



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



ENTOMOPATOJENİK *Beauveria bassiana* İZOLATLARININ PROTEAZ ENZİM AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi

Bengi ALDI

Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2019

EGE ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

**ENTOMOPATOJENİK *Beauveria bassiana*
İZOLATLARININ PROTEAZ ENZİM
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bengi ALDI

Danışman: Prof. Dr. Alev HALİKİ UZTAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı

İZMİR

2019

KABUL ONAY SAYFASI

Bengi ALDI tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “Entomopatojenik *Beauveria bassiana* İzolatlarının Proteaz Enzim Aktivitelerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 10/09/2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur,

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Alev HALİKİ UZTAN

Raportör Üye: Doç.Dr.Özlem ABACI GÜNYAR

Üye : Doç.Dr.Evrin ÖZKALE KAYA

İmza

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Entomopatojenik *Beauveria bassiana* İzolatlarının Proteaz Enzim Aktivitelerinin Araştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

10/ 09 / 2019



Bengi ALDI

ÖZET

ENTOMOPATOJENİK *Beauveria bassiana* İZOLATLARININ PROTEAZ ENZİM AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

ALDI, Bengi

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Alev HALİKİ

UZTAN Eylül 2019, 71 sayfa

Bu tezde entomopatojen olan *Beauveria bassiana* izolatlarının proteaz enzim aktiviteleri incelenmiştir. *Beauveria bassiana*' yı böylesine önemli kılan özellikleri çok çeşitli ve etkin virulans faktörlerine ve toksinlerine sahip olmasıdır.

Fenotipik ve genotipik tayinleri yapılmış olan toplamda 31 adet *Beauveria bassiana* izolatu ile çalışılmıştır. Bütün izolatlar proteaz enzim ön taraması yapılmak üzere Skim milk agara inokule edilmiştir. Skim milk agarda kontaminasyonu önlemek amacıyla plateleme yöntemi kullanılmıştır. Bunun için öncelikle gliserol içeren cryo tüplere stok kültürler hazırlanmıştır. 5 gün inkübasyon süresi sonunda izolatların koloni ve zon çapları ölçülmüştür.

Fungal izolatlar proteaz aktivitesi yönünden ICMC (Index of Relative Enzyme Activity) kriterlerine göre proteaz enzim aktivitesi yüksek ve düşük olarak sınıflandırılmıştır. Buna göre 12 izolat çok yüksek proteaz aktivitesine sahip olarak değerlendirilmiştir. Diğer izolatlardan 9 tanesi yüksek ve 10 tanesi de orta düzeyde aktivite göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Entomopatojen fungus, *Beauveria bassiana*, proteaz



ABSTRACT**INVESTIGATION of PROTEASE ENZYME ACTIVITIES of
ENTOMOPATHOGENIC *Beauveria bassiana* ISOLATES**

ALDI, Bengi

MSc in Biology Department

Supervisor: Prof. Dr. Alev Haliki

Uztan September 2019, 71 pages

In this thesis, protease enzyme activities of entomopathogenic *Beauveria bassiana* isolates were investigated. What makes *Beauveria bassiana* so important is that it has a wide variety of effective virulence factors and toxins.

Phenotypic and genotypic determinations were performed and 31 *Beauveria bassiana* isolates were studied. All isolates were inoculated into Skim mil agar for protease enzyme pre-screening. Plating method was used to prevent contamination on skim milk agar. For this, stock cultures were prepared primarily in cryo tubes containing glycerol. After 5 days incubation period, colony and zone diameters of the isolates were measured.

Fungal isolates were classified as high and low protease enzyme activity according to ICMC (Index of Relative Enzyme Activity) criteria for protease activity. Accordingly, 12 isolates were evaluated as having very high protease activity. 9 of the other isolates showed high activity and 10 of them showed moderate activity.

Keywords: Entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, protease

ÖNSÖZ

Doğal düşmanların ve mikrobiyal patojenlerin kullanıldığı mücadele sisteminde entomopatojen funguslar önemli bir yer tutmaktadır. Bizim araştırma konumuz olan *Beauveria bassiana* doğada geniş yayılım gösterir ve yaklaşık 90 kadar zararlı böceğe karşı kontrol potansiyeline sahiptir. *Beauveria bassiana*'nın önemli virülans faktörlerinden bir tanesi de proteaz enzimidir. Çalışmamızda entomopatojenik *Beauveria bassiana* izolatlarından proteaz enzimi taraması yapılarak, en etkin proteaz aktivitesine sahip izolatlar belirlenmiştir.

