10-20 gün boyunca karanlıkta inkübasyona bırakılmış ve günlük kontroller yapılmıştır. Stereomikroskop altında incelenen fungal koloniler, üzerine selofan yerleştirilmiş PDA besi ortamı içeren petri kaplarına aktarılmış ve gelişmeye bırakılmıştır.



Şekil 2. 11: *Tomicus destruens* örneklerini ezme yönteminde örneklerin seyreltilmesi.

## 2.5 Fungal İzolatların Morfolojik Olarak Gruplandırılması

Elde edilen tüm fungal izolatlar koloni rengi, koloni şekli, koloni yapısı, koloni kenar şekli ve rengi gibi koloni morfolojik özellikleri kullanılarak gruplandırılmıştır. Gruplama öncelikle yürüyen ve ezilmiş böcekler içinde ayrı ayrı yapılmıştır. Daha sonra aynı morfolojik özelliklere sahip gruplar birleştirilmiştir. İzolatlar Pamukkale Üniversitesi Fungal Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda saklanmaktadır.

## 2.6 Fungusların Moleküler Karakterizasyonu

Elde edilen izolatlar morfolojik karakterlerine göre gruplandırılarak, her bir morfolojik gruptan 1 adet temsilci izolatamoleküler karakterizasyon işlemi yapılmıştır. Moleküler teşhisler, fungusların teşhisinde barkod olarak kabul edilen ITS gen bölgesinin dizilemesi ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için ilk olarak fungusdan DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve ardından izolatlara ait genomik DNAların ITS bölgesi PZR ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan bölgeler dizilenmiştir. Elde edilen diziler gen bankalarında bulunan diğer diziler ile karşılaştırılmıştır. Bu aşamalarda kullanılmış yöntemler aşağıdaki kısımlarda detaylı olarak verilmiştir.

### 2.6.1 Fungusların DNA izolasyonu

İzole edilen fungal izolatlar selofan membran bulunan PDA (%2) besi ortamında 24°C' de inkube edilmiştir. Bu sürenin sonunda besi ortamında gelişen miseller selofan membran üzerinden kazınarakDNA izolasyonu aşamasına geçilmiştir. Örneklerin DNA izolasyonunda Fungal DNA izolasyon kiti (ROSCHE, İsviçre) kullanılmıştır ve izolasyonda kite ait prosedür izlenmiştir.

DNA izolasyonunda izlenen aşamalar:

-Besi ortamında gelişen miseller selofan membran üzerinden kazınarak yaklaşık her örnekten 25-50 mg eppendorf tüplerinin içine aktarılmıştır.

- Üzerine 200 µl Lysis buffer eklenerek parçalanması sağlanmıştır.
  - Ardından 5 dk 6500 rpm de santrifüj yapılarak dokuların tüpün altına çökmesi sağlanmıştır.
  - Tüpteki süpernatant kısmı farklı eppendorf tüpüne aktarılmıştır.
  - Üzerine 200 µl Binding buffer eklenerek ardından 40 µl Proteinase K eklenmiştir ve vortekslenmiştir.
  - 10 dk. 70 °C inkübasyon banyosuna bırakılmıştır.
  - 100 µl Isopropanol eklenerek vortekslenmiştir.
  - Filtre tüpleri koleksiyon tüplerine bırakılarak eppendorf içerisindeki tüm ürünü pipet yardımıyla filtre tüpüne aktarılmıştır.
  - 1 dk boyunca 9500 rpm de santrifüjlenmiştir.
  - Santrifüjden sonra altta kalan kısım ve koleksiyon tüpü atılmıştır ve filtre tüpünü yeni koleksiyon tüpüne aktarılmıştır.
  - Ardından 500 µl Inhibitor removal eklenerek 9500 rpm de 1 dk. santrifüje bırakılmıştır.
  - Filtreyi yeni koleksiyon tüpüne alınarak üzerine 500 µl yıkama tampon (wash buffer) eklenmiştir.
  - 9500 rpm de 1 dk boyunca santrifüjlenmiştir.
  - Koleksiyon tüpü atılarak filtreyi yeni bir koleksiyon tüpüne aktarılmıştır.
  - Bu aşamada 12-13-14 basamaklar tekrarlanmıştır ve iyice yıkanarak temizlenmesi sağlanmıştır.
  - Ardından 10 sn son hızda (13800 rpm) santrifüjlenmiştir.
  - Koleksiyon tüpü atılarak santrifüj tüpüne filtre tüpünü koyulmuştur ve üzerine yaklaşık 50~100 µl elusyon tampon (elution buffer) eklenmiştir.
  - 1 dk boyunca 9500 rpm de santrifüjlenmiştir.
- Nanodrop ölçümleri esnasında elusyon tampon kullanılmıştır. İzole edilen fungal genomik DNAlar -20 °C'de muhafaza edilerek PZR işlemine geçilmiştir.

## 2.6.2 Fungusların Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PZ Reaksiyonlarında, rDNA'nın ITS gen bölgelerinin dizi bilgisi kullanılmıştır. ITS bölgesinin çoğaltılmasında ITS1-ITS4 primer çiftinden (Tablo 2. 2) yararlanılmıştır (White ve diğ. 1990).

Tablo 2. 2: ITS gen bölgesi için kullanılan primer dizileri.

Primer	Yönü	Primer dizileri (5'-3')	Hedef gen bölgesi	Kaynak
ITS1	İleri	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS	White ve diğ. 1990
ITS4	Geri	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS	White ve diğ. 1990

PZ reaksiyonları Xpert Fast Hotstart Mastermix (Grisp, Portekiz) ile gerçekleştirilmiştir. PZ reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları Tablo 2. 3'te sunulmuştur.

Tablo 2. 3: Polimeraz Zincir Reaksiyonlarında kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları.

Bileşen	Stok Kons. (25 µl)
Xpert Fast Hotstart Mastermix (2x)	12,5 µl
Forward primer (5 pmol/µl )	2 µl
Reverse Primer (5 pmol/µl )	2 µl
Template DNA	0,25-10 µl
PZR-grade water	25 µl'ye tamamlanır

Konvansiyonel PZR için kullanılan kit protokolü kullanılarak PZR cihazında protokol (Tablo 2. 4) oluşturulmuştur. PZR için reaksiyon karışım işlemi tamamlandıktan sonra PZR tüpleri konvansiyonel PZR cihazının kuyucuklarına yerleştirilerek PZR protokolü uygulanmıştır.

Tablo 2. 4: Polimeraz Zincir Reaksiyonlarına ait sıcaklık ve döngü koşulları.

Safha	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95	3 dk	1
Denatürasyon	95	15 sn	40
Bağlanma	55	15 sn	
Uzama	72	15 sn	
Son uzama	72	3 dk	1

### 2.6.3 Agaroz Jel Elektrofrez İşlemi

Agaroz jel elektrofrez işlemi ile doğrulanması için %1'lik agaroz jel kullanılmıştır. Agaroz jel hazırlanırken 1 g agaroz (BIOMAX) tartılarak temiz bir erlen içerisinde konulduktan sonra üzerine 100 mL 1xTris Borate EDTA buffer (TBE) tamponu eklenmiştir. Daha sonra, agarozun TBE tamponu içerisinde homojen şekilde erimesi için mikrodalga fırında (600 Watt) polimer tamamen eriyinceye kadar kaynatılmıştır. Hazırlanan jel oda sıcaklığına geldikten sonra içine 3 µL Xpert Green DNA Stain (GRISP, Portekiz) eklenmiştir. Dökülen jelin oda sıcaklığında donması sağlanmıştır. Ardından, daha önceden hazırlanan 1xTBE tamponu agaroz jel yüzeyinin üzerini kaplayacak şekilde ilave edilmiştir.

Elde edilen PZR ürünleri için, jeldeki her bir kuyucuğa 5 µL DNA, 1 µL GRS DNA Loading dye karıştırılarak yüklenmiştir. DNA'nın boyutlandırmasını yapabilmek amacıyla belirteç olarak 100 bp'lık GRS DNA Ladder (GRISP, Portekiz) kullanılmıştır. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra güç kaynağına bağlanan elektrofrez tankına 120 V güç uygulanarak, agaroz jele yüklenen örnekler 45 dakika boyunca karanlıkta yürütülmüştür. Süre sonunda agaroz jel görüntüleme sistemine dikkatli bir şekilde taşınmıştır. Jel görüntüleme sisteminde elektrofrez işlemi süresince yürümüş olan DNA ladder ve karşılık gelen PZR ürün bantları karşılaştırılarak doğrulama yapılmıştır.

## 2.7 DNA Dizileme Çalışmaları ve Tür Tayini

PZ reaksiyonları ile elde edilen amplifikasyon ürünleri, hizmet alımı ile Ankara'da bulunan BMLabosis'e dizileme için gönderilmiştir. PZR ürünlerinden elde edilen nükleotid dizileri, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) bünyesindeki GenBank veri tabanında titizlikle araştırılmıştır. Tanımlanan dizilerin hizalanması ve NCBI veri tabanından alınan seçilmiş dış grup dizileri, BioEdit sürüm 7.2.6 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Nükleotid dizilerinin benzerlik araması, NCBI-BLASTn (Temel Yerel Hizalama Arama Aracı) kullanılarak yapılmış ve %98'den fazla benzerlik gösteren diziler aynı türe ait olarak kabul edilmiştir.

## 2.8 Moleküler Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan laboratuvar ekipmanlarının listesi ve her birinin işlevi aşağıda açıklanmıştır:

**Agaroz Jel Elektroforez Aparatı (Thermo, EC320):** DNA, RNA veya protein örneklerinin moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlayan bir cihazdır. Bu cihaz, nükleik asitlerin elektroforetik ayrımı için kullanılmıştır.

**Etüv (Wiseven, Fuzzy Control System):** Mikrobiyolojik inkübasyonlar için kullanılmıştır. Bu cihaz, belirli sıcaklık ve nem koşullarını sağlayarak fungal kültürlerin optimal büyümesini sağlamaktadır.

**Su Banyosu (Nükleon Laboratory Equipment):** Enzimatik reaksiyonlar ve diğer biyokimyasal işlemler için sabit sıcaklıkta su banyosu sağlamaktadır. DNA ekstraksiyonu ve enzimatik sindirim işlemlerinde kullanılmıştır.

**Otoklav (Nüve, NC 40M):** Laboratuvar malzemelerinin ve besi ortamlarının sterilizasyonu için kullanılmıştır. Yüksek basınç ve sıcaklık altında çalışarak kontaminasyon riskini minimize etmiştir.

**PZR Cihazı (Gradient PCR, SuperCycler PC1034, SC-300G):** Polimeraz Zincir Reaksiyonu için kullanılmıştır. DNA amplifikasyonu için gerekli sıcaklık döngülerini sağlar ve yüksek verimlilikte çoğaltma işlemleri gerçekleştirir.

**Güç Kaynağı (EC250-90):** Elektroforez işlemleri sırasında agaroz jel elektroforez aparatına gerekli elektriği sağlayan cihazdır. DNA'nın jel boyunca hareket etmesini sağlar.

**Işık Mikroskobu (Olympus, CX21):** Fungusların mikroskopik incelenmesi için kullanılmıştır. Bu cihaz, örneklerin morfolojik analizlerini yapmayı mümkün kılar.

**Mikrobiyolojik Güvenlik Kabini (Nüve, Class II, MN 120):** Çalışmaların steril koşullarda gerçekleştirilmesini sağlar. Kontaminasyon riskini en aza indirerek güvenli çalışma ortamı sunar.

**Santrifüj (Alfagen, 15K):** Hücrelerin ve diğer partiküllerin ayrılması için yüksek hızlı santrifüj işlemlerinde kullanılmıştır. Örneklerin farklı fazlara ayrılmasını sağlar.

**Vorteks (Dragon Lab, MX-F):** Çözeltilerin homojen bir şekilde karıştırılması için kullanılmıştır. Numunelerin iyice karışmasını sağlar ve reaksiyon verimliliğini artırır.

**Hassas Terazı (Precisa, XB 220A ve Mettler Toledo, PB 602-L):** Kimyasal maddelerin hassas tartım işlemlerinde kullanılmıştır. Yüksek doğrulukta tartım sağlar.

**Jel Görüntüleme Cihazı (Cleaver Scientific, gelLite):** Elektroforez sonrası DNA bantlarının görüntülenmesi ve analiz edilmesi için kullanılmıştır. Bu cihaz, jel üzerinde oluşan bantları net bir şekilde görmeyi sağlar.

**Microplate Reader (Epoch, Biotek):** Çeşitli biyokimyasal analizlerin, özellikle absorbans ölçümlerinin yapıldığı cihazdır. ELISA (Enzim Bağlantılı İmmünosorbent) testleri ve diğer enzimatik aktiviteler için kullanılmıştır.