Entomopatojen fungusların biyolojik mücadelede kullanımı önemlidir. Çalışmamız bu anlamda biyolojik mücadele yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalara ışık tutacaktır.

Çalışma konusunun belirlenmesinde ve çalışmanın hazırlanmasında bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyerek bana yardımcı olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Alev HALİKİ UZTAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (2014 FEN 049). Bu nedenle, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na teşekkür ederiz.

İZMİR

10/09/2019

Bengi ALDI

İÇİNDEKİLERSayfa

KABUL ONAY SAYFASI	v
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	vii
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ.....	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xviii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Kimyasal Mücadele	3
2.2 Biyolojik Mücadele	3
2.3 Biyolojik Mücadelede Kullanılan Mikroorganizmalar.....	4
2.3.1 Bakteriler	4
2.3.2 Protozoonlar.....	5
2.3.1 Virüsler	6

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.3.4 Nematodlar.....	6
2.3.5 Entomopatojen Funguslar	7
2.3.5.1 Entomopatojen Fungusların Sınıflandırılması	7
2.3.5.2 Entomopatojen Fungusların Etki Mekanizmaları	11
2.3.5.3 Entomopatojen Fungusların Etki Şekilleri	12
2.3.5.4 Entomopatojen Fungusların Yayılımı	13
2.3.5.5 Entomopatojen Fungusların Kullanımındaki Avantaj ve Dezavantajlar ..	14
2.4 Beauveria bassiana.....	16
2.5 Proteaz.....	24
2.5.1 Fungal Proteazlar	247
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1 Gereç	29
3.1.1. Çalışma Materyalleri.....	29
3.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler.....	29
3.1.2.1 Besiyerleri	29
3.1.2.2 Çözeltiler.....	31
3.1.2.3 Kullanılan Cihazlar	32

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2 Yöntem	33
3.2.1 <i>Beauveria bassiana</i> İzolatlarının Canlandırılması	33
3.2.2 Gliserol ile Stok Kültür Hazırlanması	34
3.2.3 Proteaz Aktivitesinin Saptanması	34
3.2.4 Enzim Üretimi	34
3.2.5 Spektrofotometrik Yöntem ile Proteaz Aktivitesi Ölçümü	34
4. BULGULAR.....	39
4.1 İzolatların Petri ve Mikroskopta İncelenmesi.....	39
4.2 Enzim Taraması Sonuçları.....	40
4.3 Enzim Üretimi Sonuçları	42
5. TARTIŞMA.....	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	50
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	53
TEŞEKKÜR	67
ÖZGEÇMİŞ.....	68



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Entomopatojen fungus enfeksiyon şeması.....	12
2.2 <i>Beauveria bassiana</i> koloni görüntüsü.	18
2.3 <i>Beauveria bassiana</i> konidyal yapılar ve sporlar.....	19
2.4 <i>Beauveria bassiana</i> mikroskop görüntüsü	20
2.5 <i>Beauveria bassiana</i> 'nın major anti-mikrobiyal sekonder metabolitleri.....	21
2.6 <i>Beauveria bassiana</i> enfeksiyon şeması	22
2.7 Proteaz enziminin etki şekli	25
4.1 <i>Beauveria bassiana</i> koloni görüntüsü	39
4.2 <i>Beauveria bassiana</i> mikroskop görüntüsü, spor yapıları	39
4.3 Ank3 kodlu izolat- çok yüksek aktivite	40
4.4 Bb 12 kodlu izolat- yüksek aktivite	41
4.5 Den2 kodlu izolat- düşük aktivite.....	41



TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Entomopatojen fungusların fungi alemi içerisindeki taksonomik yerleri (Humber ,2008; Roy et al., 2006)	8
2.2 Entomopatojen FunguslarınÜrettiği Metabolitler(Sevim ve ark., 2015)......	13
2.3 <i>Beauveria bassiana</i> 'nın Enfekte Ettiği Bazı Konaklar.....	17
2.4 Ticari olarak üretilen <i>Beauveria bassiana</i> ve hedef zararlı grupları	23
3.1 <i>Beauveria bassiana</i> izolatlarına ait kodlar	29
4.1 Enzim tarama denemesi sonuçları	42
4.2 Enzim aktivite değerlendirmesi	43
4.3 Proteaz aktivite değerlendirmesi (U/ml)	44



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
°C	Santigrat derece
g	gram
dk	Dakika
PDA	Potato Dextroz Agar
MEA	Malt Extract Agar
MEB	Malt Extract Broth
TCA	Trikloro Asetik Asit
ICMC	Index of Relative Enzyme Activity
ICP	Insecticidal Crystal Protein
NPV	Nükleer Polihedroz Virüs
GV	Granuloz virüsleri
µm	Mikrometre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
g/L	gram/Litre



1. GİRİŞ

Dünyada pestisit kullanımından kaynaklanan olumsuz gelişmeler yeni çözüm arayışları içine girilmesine neden olmuştur. Düşünülen çözüm yöntemleri arasında iyi tarım uygulamaları ve organik tarıma yönelik mücadele ajanlarının kullanılması yer almaktadır. Biyolojik mücadele, doğanın kendi baskı mekanizmalarından yararlanılarak geliştirilmiş ve olumsuz etkileri yok denecek kadar az olan, sürdürülebilir tarım tekniklerine uygun, çevreye, insan ve hayvan sağlığına duyarlı bir mücadele yöntemidir. Biyolojik mücadelede asıl hedef zararlının tamamen ortadan kaldırılması değil, zararlının meydana getirdiği hasarın en aza indirilmesidir.

Bitki zararlısı olan eklembacaklılarla mücadelede kullanılan mikroorganizmalara entomopatojenler adı verilir. Entomopatojen olarak kullanılan mikrobiyolojik kontrol ajanları sırasıyla; bakteriler, funguslar, virüsler ve protozoonlardır. Doğal düşmanların ve mikrobiyal patojenlerin kullanıldığı bu mücadele sisteminde entomopatojen funguslar önemli bir yer tutmaktadır. Böceklerin biyolojik kontrolünde en fazla çalışılan mikroorganizmalar Ascomycota'nın Hypocreales ordosunda yer alan mitosporik entomopatojen funguslardır.

Bizim araştırma konumuz olan *Beauveria bassiana* doğada geniş yayılım gösterir ve yaklaşık 90 kadar zararlı böceğe karşı kontrol potansiyeline sahiptir. Bu fungus böceklerle karşı konidial spreyler olarak uygulanmakta; beyaz sinek, ekin biti ve yaprak biti gibi çok sayıda zararlı böceğe karşı arazide ve laboratuvarında kontrol etmeni olarak kullanılmaktadır. *Beauveria bassiana*' yı böylesine önemli kılan özellikleri çok çeşitli ve etkin virulans faktörlerine [invaziv özelliği, enzimleri (proteaz, kitinaz, lipaz) ve toksinleri (destruxin, beauvericin, beauverolide, bassianolide)] sahip olmasıdır.

B.bassiana'nın önemli virülans faktörlerinden bir tanesi de proteaz enzimidir. Bu çalışmada entomopatojenik *Beauveria bassiana* izolatlarının proteaz enzimi taraması yapılarak, en etkin proteaz aktivitesine sahip izolatlar belirlenmiştir. Bu

izolatlar üretim ortamına alınarak, enzim üretimi gerçekleştirilip aktiviteleri araştırılmıştır.