## 2.9 Shannon-Weiner Çeşitlilik İndeksi ve Frekansların Belirlenmesi

*T. destruens* ve simbiyotik ilişkili fungus türlerini anlamak amacıyla, belirli bir orman ekosisteminde bulunan 20 ağaçtan (n=20) toplanan böcek örnekleri üzerinde çalışma yapılmıştır. Ağaçlara ait dizim şekli ve kodlama Şekil 2. 12’de verilmiştir. Bu çalışmada, böceklerin taşıdığı farklı fungus türlerinin çeşitliliğini değerlendirmek için Shannon-Weiner çeşitlilik indeksi (H’) (Shannon 1948) uygulanmıştır. Shannon-Weiner çeşitlilik indeksi, bir ekosistemdeki tür zenginliğini ve bireylerin bu türler arasındaki dağılımını ölçmek için kullanılan bir biyolojik çeşitlilik ölçütüdür. Bu indeks, hem tür sayısını (zenginlik) hem de türlerin bolluğunu (eşitlik) dikkate alır ve yüksek bir H’ değeri, türlerin daha eşit dağıldığı ve daha çeşitli bir topluluğu ifade etmektedir.

x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	A-1	A-2	A-3	A-4
x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5
x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
x	x	x	x	x	x	x	x	x	D-1	D-2	D-3	D-4	D-5	D-6	D-7
x	x	x	x	x	x	x	x	E-1	E-2	E-3	E-4	E-5	E-6	E-7	E-8
x	x	x	x	x	x	x	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5	F-6	F-7	F-8	F-9
x	x	x	x	x	x	G-1	G-2	G-3	G-4	G-5	G-6	G-7	G-8	G-9	G-10
x	x	x	x	x	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-9	H-10	H-11
x	x	x	x	I-1	I-2	I-3	I-4	I-5	I-6	I-7	I-8	I-9	I-10	I-11	I-12
x	x	x	J-1	J-2	J-3	J-4	J-5	J-6	J-7	J-8	J-9	J-10	J-11	J-12	J-13
x	x	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	K-6	K-7	K-8	K-9	K-10	K-11	K-12	K-13	K-14
x	L-1	L-2	L-3	L-4	L-5	L-6	L-7	L-8	L-9	L-10	L-11	L-12	L-13	L-14	L-15

Şekil 2. 12: *T. destruens* örneklerinin tespit edildiği klonlar. Tespit edilenler koyu yeşil ile ifade edilmiştir.

*T. destruens* ile simbiyotik ilişki içinde bulunan fungus türlerinin çeşitliliğini ve frekansını belirlemek amacıyla, çalışma alanında 20 farklı ağaçtan (n=20) toplanan böcekler laboratuvara getirilmiştir ve her bir böcekten izole edilen fungus türleri kaydedilmiştir. Toplanan veriler, her bir konakta bulunan

fungus türlerinin varlığını belirten bir ikili (binary) veri tablosuna dönüştürülmüştür. Veri tablosunda yer alan her bir fungus türünün frekansı, tüm konaklar üzerindeki toplam varlık sayısı olarak hesaplanmıştır. Bu işlem, her bir fungus türünün çalışma alanında ne kadar yaygın olduğunu belirlemek için kullanılmıştır.

## 2.10 İzolatların Seyreltme Oranları

Toplanan böcekler üzerindeki fungus türlerinin dağılımı ve seyreltme derecelerine göre varlık/yokluk durumunu incelenmiştir. Her bir fungus türü için farklı seyreltme derecelerinde gözlemlenen frekanslar kaydedilmiştir. Bu veriler, R programlama dili kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen izolatlar  $10^{-2} - 10^{-8}$  aralığı oranlarında seyreltilmiştir.

## 2.11 Ezme-Yürütme Etkisi

Ezme ve yürütme yöntemleriyle elde edilen fungus izolatları arasındaki ilişki varyans analizi ile belirlenmiştir. Buna göre, varyans analizini gerçekleştirmek için ilk olarak verilerin normallik ve varyans homojenliğini test edilmiştir. Bu testlerin sonucuna göre parametrik veya non-parametrik bir test tercih edilmiştir. Devamında, uygun varyans analizi ve post-hoc testi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla yazılan R kodları aşağıdaki algoritmayı takip etmiştir:

- Verilerin normalliği ve varyans homojenliğinin test edilmesi.
- Test sonuçlarına göre, veriler normallik ve varyans homojenliği sağlıyorsa parametrik test (Two-way ANOVA) uygulanır, değilse non-parametrik test (Kruskal-Wallis test) uygulanır.
- Uygun post-hoc testini (Tukey HSD veya Pairwise Wilcoxon Test) gerçekleştirilir.
- Sonuçlar görselleştirilir.

### 3 BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, Denizli Orman İşletme Müdürlüğü'ne bağlı Çivril Orman İşletme Şefliği sınırlarında bulunan 216 no'lu Kızılcım Tohum Bahçesi'nde yayılış gösteren *Tomicus destruens* (Woll., 1865) türünün varlığı ve bu böceğin fungal topluluklarla olan ilişkisi incelenmiştir. 216 no'lu Kızılcım tohum bahçesi, Aralık 2015 tarihinde kurulmuş olup, orijinleri Acıpayam, Bozdağ, Kelekçi, Fethiye ve Üzümlü'den gelmektedir. Bahçede toplam 47 klon bulunmaktadır ve başlangıç dikim adedi 1768'dir. Araştırma süresince, farklı mevsimlerde ve çeşitli orman alanlarında yapılan gözlemler ve toplanan örnekler değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, *T. destruens*'in tohum bahçesindeki yayılışı ve böceğin konakçı ağaçlarla ve bu ağaçlarda yaşayan fungal topluluklarla olan etkileşimleri hakkında bilgiler sunmuştur.

#### 3.1 *Tomicus destruens*'in Yayılış Durumu

Çalışmanın bulguları, *T. destruens*'in biyolojik evrelerini ve mevsimsel aktivitelerini anlamada önemli ipuçları sağlamaktadır. Fungal topluluklarla olan ilişkisi ise, böceğin ekosistem üzerindeki etkilerini ve olası kontrol yöntemlerini belirlemede kritik öneme sahiptir. Elde edilen bulgular, orman zararlıları ile mücadele ve orman sağlığının korunması açısından değerli bilgiler sunmaktadır. Çalışmalar sırasında, *T. destruens*'in yılda bir nesil verdiği, dişilerin Şubat ayının başında yumurta bırakmaya başladığı ve genç erginlerin Haziran ayının ikinci yarısından itibaren ortaya çıktıkları tespit edilmiştir. Sarıkaya ve Avcı (2010)'nın yapmış oldukları çalışmada *T. destruens*'in uçuş döneminin yükseltiye bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir. Böceğin uçuş dönemi, 0 ve 300 metre yükseklikte Kasım ayının başında, 300-600 metre arasında Aralık ayının ikinci yarısında ve 600 metre ve üzeri yüksekliklerde Şubat ayının başında başlamaktadır. Düşük rakımlarda (0-300 m), böcekler Kasım ayının ilk haftasında yumurta bırakmaya başlamış ve genç erginler Nisan ayının ortasında gözlemlenmiştir. Orta yüksekliklerde (300-600 m), ilk yumurtalar Aralık ayının ikinci yarısında gözlemlenmiş ve böcek Mayıs ayının başında genç ergin aşamasına ulaşmıştır. Daha yüksek rakımlarda (600 m ve üzeri), Şubat ayının

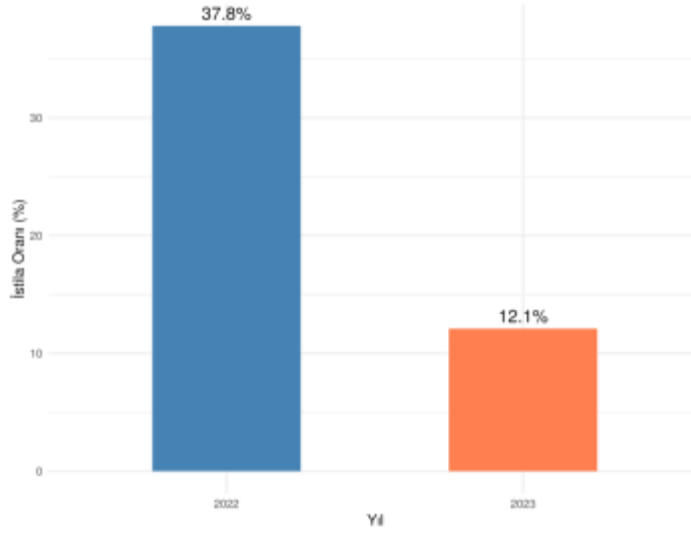
başında yumurta bırakmaya başladığı ve Haziran ayı ortalarında uçuşa dönemine geçtikleri belirtilmiştir. Buna göre mevsimsel geçişlerin yumurtlama ve uçuş dönemleri üzerinde etkisi olduğu söylenebilir.

*T. destruens* erginleri sonbaharın sonu, kış ve ilkbahar boyunca aktif olmuştur. Ocak ve Aralık aylarında ortalama sıcaklıklar sırasıyla 5°C ve 7°C, Şubat ve Mart aylarında ise 10°C ve 12°C olmasına rağmen, erginlerin aktivitesi tamamen ortadan kalkmamıştır. Çiftleşmenin ardından, dişi bireyler, konakçı ağacın (*P. brutia*) liflerine paralel olarak bir galeriyi inşa etmiş ve ana tünelin yanlarında yumurta nişleri oluşturmaktadır. İlk yumurtlama Şubat ayının başında tespit edilmiş ve genç erginler bir sonraki yılın Haziran ayının ortalarında ortaya çıkmıştır. Dişiler, ömürleri boyunca birden fazla kez yumurta bırakabilmekte ve bu durum kardeş nesillerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Yumurta galerileri genellikle 3 cm'den uzun olup, bazen 10 cm'yi bulmuştur. 216 no'lu Kızılçam Tohum Bahçesi'ndeki Kızılçam popülasyonunun sürekli takip altında olması, bireylerin genç olması ve diğer coğrafi unsurlar sebebi ile nispeten korunaklı durumdadır. Bu sebeple ağaçlarda istilalar mevcut olsa da ağaçlar üzerinde yoğun bir istila durumu gözlemlenmemiştir. Hatta iki yıllık gözlem sürecinde ilk örneklemelere ait 2022 yılında istilalı ağaç sayısı %30 üzerinde iken, bu durumun takip eden yıl içerisinde %12'lere gerilediği gözlemlenmiştir. Ayrıca bu ağaçlarda başka bir istila durumu söz konusu değildir (örn; Çam kese böceği vb.). Sarıkaya ve Avcı (2010)'nın yapmış oldukları çalışmada *T. destruens*'in *Thaumetopoea wilkinsoni* Tams, 1926 gibi biyotik faktörlerden kaynaklanan stres altındaki ağaçlara, kuraklık, kötü yetişme koşulları ve benzeri faktörler nedeniyle daha fazla zarar verebildiği gözlemlenmiştir. Benzer şekilde Sauvard (1989) ve Amezaga ve Garbisu (2000) çalışmalarında bir ağaçtaki saldırı yoğunluğu yüksek olduğunda, her dişi için mevcut olan sınırlı subkortikal alan nedeniyle galerilerin kısalma eğilimi gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu koşullar altında, dişiler genellikle ilk konakçı ağacını terk ederek yumurtlamayı tamamlamak için daha uygun yerler aramıştır. Saldırı yoğunluğu düşük olduğunda ise, dişiler konakçı ağacını terk etmemiş ve galerileri daha uzun olmuştur.

*T. destruens* larvaları, Kasım ayının ortasından bir sonraki yılın Mayıs ayının başına kadar ana galerilere dik olan galerilerde beslenmiştir. Pupalama,

Nisan ayının ilk günlerinde başlamış ve Mayıs ayının ikinci haftasında tamamlanmıştır. Pupal gelişim için en uygun sıcaklıklar 15-20°C arasında olmuştur. Larvaların, ana galeriye dik olan galerilerde Kasım ayının ortasından bir sonraki yılın Mayıs ayının başına kadar beslenmeye devam ettiği gözlemlenmiştir. *T. destruens*'in gelişim evrelerinin kronolojik verileri Tablo 3. 1'de özetlenmiştir.

Arazi çalışmaları sürecinde tohum bahçesinde yer alan kızılçamlar tek tek kontrol edilmiş ve farklı seviyelerde *T. destruens* zararı tespit edilmiştir. 2022 ve 2023 yıllarına ait istila oranlarının karşılaştırılması, zararlı kontrol yöntemlerinin etkinliğini ve yapılan müdahalelerin uzun vadeli etkilerini değerlendirmek açısından kritik öneme sahiptir. Çalışma sürecinde, 2022 yılında %37,8 olan istila oranının 2023 yılında %12,1'e düştüğü gözlemlenmiştir (Şekil 3. 1). Bu belirgin azalma, ağaçların bir önceki yılın istilasına karşı geliştirdikleri adaptif savunma mekanizmalarının bir sonucudur. İstilaya maruz kalan ağaçlar, patojenlere ve zararlılara karşı daha güçlü bir bağışıklık geliştirmiş, böylece daha dirençli hale gelmişlerdir. Bu direnç artışı, böceklerin ve patojenlerin ağaçlar üzerindeki etkisini azaltmış ve istila oranlarının düşmesine katkıda bulunmuştur. Kızılçamların *T. destruens* istilasına karşı yıllık direnç değişimi, ekosistem dinamiklerinin ve biyotik stres faktörlerine karşı adaptasyon süreçlerinin önemli bir göstergesidir. Bir yıl istilaya maruz kalan ağaçlar, takip eden yıl içerisinde daha dirençli hale gelmekte ve bu durum birbirini takip eden yıllarda benzer bir şekilde devam etmektedir. Bu adaptif savunma mekanizmaları, ağaçların genetik çeşitliliği ve ekosistem içerisindeki yerel çevresel koşullar tarafından şekillenmektedir (Boyes ve diğ. 2019).



Şekil 3. 1: *Tomicus destruens* tarafından istila edilen ağaçların 2022 ve 2023 yıllarına göre oranı.

Tablo 3. 1: 216 no'lu Kızılçam Tohum Bahçesi'nde yayılış gösteren *Tomicus destruens* türünün iki yıllık (Ocak 2022-Aralık 2023) çalışma sürecindeki biyolojik döngüsü.

	Aylar (Ocak - Aralık)											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
<b>Ergin</b>												
<b>Yumurta</b>												
<b>Larva</b>												
<b>Nimf</b>												
<b>İmago</b>												

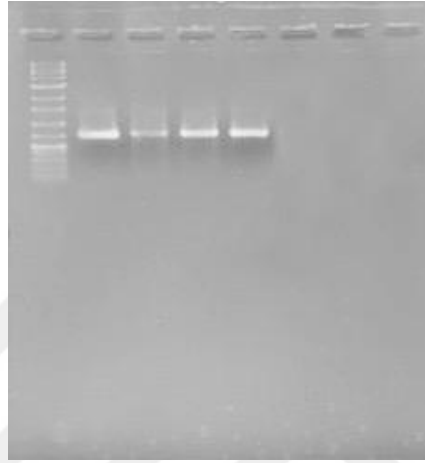
### 3.2 *Tomicus destruens*'in Morfolojik ve Moleküler Teşhisi

Elde edilen *T. destruens* örneklerinin teşhisi; geleneksel (klasik) yöntemlerle morfolojik özelliklerden faydalanılarak (Şekil 3. 2) ve moleküler teknikler kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 3. 2: *Tomicus destruens* ergininin dorsal ve lateral yönlerden görüntüsü.

Morfolojik karakterizasyonları doğrulamak amacıyla 2 temsilci *T. destruens* örneği moleküler karakterizasyon analizlerine tabi tutulmuştur. İzole edilen DNA'ların yoğunluklarının ve saflıklarının belirlenmesi amacıyla plaka okuyucu (BioTek Micro-Volume Plate) kullanılmıştır. *T. destruens* örneklerine ait PZ reaksiyonları LCO1490F ve HCO2198R primer çifti ile Xpert Fast Hotstart Mastermix (Grisp, Portekiz) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örneklere ait elektroforez jel görüntüsü Şekil 3. 3'de verilmiştir.



Şekil 3. 3: LCO1490F ve HCO2198R primer çifti ile gerçekleştirilen PZR amplifikasyon ürünleri.

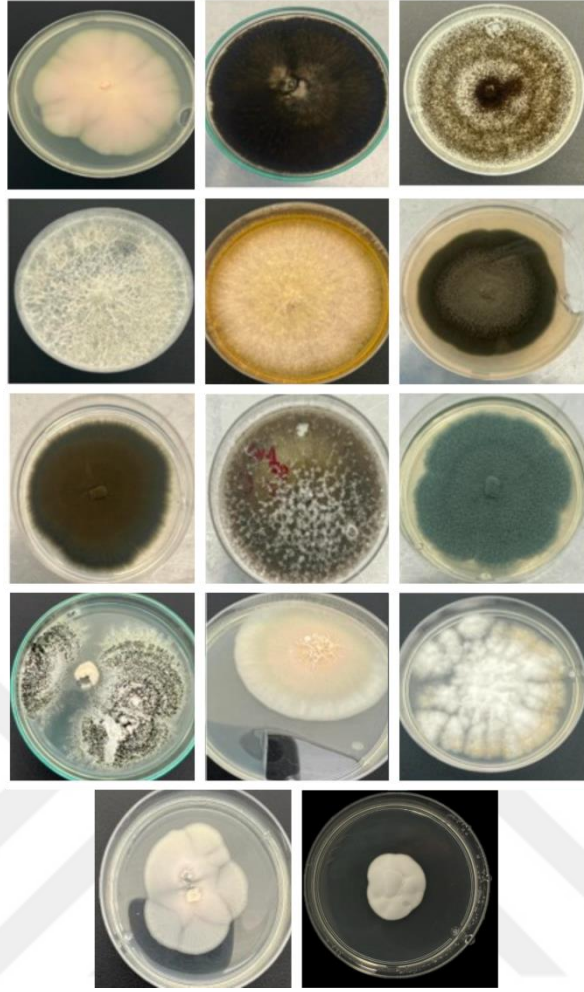
PZR ile elde edilen amplifikasyon ürünleri, hizmet alımı yapılarak Ankara'da bulunan BMLabosis'e (BMLabosis BM Lab. Sist. Ltd. Şti.) dizileme için gönderilmiştir. PZR ürünlerinden elde edilen nükleotid dizileri, NCBI bünyesindeki GenBank veri tabanında araştırılmıştır. Tanımlanan dizilerin hizalanması ve NCBI veri tabanından alınan seçilmiş dış grup dizileri, BioEdit sürüm 7.2.6 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Nükleotid dizilerinin benzerlik araması, NCBI-BLASTn (Temel Yerel Hizalama Arama Aracı) kullanılarak yapılmış ve %98'den fazla benzerlik gösteren diziler aynı türe ait olarak kabul edilmiştir (Tablo 3.3).

Tablo 3. 2: *Tomicus destruens* örneklerinin morfolojik ve moleküler karakterizasyon sonuçları

Örnek Adı	Morfolojik Tanı	Benzerlik gösterdiği referans dizinin;		
		GenBank ID	Benzerlik (%)	GenBank Erişim Kodu
Td1	<i>Tomicus destruens</i>	<i>Tomicus destruens</i>	100%	AY040295.1
Td2	<i>Tomicus destruens</i>	<i>Tomicus destruens</i>	98%	AY040295.1

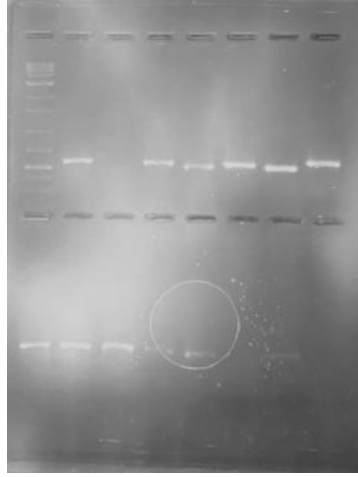
### 3.3 Fungal İzolatların Morfolojik ve Moleküler Teşhisi

Çalışma sürecinde, 20 adet *T. destruens* örneğinden yürütme ve ezme yöntemleri ile toplam 84 adet izolat elde edilmiştir. Elde edilen tüm fungal izolatlar koloni rengi, koloni şekli, koloni yapısı, koloni kenar şekli ve rengi gibi koloni morfolojik özellikleri kullanılarak gruplandırılmıştır. Gruplama öncelikle her bir örnek alan içerisinde yürüyen ve ezilmiş böcekler arasında yapılmış sonrasında ise aynı morfolojik özelliklere sahip gruplar birleştirilmiştir. Bu izolatlar yapılan morfolojik gruplandırmalar sonucunda tümü Ascomycota şubesinden olmak üzere toplam 14 farklı gruba ayrılmıştır (Şekil 3. 4). İzolatlar Pamukkale Üniversitesi, Fungal Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda saklanmaktadır.



Şekil 3. 4: *Tomicus destruens* örneklerinden izole edilen fungus kolonileri.

Her bir gruba ait temsilci izolat içinde selofan membran bulunan PDA (%2) besi ortamında 24°C' de inkube edilmiştir. Bu sürenin sonunda besi ortamında gelişen miseller selofan membran üzerinden kazınarak DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. PZR amplifikasyonlarında rDNA'nın ITS gen bölgelerinin dizi bilgisi kullanılmıştır. ITS bölgesinin çoğaltılmasında ITS1-ITS4 primer çiftlerinden yararlanılmıştır. Örneklerle ait elektroforez jel görüntüsü Şekil 3. 5'de verilmiştir.



Şekil 3. 5: ITS1-ITS4 primer çifti ile gerçekleştirilen PZR amplifikasyon ürünleri.

PZR ürünleri, aynı primer çiftleri kullanılarak, ABI 3730XL Sanger dizileme cihazında (Applied Biosystems, Foster City, CA), BigDye, Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti ile (Applied Biosystems, Foster City, CA) dizilenmiştir. Sanger dizileme işlemi hizmet alımı aracılığıyla (BMLabosis BM Lab. Sist. Ltd. Şti.) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen nükleotit dizileri, dizi benzerliklerini belirlemek için GenBank araştırmasında kullanılmıştır (NCBI - Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi). En benzer ve bazı dış grup dizileri NCBI veri tabanından seçilerek ve BioEdit sürüm 7.2.6 yazılımı kullanılarak hizalanmıştır. Tür seviyesinde teşhis için sorgulanan dizinin gen bankasındaki türlerle %98 üzerinde benzerlik göstermesi kriteri esas alınmıştır. Benzerlik oranı %95-98 arasında ise teşhis cins seviyesinde bırakılmıştır. Funguslara ait morfolojik ve moleküler karakterizasyon sonuçları Tablo 3. 3'de verilmiştir.

Tablo 3. 3: *Tomicus destruens* erginlerinden elde edilen fungal izolatların morfolojik ve moleküler karakterizasyon sonuçları

Örnek Adı	Morfolojik ve Kabul Edilen Tanı	Benzerlik gösterdiği referans dizinin;		
		GenBank ID	Benzerlik (%)	GenBank Erişim Kodu
Tip1	<i>Aureobasidium</i> sp.	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100%	KT722607.1
Tip2	<i>Sydowia polyspora</i>	<i>Sydowia polyspora</i>	98%	OK662610.1
Tip3	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98%	NR111348.1
Tip4	<i>Arthriniium</i> sp.	<i>Arthriniium</i> sp.	99%	KJ767257.1
Tip5	<i>Epicoccum layuense</i>	<i>Epicoccum layuense</i>	100%	KT898772.1
Tip6	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	MK611686.1
Tip7	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp.	99%	PP818857.1
Tip8	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria infectoria</i>	100%	MK513822.1
Tip9	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium griseofulvum</i>	100%	ON845663.1
Tip10	<i>Albifimbria</i> sp.	<i>Albifimbria verrucaria</i>	98%	NR_153550.1
Tip11	<i>Sarocladium</i> sp.	<i>Sarocladium kiliense</i>	100%	OR162608.1
Tip12	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium equiseti</i>	100%	KU361513.1
Tip13	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100%	KT898763.1
Tip14	<i>Lecanicillium</i> sp.	<i>Lecanicillium</i> sp.	100%	LT548277.1