Fenotipik ve genotipik tayinleri yapılmış olan toplamda 31 adet *Beauveria bassiana* izolatu ile çalışılmıştır. Bütün isolatlar proteaz enzim ön taraması yapılmak üzere Skim milk agara inokule edilmiştir. Skim milk agarda kontaminasyonu önlemek amacıyla plateleme yöntemi kullanılmıştır. Bunun için öncelikle gliserol içeren cryo tüplere stok kültürler hazırlanmıştır. 5 gün inkübasyon süresi sonunda isolatların koloni ve zon çapları ölçülmüştür. Fungal isolatlar proteaz aktivitesi yönünden ICMC (Index of Relative Enzyme Activity) kriterlerine göre proteaz enzim aktivitesi yüksek ve düşük olarak sınıflandırılmıştır. Buna göre 12 izolat çok yüksek proteaz aktivitesine sahip olarak değerlendirilmiştir. Diğer isolatlardan 9 tanesi yüksek ve 10 tanesi de orta düzeyde aktivite göstermiştir. Araştırmamızın devamında; proteaz üretimi gerçekleştirilip, spektrofotometrik yöntemler ile aktivite tayini yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kimyasal Mücadele

Kimyasal mücadele uygulamaları, 1940'lı yıllarda sentetik pestisitlerin keşfedilmesinden sonra hızla artmış hastalık ve zararlılarla mücadelede tek kurtarıcı olarak görülmüş ve 1950'li yıllara kadar da uzun süreli olumsuz etkileri fark edilememiştir. (Uygun ve ark, 2010) Kimyasalların uzun vadede çevreye yaptıkları olumsuz etkiler geriye dönüşsüz olsa da; kimyasal mücadele, kolay uygulanabilmesi ve sonucunun hemen alınabilmesi gibi özellikleri nedeniyle diğerlerine oranla çok daha fazla kullanılan bir yöntem haline gelmiştir.

Örneğin, DDT' nin keşfinden önce 1940'lı yılların başına kadar zararlıların üründe meydana getirdiği kayıp için dünya ortalaması % 7 iken, 1980'lerin sonunda bu oran % 13'e yükselmiştir (Wilson, 1990). Ürün kaybındaki bu iki katlık oran farkı, ilaç devriminden sonra başlamış ve aynı dönem içinde ilaç kullanımında 12 katlık bir artış meydana geldiği görülmüştür (Poppy, 1997). Tarımsal zararlılara karşı yapılan kimyasal mücadelenin doğal yaşama karşı olumsuz etkileri bilimsel çalışmalarla tespit edilmiştir. Ürün kayıplarındaki bu artış, zararlılarda ilaçlara karşı dayanıklılığın artması, potansiyel zararlıların ekonomik zararlı durumuna geçmesi ve doğal düşmanların öldürülmesi nedeniyle doğal dengenin bozulmasından kaynaklanmıştır. Bunlara insan ve hayvan sağlığının tehdit edilmesi, gıda maddelerindeki ilaç kalıntıları, çevre kirlenmesi ve yüksek ilaç fiyatları da eklenince, kimyasal mücadeleye alternatif çevre dostu ve daha ucuz mücadele yöntemlerine geçilmesi zorunlu hale gelmiştir. Bu yöntemlerden en ümit verici, en çevre dostu, en ucuzu ve en sürdürülebilir olanı ise "Biyolojik Mücadele" dir (Torrado-Leon et al., 2006).

2.2 Biyolojik Mücadele

Doğada her şeyi bulmak mümkündür. Sorunu da çözümü de doğa kendisi üretir (Bora ve Özaktan, 1998).

Biyolojik mücadele doğanın kendi baskı mekanizmalarından yararlanılarak geliştirilmiş ve olumsuz etkileri yok denecek kadar az olan bir mücadele yöntemidir. Biyolojik mücadele bir zararlı organizmanın etkisini daha aza indirmek ve daha zararsız hale getirmek için başka organizmaların kullanılmasıdır (Eilenberg vd., 2001).

Yaşadığımız çevrenin kirlenme problemleri, kullanılan tarımsal ilaçların insan sağlığına, doğaya zarar vermesi, kullanılan ilaçlara bir süre sonra bağıklık kazanılması ve tüketicilerin organik ürün tüketme eğilimleri göz önüne alındığında biyolojik mücadele dünyada gitgide daha fazla önem kazanmaktadır (Özaktan ve ark., 2010). Bu bakımdan gelişmiş ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de çevreye ve diğer canlılara zarar vermeyen, doğal ortamla uyumlu, sağlıklı ürün elde edilmeye yönelik tarımsal mücadele yöntemleri geliştirmek ve biyolojik mücadele yöntemlerini kullanıma geçmemiz büyük önem arz etmektedir. (Koz ve Güven, 2014).