Modern biyolojik araştırmalarda, tür teşhisi yalnızca morfolojik özelliklerin incelenmesine dayandırıldığında yetersiz kalabilmektedir. Bu durum özellikle, morfolojik yapıları değişkenlik gösteren funguslar için oldukça önemlidir. Bu nedenle, tür teşhisinin doğruluğunu artırmak ve kesinleştirmek için moleküler düzeyde analizlerin yapılması önem taşımaktadır. Moleküler yöntemlerin geliştirilmesiyle birlikte, biyolojik çeşitlilik araştırmacılarının türleri morfolojik yöntemlere göre DNA barkodlama ile tanımlamaları daha kolay hale gelmiştir (Verkley ve diğ. 2013; Vu ve diğ. 2019). DNA barkodlamanın başarısı, mikrobiyal biyolojik çeşitliliğin gezegenin her köşesinde karakterize edilmesini kolaylaştırmıştır (Afshinnekoo ve diğ. 2015). Bakterilere kıyasla, fungusların tanımlanması zordur çünkü genomları büyük miktarda kodlamayan ve tekrarlayan DNA içerir (Mohanta ve Bae 2015). ITS dizileri, birçok fungus türünün ayrılmasında kullanılmaktadır (Irinyi ve diğ. 2015; Vu ve diğ. 2016). Bunun yanı sıra GenBank'ta daha fazla fungus türüne ait ITS dizilerine ihtiyaç bulunmaktadır (Hawksworth ve Lücking 2017) ve bazı dizilerin düşük kalitede olduğu görülmektedir (Vu ve diğ. 2016). Bu nedenle, bazı fungusların filogenetik ilişkisini belirlemek için çok lokuslu (TEF, RPB1, RPB2, LSU ve SSU) dizi

verileri kullanılmalıdır. Ancak, bu oldukça zahmetli ve ekonomik değildir. Bazı araştırmacılar, ITS bölgeleri ve yeterli genetik varyasyona sahip en az bir protein kodlayan genin (örneğin TEF veya RPB2) suş tanımlaması için yeterli olması gerektiğini, konservatif 28S veya 18S rDNA dizilerinin kullanılmasından ziyade önermektedir (Jeewon ve Hyde 2016). Bu nedenle, doğru suş tanımlaması için minimum ITS ve gen kombinasyonunun belirlenmesi, çok fazla zaman tasarrufu sağlayabilir. Çalışmamızda tek bir primer çifti (ITS1-4) kullanılmıştır ve bazı cinslerin Genbankasında tür düzeyinde tanımlanabilmesi için tek bir primer çiftinin yeterli olmadığı düşünülmektedir. Her ne kadar bu türlere ait benzerlik oranları %98'in üzerinde çıksa da morfolojik olarak yapılan teşhislerde bazı türlerin cins düzeyinde bırakılması daha doğru bulunmuştur. Bu türler daha sonra yapılacak çalışmalarda farklı primer çiftleri kullanılarak tür düzeyine indirgenecektir. Örneğin *Fusarium* cinsi, Dünya çapında 200'den fazla türü içeren filamentli Ascomycota şubesine ait bir cinstir (Al-Hatmi ve diğ. 2016). Bu çok sayıda tür, benzer morfolojik karakterlere sahiptirler ve türlerin birbirinden ayırt edilmesi morfolojik olarak zordur (Kvas ve diğ. 2009). *Fusarium* cinsinin izolat özellikleri de değişkendir ve büyütüldükleri besi ortamına göre morfolojik özellikleri değişebilmektedir (Wang ve diğ. 2020). Bu sebeple bu cinse ait izolatların morfolojiye dayalı doğru tanımlanmasının çok zor, zaman alıcı ve taksonomik bilgi gerektirdiği söylenebilir (Shan ve diğ. 2019).

Bu bulgular, *T. destruens* ile ilişkili fungal çeşitliliğin ve bu böceklerin taşıyıcı olarak rol oynadığı patojenik türlerin kapsamlı bir şekilde anlaşılmasına katkı sağlamaktadır. İzole edilen fungal türlerin varlığı, Kızılcım ormanlarının sağlığı ve sürdürülebilir yönetimi açısından kritik öneme sahiptir. Ayrıca, bu çalışmanın bulguları, orman zararlıları ve hastalıklarının yönetim stratejilerinin geliştirilmesinde önemli bilgiler sunmaktadır. Özellikle, *Tomicus destruens*'in taşıdığı patojenlerin belirlenmesi, bu zararlının kontrolü ve biyolojik mücadelesi için yeni yaklaşımlar geliştirilmesine yardımcı olabilir. Çalışma, orman ekosistemlerinin korunması ve biyolojik çeşitliliğin sürdürülebilir yönetimi için temel veriler sağlamaktadır.

Dünya çapında önemli bir entomopatojen cinsi olarak bilinen *Lecanicillium* sp. bu çalışmada izole edilmiştir. *Lecanicillium* türleri birçok bitki

hastalığı, zararlı böcek ve bitki paraziti nematodlarına karşı etkili biyolojik kontrol ajanlarıdır (Goettel ve diğ. 2008). Bugüne kadar, neredeyse 15 *Lecanicillium* cinsine dayalı ticari preparat geliştirilmiş veya geliştirilmektedir (Faria ve Wraight 2007). Şu anda, 30'dan fazla *Lecanicillium* türü resmi olarak tanımlanmış ve Fungorum Index1'de listelenmiştir. ITS tarafından sağlanan bilgilerin sınırlı olduğu göz önüne alındığında, araştırmacılar yeni *Lecanicillium* türlerini tanımlamak için farklı genler kullanmasının zamandan ve bütçeden tasarruf sağlayacağı açıktır (Zhou ve diğ. 2020). Çalışmamızda bu tür sadece ezme yöntemi sonucunda elde edilmiştir.

Çalışmamızda araştırılan kabuk böceğinin mikobiyotasında, *Tomicus* cinsine ait türlerde daha önce yapılan çalışmalarda da bildirilen *Fusarium* cinsine ait bir tür yer almaktadır (Jankowiak 2005; 2006). Bu taksonomik grubun varlığı, geniş konakçı yelpazesi ve bu cinsin patojenik potansiyeli nedeniyle oldukça önemlidir (Munoz ve diğ. 2017). Daha önce yapılan çalışmalarda rapor edilen *F. sporotrichioides*, *F. circinatum*, *F. Acumiatum* gibi türlerin potansiyel tehdidi düşünüldüğünde izole edilen bu cinsin tür düzeyinde tespit edilmesi için yapılması gereken çalışmalar oldukça değerlidir (Romon ve diğ. 2007; 2008). Bateman (ve diğ. 1998) göre, *Fusarium* spp. ve kabuk böcekleri arasındaki ilişki, bu cinsin bol spor üretimi (taşıyıcı fırsatçılığı) ve bazı *Fusarium* türlerinin patojenik davranışı ile açıklanabilir, bu da ağaç kolonizasyonu sırasında kabuk böcekleri için bir avantaj oluşturabilir. Çalışmamızda *Fusarium* sp. sadece ezme yöntemi ile elde edilmiştir.

Çalışmada en sık bulunan türlerden birisi olan *S. polyspora* (anamorf: *Hormonema dematioides* Lagerb. & Melin) özel bir dikkat gerektirmektedir. Bu fungus, çalışmamızda izole edilen fungal gruplar arasında baskın bir tür olup, böcekler tarafından taşınan çok yaygın bir tür olarak rapor edilmiştir (Davydenko ve diğ. 2014; Jankowiak ve Bilanski 2007). Jankowiak ve Bilański (2007) ve Munoz ve diğ. (2017) *T. destruens* türü cinsi ile yaptıkları çalışmada bu türü en sık ve dominant tür olarak bildirmişlerdir. Bu fungus Talgø (ve diğ. 2010) Tarafından Avrupa ve ABD'deki köknar ağaçlarını (*Abies* spp.) etkileyen bir hastalık etmeni olarak rapor edilmiştir. Ayrıca Denizli'de gerçekleştirilen bir diğer çalışmada bu fungusun *P. brutia* ağaçlarında mevcut sezon ibre nekrozuna sebep

olduğu bildirilmiştir (Beram ve Demiröz 2024). Jankowiak ve Kurek (2006), *S. polyspora*'nın kabuk böcekleri ile ilişkili olarak erken kolonizasyon sırasında avantaj sağlayabileceğini öne sürmüşlerdir. Bu fungusun kabuk böcekleri tarafından konak kolonizasyonundaki rolü ve özellikle *Tomicus* türleri ile olan ilişkisi belirsizliğini korumaktadır. Yine de, *S. polyspora*'nın gözlemlenen bolluğu, aynı anda gerçekleşebilecek iki yönlü bir geçiş ile açıklanabilir. Fungus böceklerin beslenme dönemi sırasında sürgünlerde bol miktarda bulunabilir (endofitik yol) ya da diğer yandan, böcekler doğrudan döküntü ibre ve sürgünlerden (saprofitik yol) fungal sporları yüklenebilir (Munoz ve diğ. 2017). Çalışmamızda bu fungus sadece yürütme tekniği sonucunda izole edilmiştir.

*Penicillium* spp. çeşitli kabuk böceği türlerinden sıkça izole edilmiştir (Jankowiak 2006; Giordano ve diğ. 2013) Bu cinsin yayılma yöntemi olarak anemokori (rüzgarla yayılma) ana yöntem olarak bilinmektedir ve *Penicillium* sp. ile kabuk böcekleri arasındaki ilişki, uçuş sırasında temasın bir sonucu olarak düşünülebilir. Çalışmamızda bu fungus hem ezme hem de yürütme yöntemiyle izole edilmiştir ve ayrıca en yüksek sıklıkta izolasyonu yapılan türdür. *Penicillium* spp., en sık rastlanan taksonlar arasında olduğu görülmektedir (Kowalski 1991; Kaus ve diğ. 1996; Kubátová 2000; Seifert ve Frisvad 2000; Varese ve diğ. 2003; Menkis ve diğ. 2006). Kubátová (2000), sağlıklı ve orta derecede gerileyen ağaçlarda *Penicillium* türlerini tespit etmiş ve genellikle odunlardan karakteristik bir *Penicillium* sp. türü birleşimi gözlemlemiştir. *Penicillium*'un ağaç gerilemesi üzerindeki rolü hâlâ belirsizliğini korumaktadır.

*Cladosporium* sp. rasgele olarak bir organizmadan diğerine taşınabilen bir fungus olarak bilinmektedir ancak bu cinsin entomopatojenik potansiyeli de oldukça önemlidir (Eken ve Hayat 2009). Bu türün *T. destruens* üzerindeki varlığını açıklamak için iki olası neden bulunabilir. Çalışmamızda bu fungus hem ezme, hem de yürütme yöntemiyle izole edilmiştir.

*Alternaria* cinsine ait birçok tür, toprakta veya çürüyen bitki dokularında en sık bulunan saprofitlerdir. Bazı türler fırsatçı bitki patojenleridir ve toplu olarak tarımsal bitkiler üzerinde ekonomik etkisi olan bir dizi hastalığa sebebiyet verebilirler. *Alternaria* spp. hasat sonrası patojenler olarak da bilinmektedirler. *Alternaria* türlerinin iki ana özelliği, özellikle sporlarda melanin üretimi ve

patojenik türler durumunda konakçıya özgü toksinlerin üretimidir (Thomma 2003). Neden olduğu enfeksiyon, olumsuz koşullardan kaynaklanan büyüme kesintileri nedeniyle nekrotik lezyonların oluşumuna yol açar. Bu lezyonlar fungus metabolitlerinin (toksinler) difüzyonu ile oluşturulur (Agarwal ve diğ. 1997; Tewari 1983). *Alternaria* sp.'nin karaçam ibrelerinde endofit olarak bulunduğu raporlanmıştır (Markovskaja ve diğ. 2016). Ayrıca çalışmamızda elde ettiğimiz *A. alternata*, Ukrayna'da yapılan bir çalışmada sarıçamdan örneklenen *I. acuminatus* türünde raporlanmıştır (Davydenko ve diğ. 2017). Çalışmamızda *Alternaria* cinsine ait iki farklı tür tespit edilmiş olup her iki tür de yürütme yöntemi ile izole edilmiştir.

*Aspergillus* cinsine ait funguslarlar, toprak ekosistemlerinde baskın bir mikromiset grubu olarak bilinirler (Domsch ve diğ. 1993) ve sporlarına havada sıkça rastlanır (Fischer ve diğ. 2003). *Aspergillus* cinsine ait türler her yerde bulunur ve saprofit veya endofitik olabilir (Hung ve Lee Rutgers 2016). Literatürde, *Aspergillus*'un geniş bir yelpazedeki böceklere karşı virulent olduğu kaydedilmiştir (Nnakumusana 1985; Su ve diğ. 2001; Scholte ve diğ. 2003). Son zamanlarda, bu cinsin türleri ve suşları bitki büyümesinin potansiyel destekleyicileri olarak bildirilmiştir (Lubna ve diğ. 2018; Yoo ve diğ. 2018; Xie ve diğ. 2019). *Aspergillus niger*, gıda endüstrisinde sitrik asit gibi çeşitli enzim ve metabolitlerin üretimi için yaygın olarak kullanılan bir türdür (Behera 2020). Tarımsal üretimde kullanımı son yıllarda daha fazla ilgi görmektedir (Wang ve diğ. 2015; Klaic ve diğ. 2017). Birçok araştırma, *A. niger* suşları tarafından P'nin çözüldürüldüğünü ve çözünmeyen fosfatların çözünür formlara dönüştürüldüğünü bildirmiştir (Chuang ve diğ. 2007; Lubna ve diğ. 2018; Din ve diğ. 2019).