Son zamanlardaki biyolojik mücadele anlayışı doğada bulunan faydalı organizmaların korunması ve etkinliklerinin artırılması yönündedir. Biyolojik mücadelede başarılı olabilmek için, zararlı türe, onun düşmanlarına yani faydalı böceklerle ve her ikisinin birbirleriyle ve çevreleriyle olan ilişkilerine ait biyolojik ve ekolojik bilgilere sahip olmak gerekmektedir (Coşkuntuncel Öztemiz, S, 2008).

2.3 Biyolojik Mücadelede Kullanılan Mikroorganizmalar

Mikrobiyal mücadele; biyolojik mücadele etmeni olarak bakteri, fungus, protozoa, virüs ve nematod gibi mikroorganizmaların kullanılması ile gerçekleştirilir (Lacey ve Goettel., 1995; Eilenberg vd., 2001; Demirbağ, 2008).

2.3.1 Bakteriler

Bakteriler; mikrobiyolojik mücadele ajanlarının temelini oluştururlar. Böceklerle karşı yapılan mücadelelerde, spor oluşturan ve fakültatif aerob bakterilerden kristal protein taşıyanları tercih edilmektedir (Katı, 2008). İnsektisidal kristal proteinler (Insecticidal Crystal Protein=ICP), çok sayıda tarım

ve orman zararlısı ile hastalık taşıyan vektörlerde toksik etki gösterip ölüme neden olurlar (Jackson and Saville, 2000; Katı, 2008; Azizoğlu ve ark., 2012).

Zararlı kontrolünde en yaygın kullanılan çevre dostu mikrobiyal patojen *Bacillus thuringiensis*'dir. *Bacillus thuringiensis* ürünleri farklı böcek takımlarına ait türlerin larva dönemlerinde larvaların orta bağırsağında hasar oluşturarak veya septisemiye yol açarak kontrol sağlamaktadır (Raymond, B., et al., 2010).

Sporlanma sırasında oluşturdıkları parasporal kristal proteinlerin ticari formülasyonları yapılmakta ve biyolojik kontrol amacıyla kullanılmaktadır (Tamez-Guerra, P., et al., 2004).

Bacillus thuringiensis ürünleri dünyada biyolojik mücadele amacıyla yaygın olarak kullanılmasına rağmen ülkemizdeki kullanımı sınırlıdır. Ancak son zamanlarda ülkemizde de birçok araştırmacı *Bacillus thuringiensis* ürünlerine yönelik kapsamlı çalışmalar yürütmektedir (Kurt, 2005; Tekin. 2012; Azizoğlu ve ark., 2012;).

Biyolojik mücadele bakımından ön plana çıkmış olan türler arasında *Bacillaceae* familyasından *Bacillus sphaericus*, *Paenibacillus popilliae* (Dutky) ve *P. lentimorbus*, *Entorobacteriaceae* familyasına ait bakterilerden *Serratia marcescens* de yer almaktadır (Kılınçer ve ark., 2010).

Serratia marcescens kitini parçalayabilen en etkili bakterilerden biridir ve potansiyel böcek patojeni olarak kullanılmaktadır (Brurberg et al., 1996; Vaaje-Kolstad et al, 2005).

2.3.2 Protozoonlar

Entomopatojenik protozoalar böcek popülasyonlarının düzenlenmesinde önemli role sahiptir (Maddox, 1987). Entomopatojenik protozoalar genellikle konukçuya özgüdürler ve kronik enfeksiyona sebep oldukları için yavaş etki gösterirler Bu organizmalar sadece yaşayan konukçularda gelişebilir ve ara konukçulara ihtiyaç duymaktadırlar (Azizoğlu ve ark., 2012).

İnsanlarda da hastalığa sebep olmaları biyolojik mücadelede sınırlandırıcı bir etmendir (Maddox, 1987; Azizoğlu ve ark., 2012).

Entomopatojenik protozoalar diğer mikrobiyal kontrol ajanlarına göre zararlı kontrolü uygulamalarında dezavantajlara sahiptir. Üremek için yaşayan bir konukçuya ihtiyaç duyarlar ve oldukça yavaş etki gösterirler. Bu yüzden de biyolojik mücadelede sınırlı uygulama alanına sahiptir. Bu organizmalar sadece yaşayan konaklarda gelişebilir ve ara konaklara ihtiyaç duymaktadır.

2.3.3 Virüsler

Böcek patojeni virüsler; Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera ve Diptera gibi böcek takımlarında hastalık yapabilmektedir (Nalçacıoğlu, 2008). Tanımlanan virüs gruplarından kontrol ajanı olarak en çok kullanılan Baculoviridae familyasıdır. Bu familyada yer alan Nükleer Polihedroz Virüs (NPV) ile Granuloz virüsleri (GV) başlıca biyolojik ajanlardır (Toprak, 2004).

Biyolojik mücadelede böcek virüslerinin, gen ifade vektörü ve gen terapi vektörü olarak kullanılma potansiyelleri, endüstriyel açıdan oldukça önem taşımaktadır (Anderson et al., 1996; Stanbridge and Dussupt, 2003).

Entomopatojen virüslerin kullanımını sınırlayan temel faktörlerden biri etki hızlarının düşük olması ve dar konukçu spektrumuna sahip olmalarıdır (Kılınçer ve ark., 2010).

2.3.4 Nematodlar

Biyolojik mücadelede Mermithidae, Allantonematidae, Neotylenchidae, Sphaerularidae, Rhabditidae, Steinernematidae ve Heterorhabditidae olmak üzere 7 nematod familyası ön plana çıkmıştır. Entomopatojen olan Heterorhabditidae ve Steinernematidae familyaları biyolojik mücadeledeki başarılarından dolayı en çok çalışılan familyalar olmuştur (Lacey et al., 2001).

Ticari önem açısından bakıldığında nematodlar bakterilerden sonra ikinci sırayı alan etmen grubunu oluştururlar (Flexner and Belnavis, 2000).

2.3.5 Entomopatojen Funguslar

Entomopatojen funguslar zararlı böcek popülasyonlarının baskı altında tutulmasında önemli rol oynayan biyolojik mücadele etmenleridir (Roy et al., 2006). Kısaca böceklerde hastalık oluşturan funguslar olarak tanımlayabiliriz.

Entomopatojen funguslar 100 yıldan fazla zamandan beri mikrobiyal mücadele etmeni olarak kullanılırlar; spesifik böcek türlerini enfekte eden obligat patojenler, bir çok böcek türünü enfekte eden genel patojenler ve fakültatif patojenler olarak kendi içlerinde gruplara ayrılabilirler (Hall and Papierok, 1982).

2.3.5.1 Entomopatojen Fungusların Sınıflandırılması

Fungi alemi içerisinde yaklaşık 90 cinse ait 700'den fazla entomopatojen fungus türü bulunduğu bilinmektedir (Hodge, 2003; Goettel et al., 2005; Sandhu et al., 2012). Bu fungusların çoğu Ascomycota ve Zygomycota filumları içerisinde bulunur. Ascomycota'daki bir çok tür ise Hypocreales, Zygomycota ve Entomophthoralean takımları içerisinde yer alır (Roy et al., 2006; Sevim ve ark., 2015).

Entomopatojen fungusların sınıflandırılmasında morfolojik ve moleküler özellikler birlikte kullanılmaktadır (Sevim ve ark., 2015).

Morfolojik özellikler:

- Böcekte meydana gelen enfeksiyon şekli,
- Koloni morfolojisi,
- Synnema yapısı,
- Spor şekil ve boyutları,
- Hiflerin yapısı,
- Sporların zincir oluşturup oluşturmaması,
- Fruiting body yapısı,
- Stroma ve konidiyoforların yapısı şeklinde sıralanabilir (Humber, 1997).

Moleküler Özellikler:

PCR temelli metotların kullanılması tür tayinlerinin yapılmasında büyük önem arz etmektedir (Meyling, 2008).

DNA dizi analizleri sonucunda elde edilen veriler ile yapılan filogenetik çalışmalarda entomopatojenik türlerin kritik taksonlardan oluştuğu ve bu ayrımın morfolojik olarak yapılamadığı belirtilmektedir (Rehner and Buckley, 2005; Bischoff et al., 2009).