*Aureobasidium* türleri, farklı ortamlarda (örneğin toprak, su, odun) bulunabilen yaygın ve maya benzeri bir funguslardır. Herhangi bir hastalık belirtisi göstermeden çok çeşitli bitki türlerinin doğal olarak oluşan bir epifiti veya endofiti olarak bulunurlar. *Aureobasidium pullulans*, farklı enzimler, sideroforlar ve pullulan üretimi için biyoteknolojide yüksek öneme sahiptir. Ayrıca, *A. pullulans*, bitki hastalıklarının biyolojik kontrolünde kullanılır (Chi ve diğ. 2009).

### 3.4 Çeşitlilik İndeksi ve Frekanslar

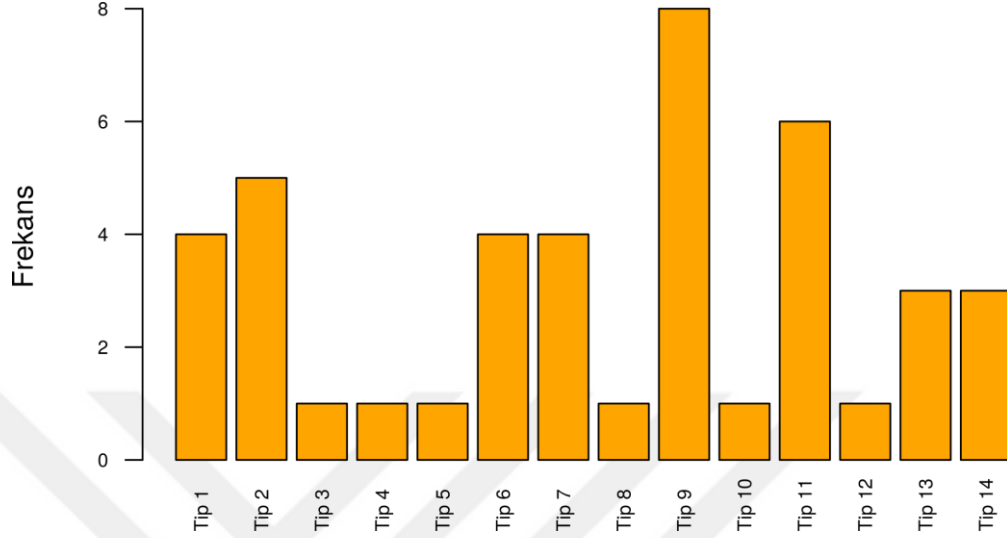
Shannon-Weiner Çeşitlilik İndeksi uygulaması sonucunda en yüksek çeşitlilik (H: 1,610) D3 ve K5 ağaçları üzerinden toplanan örneklerde tespit edilmiştir. D3 üzerinden Tip-1, Tip-6, Tip-9 ve Tip-13 fungus suşları tespit edilirken, K5 üzerinden Tip-1, Tip-6, Tip-7, Tip-11 ve Tip-13 suşları tespit edilmiştir. A1 (Tip 9), A3 (Tip 11), B4 (Tip 9), D4 (Tip 6), E-1 (Tip 13), H1 (Tip 11), H3 (Tip 9), K2 (Tip 2), K3 (Tip 8) ve K6 (Tip 9) ağaçlarından tek bir suş elde edildiği için indeks hesaplamalarına dahil edilmemiştir. Konakçılara göre tespit edilen türler ve indeks değerleri Tablo 3. 4'de verilmiştir.

Tablo 3. 4: Konakçılara göre tespit edilen türler ve indeks değerleri. Tek tür ile ifade edilen konakçılara ait indeks değerleri 0 olarak gösterilmiştir. Ağaç kod ve konumları Şekil 2. 12'de ve tiplere ait takson adları Tablo 3. 3'de verilmiştir.

Ağaç Numaralandırma	Shannon-Weiner (H)	Fungal Türler
D3	1,61	Tip-1, Tip-6, Tip-9, Tip-13
K5	1,61	Tip-1, Tip-6, Tip-7, Tip-11, Tip-13
A1	0	Tip-9
A3	0	Tip-11
B4	0	Tip-9
D4	0	Tip-6
E-1	0	Tip-13
H1	0	Tip-11
H2	0	Tip-9
H3	0	Tip-9
K2	0	Tip-2
K3	0	Tip-8
K6	0	Tip-9
E4	0,6931472	Tip-2 ve Tip-14
K4	0,6931472	Tip-10 ve Tip 11
E1	1,0986123	Tip-2, Tip-3, Tip-4,
E3	1,0986123	Tip-2, Tip-9, Tip 14
B3	1,3862944	Tip-1, Tip-2, Tip-6, Tip-7,
D1	1,3862944	Tip-5, Tip-7, Tip-11, Tip-12
G1	1,3862944	Tip-1, Tip-7, Tip-9, Tip-11

İncelenen örneklerde fungus türleri çeşitlilik göstermektedir (Şekil 3. 6). Bazı türler (Tip-9 ve Tip-11 gibi) diğerlerine kıyasla daha yaygınken, bazı türler (Tip-3, Tip-4 gibi) çok nadir gözlemlenmiştir. Tip-9 ve Tip-11 gibi yüksek

frekansa sahip türler, ekosistem içerisindeki rollerini önemli kılabilir. Düşük frekansa sahip türler ise habitat koşullarının bu türlerin yaşamı üzerindeki etkileri veya nadirlik nedenleri açısından farklılık göstermektedir.



Şekil 3. 6: Tespit edilen fungus taksonlarına ait frekans dağılımı.

### 3.5 Seyreltme Oranları

Fungus türlerinin seyreltme derecelerine göre varlık/yokluk durumu ısı haritası kullanılarak analiz edilmiştir (Şekil 3. 7). Seyreltme çalışması 8 farklı ağaçtan (A3, D1, D3, E3, E4, G1, H1 ve K5) toplamış olduğumuz böcekten elde edilmiş olup, 6 farklı fungus türü (Tip7, Tip9, Tip11, Tip12, Tip13 ve Tip14) üzerinde etkisini göstermiştir:

**Tip 7:** Yalnızca K5-A-10<sup>-4</sup>'te seyreltme derecesinde varlık göstermiştir.

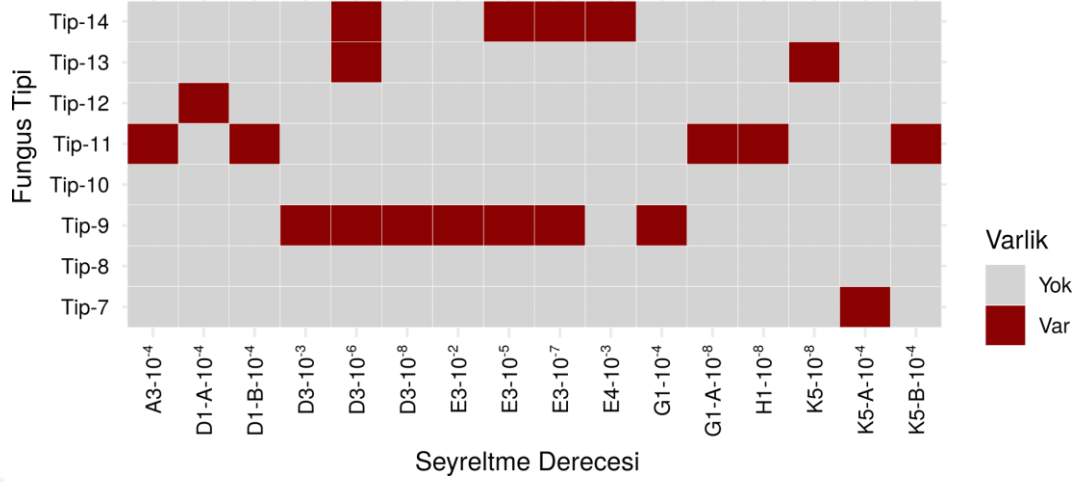
**Tip 9:** Birçok seyreltme derecesinde yüksek frekanslarda varlık göstermiştir. Bu türün en yaygın fungus türü olduğu gözlemlenmiştir.

**Tip 11:** A3-10<sup>-4</sup>, D1-B-10<sup>-4</sup>, G1-A-10<sup>-8</sup>, H1-10<sup>-8</sup>, ve K5-B-10<sup>-4</sup> seyreltme derecelerinde varlık göstermiştir.

**Tip 12:** Yalnızca D1-A-10<sup>-4</sup> seyreltme derecesinde varlık göstermiştir.

**Tip 13:** D3-10<sup>-6</sup>, E3-10<sup>-7</sup> ve K5-10<sup>-8</sup> seyreltme derecelerinde varlık göstermiştir.

**Tip 14:** D3-10<sup>-6</sup>, E3-10<sup>-5</sup>, E3-10<sup>-7</sup>, ve E4-10<sup>-3</sup> 6 farklı fungus üzerinde etkisini göstermiştir.



Şekil 3. 7: Fungus türlerinin seyreltme derecelerine göre varlık/yokluk durumu. İlk harf-numara kodu ağaç klonunu, ikinci harf kodu farklı izolatları göstermektedir.

### 3.6 Ezme-Yürütme Etkisinin Karşılaştırılması

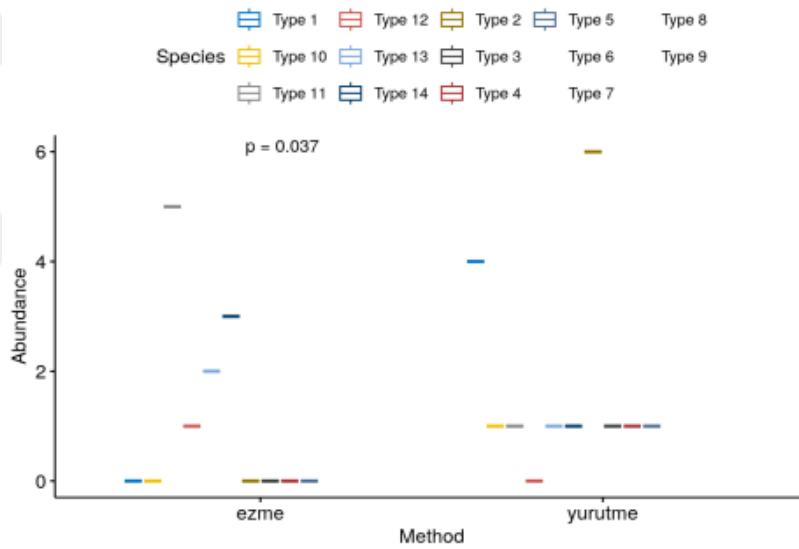
Normallik testi (Shapiro-Wilk) ve varyans homojenliği testi (Levene testi) sonuçlarına göre, verilerin normalliği ve varyans homojenliği sağlanmamıştır. Bu nedenle non-parametrik Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır. Kruskal-Wallis testi sonuçları, ve yürütme yöntemlerinin fungus türlerinin bollukları üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir ( $p < 0,05$ ). Post-hoc analizler (Pairwise Wilcoxon Test) ile hangi yöntemlerin ve fungus türlerinin anlamlı farklar gösterdiği belirlenmiştir. İstatistiksel sonuçlar (Şekil 3. 8), ezme ve yürütme yöntemlerine göre fungus türlerinin bolluk değerlerini açıkça göstermiştir. Buna göre, Tip-1 fungus türü yürütme yönteminde daha yüksek bolluk değerleri göstermiştir. Bu bulgular, ezme ve yürütme yöntemlerinin fungus türlerinin bollukları üzerindeki etkilerini anlamak için önemli bilgiler sağlamaktadır.

**Ezme yöntemi sonucu tespit edilen funguslar:** Tip-7 (*Cladosporium* sp.), Tip-9 (*Penicillium* sp.), Tip-11 (*Sarocladium* sp.), Tip-12 (*Fusarium* sp.), Tip-13 (*Aureobasidium pullulans*) ve Tip-14 (*Lecanicillium* sp.) olmak üzere 6 taksondur.

**Yürütme yöntemi sonucu tespit edilen funguslar:** Tip-1 (*Aureobasidium* sp.), Tip-2 (*Sydowia polyspora*), Tip-3 (*Aspergillus niger*), Tip-4 (*Arthrimum* sp.), Tip-5 (*Epicoccum layuense*), Tip-6 (*Alternaria alternata*), Tip-7 (*Cladosporium* sp.), Tip-8 (*Alternaria* sp.), Tip-9 (*Penicillium* sp.), Tip-10 (*Albifimbria* sp.), Tip-11 (*Sarocladium* sp.), Tip-13 (*Aureobasidium pullulans*) ve Tip-14 (*Lecanicillium* sp.) üzere 13 taksondur.

Yürütme yönteminde elde edilemeyen tek fungus türü Tip-12 (*Fusarium* sp.) olup, sadece ezme yönteminde elde edilmiştir.

**Her iki yöntemde ortak tespit edilen funguslar:** Tip-7 (*Cladosporium* sp.), Tip-9 (*Penicillium* sp.), Tip-11 (*Sarocladium* sp.), Tip-13 (*Aureobasidium pullulans*) ve Tip-14 (*Lecanicillium* sp.) olmak üzere 5 taksondur.



Şekil 3. 8: Fungus türlerinin bolluk ve dağılımları.

Fungal türlerin bolluk ve dağılımını belirlemek için ezme ve yürütme yöntemleri kullanılmıştır. Kruskal-Wallis testi ile yöntemlerin fungus türlerinin bollukları üzerindeki etkisi değerlendirilmiş ve istatistiksel açıdan her iki yöntem arasında anlamlı fark ( $p < 0,05$ ) bulunmuştur.

### 3.7 Fungal izolatlara ait koloni görüntüleri

Gruplara ait temsilci fungal izolatlara ait koloni görüntüleri alfabetik sıra ile verilmiştir.

#### 3.7.1 *Aureobasidium* sp. (Tip1)

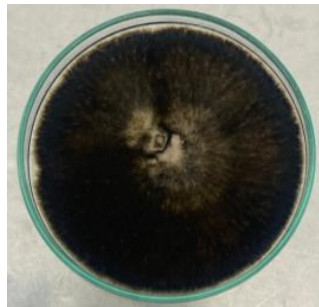
*Aureobasidium* sp.n'in %2'lik PDA besi ortamında 20°C'de karanlıkta inkube edilmiş 10 günlük petri görüntüsü Şekil 3. 9'de verilmiştir.



Şekil 3. 9: *Aureobasidium* sp.

#### 3.7.2 *Sydowia polyspora* (Tip2)

*Sydowia polyspora*'nın %2'lik PDA besi ortamında 20°C'de karanlıkta inkube edilmiş 10 günlük petri görüntüsü Şekil 3. 10'de verilmiştir.



Şekil 3. 10: *Sydowia polyspora*.

### 3.7.3 *Aspergillus niger* (Tip 3)

*Aspergillus niger*'in %2'lik PDA besi ortamında 20°C'de karanlıkta inkube edilmiş 14 günlük petri görüntüsü Şekil 3. 11'de verilmiştir.



Şekil 3. 11: *Aspergillus niger*.

### 3.7.4 *Arthriniium* sp. (Tip4)

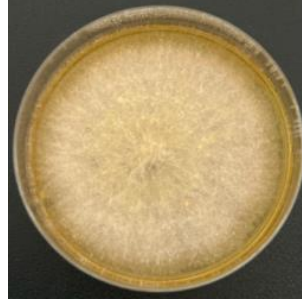
*Arthriniium* sp.'nin %2'lik PDA besi ortamında 20°C'de karanlıkta inkube edilmiş 10 günlük petri görüntüsü Şekil 3. 12'da verilmiştir.



Şekil 3. 12: *Arthriniium* sp.

### 3.7.5 *Epicoccum layuense* (Tip5)

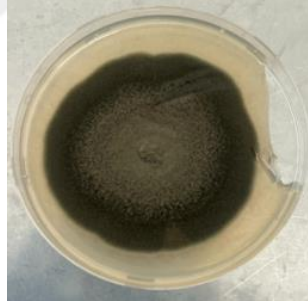
*Epicoccum layuense*'nin %2'lik PDA besi ortamında 20°C'de karanlıkta inkube edilmiş 10 günlük petri görüntüsü Şekil 3. 13'de verilmiştir.



Şekil 3. 13: *Epicoccum layuense*

### 3.7.6 *Alternaria alternata* (Tip6)

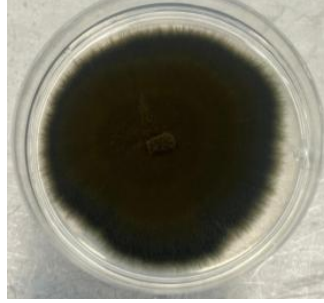
*Alternaria alternata*'nın %2'lik PDA besi ortamında 20°C'de karanlıkta inkube edilmiş 10 günlük petri görüntüsü Şekil 3. 14'te verilmiştir.



Şekil 3. 14: *Alternaria alternata*.

### 3.7.7 *Cladosporium* sp. (Tip 7)

*Cladosporium* sp.1'in %2'lik PDA besi ortamında 20°C'de karanlıkta inkube edilmiş 10 günlük petri görüntüsü Şekil 3. 15'de verilmiştir.



Şekil 3. 15: *Cladosporium* sp.

### 3.7.8 *Alternaria* sp. (Tip8)

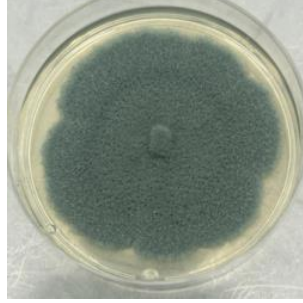
*Alternaria* sp.'nin %2'lik PDA besi ortamında 20°C'de karanlıkta inkube edilmiş 10 günlük petri görüntüsü Şekil 3. 16'da verilmiştir.



Şekil 3. 16: *Alternaria* sp.

### 3.7.9 *Penicillium* sp.(Tip9)

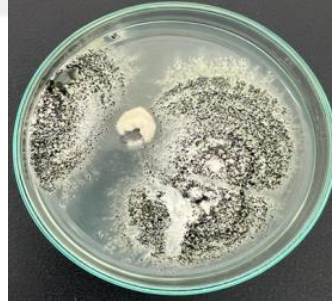
*Penicillium* sp.'un %2'lik PDA besi ortamında 20°C'de karanlıkta inkube edilmiş 10 günlük petri görüntüsü Şekil 3. 17'de verilmiştir.



Şekil 3. 17: *Penicillium* sp.

### 3.7.10 *Albifimbria* sp. (Tip10)

*Albifimbria* sp.'nin %2'lik PDA besi ortamında 20°C'de karanlıkta inkube edilmiş 10 günlük petri görüntüsü Şekil 3. 18'de verilmiştir.



Şekil 3. 18: *Albifimbria* sp.

### 3.7.11 *Sarocladium* sp.(Tip11)

*Sarocladium* sp.'nin %2'lik PDA besisi ortamında 20°C'de karanlıkta inkube edilmiş 10 günlük petri görüntüsü Şekil 3. 19'te verilmiştir.



Şekil 3. 19: *Sarocladium* sp.

### 3.7.12 *Fusarium* sp. (Tip12)

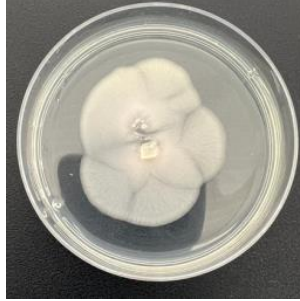
*Fusarium* sp.'nin %2'lik PDA besisi ortamında 20°C'de karanlıkta inkube edilmiş 10 günlük petri görüntüsü Şekil 3. 20'te verilmiştir.



Şekil 3. 20: *Fusarium* sp.

### 3.7.13 *Aureobasidium pullulans*(Tip13)

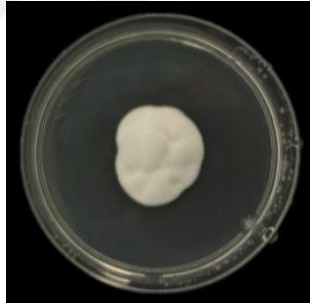
*Aureobasidium pullulans*'ın %2'lik PDA besi ortamında 20°C'de karanlıkta inkube edilmiş 10 günlük petri görüntüsü Şekil 3. 21'de verilmiştir.



Şekil 3. 21: *Aureobasidium pullulans*.

### 3.7.14 *Lecanicillium* sp. (Tip14)

*Lecanicillium* sp.'nin %2'lik PDA besi ortamında 20°C'de karanlıkta inkube edilmiş 10 günlük petri görüntüsü Şekil 3. 22'da verilmiştir.



Şekil 3. 22: *Lecanicillium* sp.

## 4 ÖNERİLER

Bu çalışma, *T. destruens*'un simbiyotik fungus ilişkilerini ve bu ilişkilerin *P. brutia* (Kızılçam) ağaçları üzerindeki etkilerini anlamada önemli bilgiler sunmuştur. *T. destruens*, taşımış olduğu çeşitli funguskolonileri ile Kızılçam ağaçlarında ciddi zararlara yol açabilmektedir. Araştırma süresince, *T. destruens* tarafından taşınan fungus türlerinin belirlenmesi, bu zararlının biyolojik çeşitlilik ve ekosistem sağlığı üzerindeki etkilerini değerlendirme konusunda güncel veriler sağlamıştır. *T. destruens* ve ilişkili fungusların orman ekosistemlerine olan etkisini anlayabilmek için erken tespit ve izleme sistemleri geliştirilmelidir. Bu sistemler, popülasyon dinamiklerini izlemek ve yayılmalarını anlayabilmek için önemlidir. Erken tespit sistemleri geliştirilirken, çevresel DNA (eDNA) analizleri, ileri görüntüleme teknolojileri ve uzaktan algılama yöntemlerinin kullanımı önem arz etmektedir. *T. destruens*'un taşıdığı fungus topluluklarının belirlenmesi, bu canlıların kontrolü ve biyolojik mücadelesi için yeni stratejiler geliştirilmesine olanak tanır. Bu kapsamda özellikle, doğal düşmanlar veya antagonist fungus türleri kullanılarak biyolojik mücadele yöntemleri araştırılmalıdır. Bu teknolojiler, *T. destruens* ve ilişkili fungusların yayılımının hızlı ve etkili bir şekilde izlenmesinde kritik bir rol oynayacaktır. *T. destruens*'a karşı kullanılacak biyolojik mücadele yöntemleri detaylandırılabilir. Özellikle, antagonist fungus türlerinin keşfi ve bu türlerin *T. destruens* ve taşıdığı patojenlere karşı etkinliği önemli bir unsurdur. Ayrıca, bu mücadele yöntemlerinin çevresel sürdürülebilirlik açısından avantajları ve potansiyel riskleri de değerlendirilebilir.

Sonuç olarak, *T. destruens* ve ilişkili fungus patojenlerinin Kızılçam üzerindeki etkilerini anlamak ve bu zararlının kontrolü için ileriye dönük araştırmalar ve entegre yönetim stratejileri büyük önem taşımaktadır. Bu çalışma, orman ekosistemlerinin korunması ve biyolojik çeşitliliğin sürdürülebilir yönetimi için temel veriler sağlamaktadır.

## 5 KAYNAKÇA

Afshinnekoo, E., Meydan, C., Chowdhury, S., Jaroudi, D., Boyer, C. and Bernstein, N., “Geospatial resolution of human and bacterial diversity with city-scale metagenomics”, *Cell Syst.*, 1, 72-87, (2015).

Agarwal, A., Garg, G.K., Devi, S., Mishra, D.P., Singh, U.S., “Ultrastructural Changes in Brassica Leaves Caused by *Alternaria brassicae* and destruxin B.”, *J Plant Biochem Biotech*, 6 (1), 25-28, (1997).

Al-Hatmi, A.M.S., Gerrits V.D.E., A.H.G., Stielow, B., Diepeningen, A.V., Seifert, K.A., McCormick, W., Assabgui, R., Gräfenhan, T., De Hoog, G.S. and Levesque, C.A., “Evaluation of two novel barcodes for species recognition of opportunistic pathogens in *Fusarium*”, *Fungal Biol.*, 120 (2), 231-245, (2016).

Amezaga, I. and Garbisu, C. “Effect of intraspecific competition on progeny production of *Tomicus piniperda* (Coleoptera: Scolytidae)”, *Popul. Ecol.*, 29 (5), 1011-1017, (2000).

Anonim, *Orman atlası*, Orman Genel Müdürlüğü, Ankara, (2013).

Anonim, *Orman bitkisi ve bitkisel ürünlerinde önemli zararlı ve hastalıkları tanıma kılavuzu*, Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Orman Genel Müdürlüğü, Orman Zararlılarıyla Mücadele Dairesi Başkanlığı, Ankara, (2016).

Anonim, *Türkiye'nin doğal-egzotik ağaç ve çalıları*, (Ed: Ünal Akkemik), Orman ve Su İşleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü, Ankara, (2017).

Ayres, M.P., Wilkens, R.T., Ruel, J.J., Lombardero, M.J. and Vallery, E. “Nitrogen budgets of phloem-feeding bark beetles with and without symbiotic fungi”, *Ecol.*, 2 (81), 2198-2210, (2000).

Balay, S.N., “Balıkesir orman işletme müdürlüğü kızılçam ağaçlandırma sahalarında Akdeniz orman bahçivani [*Tomicus destruens* (Wollaston) (Col., Curculionidae)]'nin hayat döngüsünün belirlenmesi”, *Orman. Araşt. Bült.*, 1, 1-2, (2015).

Bateman, G.L., Murray, G., Gutteridge, R.J., Coşkun, H., “Effects of method of straw disposal and depth of cultivation on populations of *Fusarium* spp. in soil and on brown foot rot in continuous winter wheat”, *Ann. Appl. Biol.*, 132, 35-47, (1998).

Beaver, R.A., *Insect–fungus relationship in the bark and ambrosia beetles*, In *Insect – fungus interactions*, (Eds: Wilding N., Collins N. M., Hammond P. M. and Webber J. F.), New York: Academic Press, (1989).

Behera, B.C., “Citrus waste utilization and its valorization for production of valuable products: A review”, *J. Environ. Chem. Eng.*, 8(4), 104067, (2020).

Ben-Jamaa, M.L., Lieutier, F., Yart, A., Jerraya, A. and Khouja M.L., “The virulence of phytopathogenic fungi associated with the bark beetles *Tomicus piniperda* and *Orthotomicus erosus* in Tunisia”, *For. Pathol.*, 37, 51-63, (2007).

Beram, R.C., and Demiröz, F., “*Sydowia polyspora* associated with current season needle necrosis (CSNN) on *Pinus brutia* Ten. in Türkiye”, *For. Pathol.*, 54 (1), e12849, (2024).

Boyes, K.N., Hietala-Henschell, K.G., Barton, A.P., Storer, A.J. and Marshall, J.M., “Linking tree growth rate, damage repair, and susceptibility to a genus-specific pest infestation”, *J. For. Res.*, 30, 1935-1941, (2019).

Branco, M., Enache A.A., Katsoyannos I.O. and El-Wakeil, N.H., *Threats and management of pine shoot beetles (Tomicus spp.) in Europe*, (Eds: Mota, M.M and Vieira) *Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems*, Springer, 119-142, (2010).

Can, P., “Türkiye ormanlarında son yıllarda görülen kabuk böcekleri (Coleoptera, Scolytidae) sorunu üzerinde bir değerlendirme”, *Orman ve Av Dergisi*, 4, 4-11, (2005).

Caudullo, G., Welk, E. and San-Miguel-Ayanz, J., “Chorological maps for the main European woody species”, *Data Brief*, 12, 662-666, (2017).

Chang R., Duong T.A., Taerum S.J., Wingfield M.J., Zhou X. and De Beer Z.W., “Ophiostomatoid fungi associated with conifer-infesting beetles and their phoretic mites in Yunnan, China”, *MycKeys*, 28, 19-64, (2017).

Chararas, C., *A biological study of the scolytids of coniferous trees*, Encyclopedie Entomologique, Lechevalier, Paris, France, (1962).

Chi, Z., Wang, F., Chi, Z., Yue, L., Liu, G. and Zhang, T., “Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 82 (5), 793-804, (2009).

Chuang, H.C., Chen, Y.R., and Tsai, Y.H., “Solubilization of phosphate by *Aspergillus niger* strains and its effect on plant growth”, *J. Sci. Food Agric.*, 87(15), 2642-2648, (2007).

Davydenko, K., Vasaitis, R. and Menkis, A., “Fungi associated with *Ips acuminatus* (Coleoptera: Curculionidae) in Ukraine with a special emphasis on pathogenicity of ophiostomatoid species”, *Eur. J. Entomol.*, 114, 77-85, (2017).

Davydenko, K., Vasaitis, R., Meshkova, V. and Menkis, A., “Fungi associated with the red-haired bark beetle, *Hylurgus ligniperda* (Coleoptera: Curculionidae) in the forest-steppe zone in Eastern Ukraine”, *Eur. J. Entomol.*, 111, 561-565, (2014).

Dharne, M., Patole, M. and Shouche, Y.S., “Microbiology of the insect gut: tales from mosquitoes and bees”, *J. Biosci.*, 31 (3), 293--295, (2006).

Diana, L.S., “Ecological and evolutionary determinants of bark beetle-fungus symbioses”, *Insects*, 3 (1), 339-366, (2012).

Din, M. F., Khalid, M. and Hussain, M., “Phosphate solubilization by *Aspergillus niger* strains and their potential use in sustainable agriculture”, *Biol. Agric. Hortic.*, 35(4), 345-355, (2019).

Dohet, L., Gregoire, J.C., Berasategui, A., Kaltenpoth, M. and Biedermann, P.H.W., “Bacterial and fungal symbionts of parasitic dendroctonus bark beetles”, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 92, 129, (2016).

Domsch, K.H., Gams, W. and Anderson, T.H., *Compendium of soil fungi*, vol. I, IHW-Verlag, (1993).

Eken, C., ve Hayat, R., “Preliminary evaluation of *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de vries in laboratory conditions, as a potential candidate for biocontrol of *Tetranychus urticae*”, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 489-492, (2009).

Faccoli, M., “Breeding performance of *Tomicus destruens* at different densities: the effect of intraspecific competition”, *Entomol. Exp. Appl.* 132 (2), 191-199, (2009).

Faccoli, M., “Morphological separation of *Tomicus piniperda* and *T. destruens* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae): new and old characters”, *Eur. J. Entomol.*, 103, 433-443, (2006).

Faccoli, M., Pisedda, A., Salvato, P., Simonato, M., Masutti, L. and Battisti, A., “Genetic structure and phylogeography of pine shoot beetle populations (*Tomicus destruens* and *T. piniperda*, Coleoptera Scolytidae) in Italy”, *Ann. For. Sci.*, 62, 361-368, (2005).

Faria, M.R., and Wraight, S.P., “Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types”, *Biocontrol*, 43, 237-256, (2007).

Farrell, B.D., Sequeira, A.S.O., Meara, B.C., Normark, B.B., Chung, J.H. and Jordal, B.H., “The evolution of agriculture in beetles (Curculionidae:Scolytinae and Platypodinae)”, *Evol.*, 55, 2011-2027, (2001).

Filotas, E., Parrott, L., Burton, P.J., Chazdon, R.L., Coates, K.D., Coll, L., Haeussler, S., Martin, K., Nocentini, S., Puettmann, K.J., Putz, F.E., Simard, S.W., and Messier, C., “Viewing forests through the lens of complex systems science”, *Ecosphere*, 5 (1), 1-23, (2014).

Fischer, G. and Dott, W., “Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene”, *Arch. Microbiol.*, 179, 75-82, (2003).

Gallego, D. and Galian, J. “The internal transcribed scapers (ITS1 and ITS2) of the rDNA differentiates the bark beetle forest pests *Tomicus destruens* and *T. piniperda*”, *Insect Mol. Biol.*, 10, 415-420, (2001).

Gencal, T. and Baydemir, M. “Predatory species of Scolytinae in Bursa province of Turkey”, *Int. j. biol. chem.*, 16 (1), 33-43, (2023).

Gibbs, J.N. and Inman, A., “The pine shoot beetle *Tomicus piniperda* as a vector of blue-stain fungi to windblown pine”, *Forest.*, 64, 139-249, 1991.

Giordano, L., Garbelotto, M., Nicolotti, G. and Gonthier, P., “Characterization of fungal communities associated with the bark beetle *Ips typographus* varies depending on detection method, location, and beetle population levels”, *Mycol. Prog.*, 12, 127-140, (2013).

Goettel, M.S., Koike, M., Kim, J.J., Aiuchi, D., Shinya, R., and Brodeur, J., “Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases”, *J. Invertebr. Pathol.*, 98, 256-261, (2008).

Graham, K., “Fungal-insect mutualism in trees and timber”, *Annu. Rev. Entomol.*, 12, 105-127, (1967).

Hawksworth, D. L. and Lücking, R., “Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species”, *Microbiol. Spectr.*, 5(4), 1-17, (2017).

Horn, S., Faccoli, M. and Bernardinelli, I., “Climate change and its impact on the distribution and damage of *Tomicus destruens* (Wollaston, 1865) in Mediterranean Pine Forests”, *J. For. Sci.*, 58(11), 489-500, (2012).

Hui Min, W., Liu, C., Yue, F., Yan, Dong-Hui and Lu, Q., “Identification of ophiostomatalean fungi associated with *Tomicus pilifer* infesting *Pinus koraiensis* in Morteastern China”, *Front. Microbiol.*, 13, 919302, (2022).

Hui Min, W., Wang, Z., Liu, F., Wu, C., Zhang, S., Kong, X., Decock, C., Lu, Q., and Zhang, Z., “Differential patterns of ophiostomatoid fungal communities associated with three sympatric *Tomicus* species infesting pines in south-western China, with a description of four new species”, *MycoKeys*, 50, 93-133, (2019).

Hulcr, J. and Dunn, R. R., “The sudden emergence of pathogenicity in insect–fungus symbioses threatens naive forest ecosystems”, *Proc. R. Soc. B.*, 278, 2866-2873, (2011).

Hulcr, J., Kolarik, M. and Kirkendall, L. R., “A new record of fungus–beetle symbiosis in scolytodesbark beetles (Scolytinae, Curculionidae, Coleoptera)”, *Symbiosis*, 43, 151-159, (2007).

Hung, R., and Lee, R.S., “Applications of *Aspergillus* in plant growth promotion”, *New Future Dev. Microb. Biotechnol.*, 223-227, (2016).

Irinyi, L., Serena, C., Garcia-Hermoso, D., Arabatzis, M., Desnos-Ollivier, M., Vu, D., et al., “International society of human and animal mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database-the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi”, *Med. Mycol. J.*, 53, 313-337, (2015).

Jankowiak, R. and Bilanski, P., “Fungal flora associated with *Tomicus piniperda* in an area close to a timber yard in southern Poland”, *J. Appl. Entomol.*, 131(8), 579-584, (2007).

Jankowiak, R. ve Kurek, M., “The early stages of fungal succession in *Pinus sylvestris* phloem and sapwood infested by *Tomicus piniperda*”, *Dendrobiology* 56, 27-36, (2006).

Jankowiak, R., “Fungi associated with *Ips typographus* on *Picea abies* in southern Poland and their succession into the phloem and sapwood of beetle-infested trees and logs”, *For. Pathol.*, 35, 37-55, (2005).

Jankowiak, R., “Fungi associated with *Tomicus minor* on *Pinus sylvestris* in Poland and their succession into the sapwood of beetle-infested windblown trees”, *Can. J. For. Res.*, 38(10), 2579-2588, (2008).

Jankowiak, R., “Fungi associated with *Tomicus piniperda* in Poland and assessment of their virulence using Scots pine seedlings”, *Ann. For. Sci.*, 63, 801-808, (2006).

Jeewon, R. and Hyde, K. D., “Establishing species boundaries and new taxa among fungi-recommendations to resolve taxonomic ambiguities”, *Mycosphere* 7, 1669-1677, (2016).

Kaus, A., Schmitt, V., Simon, A. and Wild, A., “Microscopical and mycological investigations on wood of pedunculata oak (*Quercus robur* L.) relative to the occurrence of oak decline”, *J. Plant Physiol.*, 148, 302-308, (1996).

Keten, E., ve Gürsoy, O., “Ormanların ekosistem üzerindeki etkileri”, *Ekoloji*, 15(3), 45-58, (2020).

Klaic, R., Briones, R., and Vasquez, N., “The use of *Aspergillus niger* in sustainable agriculture: Phosphate solubilization and biocontrol applications”, *J. Plant Nutr. Soil Sc.*, 180 (4), 455-463, (2017).

Klepzig, K.D., Adams, A.S., Handelsman, J. and Raffa, K.F., “Symbioses: a key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans”, *Environ. Entomol.*, 38 (1), 67-77, (2009).

Korol, L., Shklar, G. and Schiller, G., “Diversity among circum-Mediterranean populations of Aleppo pine and differentiation from Brutia pine in their isoenzymes: additional results”, *Silvae Genet.*, 51, 35-41, (2002).

Kowalski, T., “Oak decline: I. fungi associated with various disease symptoms on overground portions of middle-aged and old oak (*Quercus robur* L.)”, *Eur. J. Plant Pathol.*, 21, 136-151, (1991).

Kubatova, A., *Neglected Penicillium spp. associated with declining trees. In: integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification* (Eds. R.A. Samson and J.I. Pitt), Amsterdam, Netherlands: Harwood Academic Publishers: 299-307, (2000).

Kvas, M., Marasas, W.F.O., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. and Steenkamp, E.T., “Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* Complex”, *Fungal Divers.*, 34(2), 1-21, (2009).

Lubna, I., Khan, N., and Asaf, S. “*Aspergillus* species as plant growth promoters and phosphorous solubilizers”, *Microbiol. Res.*, 215, 56-66, (2018).

Ma, L. J., van der Does, H., Borkovich, K. et al. “Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*”, *Nature*, 464: 367-373, (2010).

Markovskaja, S., Kačergius, A., Davydenko, K. and Fraser, S., “First record of *Neocatenulostroma germanicum* on pines in Lithuania and Ukraine and its co-occurrence with *Dothistroma* spp. and other pathogens”, *Forest Pathol.*, 46, 522-533, (2016).

McNee, W.R., Wood, D.L. and Storer, A.J., “Pre-emergence feeding in bark beetles (Coleoptera: Scolytidae)”, *Popul. Ecol.*, 29, 495-501, (2000).

Menkis, A., Vasiliauskas, R., Taylor, A.F.S., Stenström, E., Stenlid, J. and Finlay, R., “Fungi in decayed roots of conifer seedlings in forest nurseries, afforested clear-cuts and abandoned farmland”, *Plant Pathol.*, 55, 117-129, (2006).

Mezei, P., Grodzki, W., Blaženec, M. and Jakuš R., “Factors influencing the wind-bark beetles disturbance system in the course of an *Ips typographus* outbreak in the Tatra Mountains”, *For. Ecol. Manag.*, 312, 67-77, (2014).

Mohanta, T. K., and Bae, H., “The diversity of fungal genome”, *Biol. Proced. Online*, 17 (8), 1-9, (2015).

Moumeni, L., Gastebois, A., Gillmann, L., Papon, N., Benia, F., Bouchara, J.P. and Bounechada, M., “Investigating the prevalence of bark beetles of *Pinus halepensis* in the North East semi-arid region of Algeria”, *Biodiversitas*, 22 (7), 2755-2762, (2021).

Munoz, A.E.J., Sanz-Ros, A.V., Flores-Pacheco, J.A., Hantula, J., Diez, J. J., Vainio, E.J. and Fernández, M., “*Sydowia polyspora* dominates fungal communities carried by two *Tomicus* species in pine plantations threatened by *Fusarium circinatum*”, *Forests*, 8(4), 127, (2017).

Munoz, A.E.J., Martín, C., and González, A., “Assessment of *Tomicus* spp. infestation in pine stands of Northern Spain: a case study from Cantabria”, *For. Insect. Res. J.*, 27(4), 345-360, (2015<sup>a</sup>).

Nnakumusana, E.S., “Laboratory infection of mosquito larvae by entomopathogenic fungi with particular reference to *Aspergillus parasiticus* and its effects on fecundity and longevity of mosquitoes exposed to spore infections in larval stages”, *Curr. Sci.*, 54, 1221-1228, (1985).

Paine, T. D., Raffa, K. F. and Harrington, T. C., “Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi and live host conifers”, *Annu. Rev. Entomol.*, 42, 179-206, (1997).

Ritchie, H. and Roser, M., “Forests and deforestation [online]”, (09.08.2021), <https://ourworldindata.org/forests-and-deforestation>, (2021).

Romon, P., Iturrondobeitia, J.C., Gibson, K., Lindgren, B.S., and Goldarazena, A., “Fungal species associated with *Tomicus piniperda* in *Pinus radiata* plantations in northern Spain and their possible tree health implications”, *Can. J. For. Res.*, 37(1), 67-75, (2007).

Romon, P., Iturrondobeitia, J.C., Lindgren, B.S., and Goldarazena, A., “Susceptibility of *Pinus radiata* trees to *Tomicus piniperda* (Coleoptera: Scolytinae) attacks associated with tree age, crown class, and wounding”, *Can. J. For. Res.*, 38(5), 1186-1193, (2008).

Saanchez Garcia, F.J., Galian, J. and Gallego., D., “Distribution of *Tomicus destruens* (Coleoptera: Scolytinae) mitochondrial lineages: phylogeographic insights and niche modeling”, *Org. Divers. Evol.*, 15, 101-113, (2015).

Saanchez Garcia, F.J., Machado, V., Galian, J. and Gallego, D. “Application of the eco-field and general theory of resources to bark beetles: beyond the niche construction theory”, *Biosemiotics*, 10, 57-73, (2017).

Sabbatini-Peverieri, G., Capretti, P. and Tiberi, R., “Associations between *Tomicus destruens* and *Leptographium* spp. in *Pinus pinea* and *P. pinaster* stands in Tuscany, central Italy”, *Forest Pathol.*, 36, 14-20, (2006).

Sarikaya, O. ve Avcı, M. “Distribution and biology of the Mediterranean pine shoot beetle *Tomicus destruens* (Wollaston, 1865) in the Western Mediterranean region of Turkey”, *Turk. J. Entomol.*, 34 (3), 289-298, (2010).

Sarikaya, O. ve Avcı, M., “Türkiye Kızılçam ormanları zararlı faunasından Akdeniz Orman Bahçivani *Tomicus destruens* (Woll. 1865) (Col.: Scolytidae)”, *Orman ve Av*, 4, 31-34, (2007).

Sarikaya, O., “Batı Akdeniz Bölgesi iğne yapraklı ormanlarının Scolytidae (Coleoptera) faunası”, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Orman Mühendisliği Anabilim Dalı, Isparta, (2008).

Sarikaya, O., Örucü, Ö.K., Yıldız, Y., Alpagut-Keskin, N. ve Şen, İ., *Akdeniz Orman Bahçivani'nin [*Tomicus destruens* (Wollaston) (Col.: Scolytinae)] Türkiye çam ormanlarındaki yayılışı ile tür içi genetik çeşitliliğinin tespiti ve iklim değişikliğinin gelecekteki yayılış alanı üzerine etkilerinin belirlenmesi*, TÜBİTAK 1001, Proje No: 1170652, (2022).

Sarikaya, O., ve Avcı, M., “Bark beetle fauna (Coleoptera: Scolytinae) of the coniferous forests in the Mediterranean region of Western Turkey, with a new record for Turkish fauna”, *Turk. J. Zool.*, 35(1), 33-47, (2011).

Sauvard, D., “Capacité de multiplication de *Tomicus piniperda* L. (Coleoptera: Scolytidae)”, *J. Appl. Entomol.*, 108, 164-181, (1989).

Scholte, E.J., Njiru, B.N., Smallegange, R.C. and Takken Knols G.J., “Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*”, *Malar J.*, 2,1-8, (2003).

Seifert, K.A. and Frisvad, J.C., *Penicillium on solidwood products. In: Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus classification* (Eds. R.A. Samson and J.I.Pitt), Amsterdam, Netherlands: Harwood Academic Publishers, 285-298, (2000).

Shan, L., Haseeb, H.A., Zhang, J., Zhang, D., Jeffers, D.P., Dai, X. and Guo, W., "A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of toxigenic *Fusarium temperatum* in maize stalks and kernels", *Int. J. Food Microbiol.*, 291, 72-78, (2019).

Shannon, C.E. *A Mathematical Theory of Communication*, The Bell System Technical Journal, 27, 379-423, (1948).

Silva, X., Terhonen, E., Sun, H., Kasanen, R., Heliövaara, K., Jalkanen, R., and Asiegbu, F. O., "Comparative analyses of fungal biota carried by the pine shoot beetle (*Tomicus piniperda* L.) in northern and southern Finland", *Scand. J. For. Res.*, 30 (6), 497-506, (2015).

Six, D.L., *Bark beetle–fungus symbioses*, In *Insect symbiosis* (Eds K. Bourtzis and T. A. Miller), New York: CRC Press, 97-114, (2003).

Six, D.L., Poulsen, M., Hansen, A.K., Wingfield, M.J., Roux, J., Eggleton, P., Slippers, B., and Paine, T. D., "Anthropogenic effects on interaction outcomes: examples from insect-microbial symbioses in forest and savannah ecosystems", *Symbiosis*, 53, 101-121, (2011).

Six, D.L., "Ecological and evolutionary determinants of bark beetle-Fungus Symbioses", *Insects*, 3 (1), 339-366, (2012).

Su, X., Zou, F., Guo, Q., Huang, J. and Chen, T.X., "A report on a mosquito-killing fungus, *Pythium carolinianum*", *Fungal Divers.*, 7, 129-133, (2001).

Talgø, V., Chastagner, G., Thomsen, I.M., Cech, T., Riley, K., Lange, K., Klemsdal, S.S. and Stensvand, A., "*Sydowia polyspora* associated with current season needle necrosis (CSNN) on true fir (*Abies* spp.)", *Fungal Biol.*, 114, 545-554, (2010).

Tewari, J.P., "Cellular alterations in the blackspot of rapeseed caused by *Alternaria brassicae*", *Phytopathology*, 73, 831, (1983).

Thomma, B.P.H.J., "*Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite", *Mol. Plant Pathol.*, 4(4), 225-236, (2003).

Varese, G.C., Gonthier, P. and Nicolotti, G., "Longterm effects on other fungi are studied in biological and chemical stump treatments in the fight against *Heterobasidion annosum* coll.", *Mycologia*, 95, 379-387, (2003).

Vega, F.E. and Biedermann, P.H.W., "On interactions, associations, mycetangia, mutualists and symbiotes in insect-fungus symbioses", *Fungal Ecol.*, 44, 1000909, (2019).

Vega, F.E., and Hofstetter, R.W., *Bark Beetles: Biology and Ecology of Native and Invasive Species* (Eds: Richard W. Hofstetter), Academic Press, (2014).

Verkley, G.J.M., Quaedvlieg, W., Shin, H.D., and Crous, P.W., “A new approach to species delimitation in *Septoria*”, *Stud. Mycol.*, 75, 213-305, (2013).

Villari, C., Sabbatini Peverieri, G., Riziero Tiberi, R. and Capretti, P., “The occurrence of fungal diseases on pine trees and their relationship with bark beetles”, IUFRO Working Party, 7.03.10, Proceedings of the Workshop, Gmunden/Austria, (2006).

Vu, D., Groenewald, M., de Vries, M., Gehrman, T., Stielow, B., Eberhardt, U., et al., “Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation”, *Stud. Mycol.*, 92, 135-154, (2019).

Vu, D., Groenewald, M., Szöke, S., Cardinali, G., Eberhardt, U., Stielow, B., et al., “DNA barcoding analysis of more than 9000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation”, *Stud. Mycol.*, 85, 91-105, (2016).

Wang, X., Zhang, X., Liu, L., and Xiang, M., “Application of *Aspergillus niger* in agricultural production: Enhancing crop yield and soil health”, *J. Agric. Food Chem.*, 63(37), 8469-8477, (2015).

Wang, Y., Wang, C., Wang, L., Zhang, X., Yan, J., Wang, J. and Wang, M., “Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Fusarium proliferatum* causing ear and kernel rot on maize”, *Crop Protion*, 132, 105142, (2020).

Wood, S.L., “The bark and ambrosia beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae), a taxonomic monograph”, *Gt. Basin Nat. Mem.*, 6, 1–1359, (1982).

Wood, S.L., and Bright, D.E., “A catalog of Scolytidae and Platypodidae (Coleoptera), Part 2: Taxonomic index”, *Gt. Basin Nat. Mem.*, 13, 1-6, (1992).

Wu, C., Chen, S., Yang, M. and Zhang, Z., “spatial distribution pattern and sampling plans for two sympatric *Tomicus* species infesting *Pinus yunnanensis* during the shoot-feeding phase, *Xylosandrus compactus* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) are spatially segregated on the insect body”, *Environ. Entomol.*, 45, 883-890, (2023).

Xie, J., Shi, H., and Du, Z., “*Aspergillus* species as effective plant growth promoters and their potential applications in sustainable agriculture”, *Front. Microbiol.*, 10, 1470, (2019).

Yang, L.H. and Gratton, C., “Insects as drivers of ecosystem processes”, *Curr. Opin. Insect Sci.*, 2, 26-32, (2014).

Ye, H. and Ding, X.S., “Impacts of *Tomicus minor* on distribution and reproduction of *Tomicus piniperda* (Col., Scolytidae) on the trunk of the living *Pinus yunnanensis* trees”, *J. Appl. Entomol.*, 123, 329-333, (1999).

Yoo, G., Lee, J., and Chung, H., “Plant growth promotion by *Aspergillus* species: mechanisms and applications”, *J. Appl. Microbiol.*, 125(4), 1024-1035, (2018).

Zhou, Y., Zou, X., Zhi, J., Xie, J. and Jiang, T., “Fast recognition of *Lecanicillium* spp., and its virulence against *Frankliniella occidentalis*”, *Front. Microbiol.*, 11, 561381, (2020).