DNA’da bulunan spesifik bölgelerin dizi analizlerinin yapılması filogenetik çalışmalarda kullanılmaktadır. Entomopatojen funguslar için de ITS gen bölgesi tür tayinlerinin yapılmasında ve de tür içi genetik çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Driver vd., 2000; Muro vd., 2003; Sevim ve ark., 2015). Aynı şekilde 18S ve EF1- α gen bölgeleride tür içinde korunmuş olmalarından ve yüksek çeşitlilik sağlamalarından ötürü entomopatojenik fungusların sınıflandırılması ile tür tayinlerinde kullanılmaktadır (Pantou et al., 2003; Rehner et al., 2006).

Tablo 2.1 Entomopatojen fungusların fungi alemi içerisindeki taksonomik yerleri (Humber ,2008; Roy et al., 2006)

Filum	Chytridiomycota
Filum	Neocallimastigomycota
Filum	Blastocladiomycota
Filum	Microsporidia
Filum	Glomeromycetes
Alt filum	Mucormycotina
Alt filum	Kickxellomycotina
	Orders Harpellales, Asellariales
Alt filum	Zoopagomycotina
Alt filum	Entomophthoromycotina
Takım	Entomophthoralean Familya
Cins	<i>Entomophaga</i>
	<i>Entomophthora</i>
	<i>Erynia</i>
	<i>Eryniopsis</i>

	<i>Furia</i>
	<i>Massospora</i>
	<i>Strongwellsea</i>
	<i>Pandora</i>
Familya	<i>Tarichium</i>
Cins	Neozygitaceae
	<i>Neozygites</i>
Alt alem	<i>Zoophthora</i>
Filum	Dikarya
Alt filum	Ascomycota
Sınıf	Pezizomycotina
Sınıf	Eurotiomycetes
Sınıf	Dothideomycetes
Sınıf	Laboulbeniomycetes
Sınıf	Lecanoromycetes (likenler)
Sınıf	Orbiliomycetes
Takım	Sordariomycetes
Familya	Hypocreales
Cins	Clavicipitaceae
	<i>Telemorf</i>
	<i>Hypocrella</i>
	<i>Metacordyceps</i>
	<i>Regiocrella</i>
	<i>Torrubiella</i>
	<i>Anamorf</i>
	<i>Aschersonia</i>
	<i>Metarhizium</i>
	<i>Nomuraea</i>
	<i>Paecilomyces</i> ⁺⁺
	<i>Pochonia</i>
	<i>Rotiferophthora</i>
Familya	<i>Verticillium</i> ⁺
Cins	Cordycipitaceae
<i>Telemorf</i>	
	<i>Cordyceps s.str.</i>
<i>Anamorf</i>	<i>Torrubiella</i>

	<i>Beauveria</i>
	<i>Engyodontium</i>
	<i>Isaria</i>
	<i>Lecanicillium</i>
	<i>Mariannaea*</i>
	<i>Microhilum</i>
Familya	<i>Simplicillium</i>
Cins	Ophiocordycipitaceae
Tele morf	
	<i>Ophiocordyceps</i>
Ana morf	<i>Elaphocordyceps</i>
	<i>Haptocillium</i>
	<i>Harposporium</i>
	<i>Hirsutella</i>
	<i>Hymenostilbe</i>
	<i>Paecilomyces</i> ⁺⁺
	<i>Paraisaria</i>
	<i>Sorosporella</i>
	<i>Syngliocladium</i>
	<i>Tolypocladium</i>
Filum	<i>Verticillium</i> ⁺
Alt filum	Basidiomycota
Sınıf	Pucciniomycotina
Takım	Pucciniomycetes
Alt filum	Septobasidiales
Alt filum	Ustialginomycotina
	Agaricomycotina

⁺⁺ Önceden *Paecilomyces* bölümünde Isarioidea içerisinde yer alan türler. Günümüzde bu türler *Paecilomyces*' den ve *Isaria*' dan kesin bir şekilde ayrılmıştır.

⁺ Önceden *Verticillium* bölümünde Prostrata içerisinde yer alan türler. Günümüzde bu türler *Verticillium*' dan kesin bir şekilde, ayrılmış fakat yeni sınıflandırılmaları yapılmamıştır.

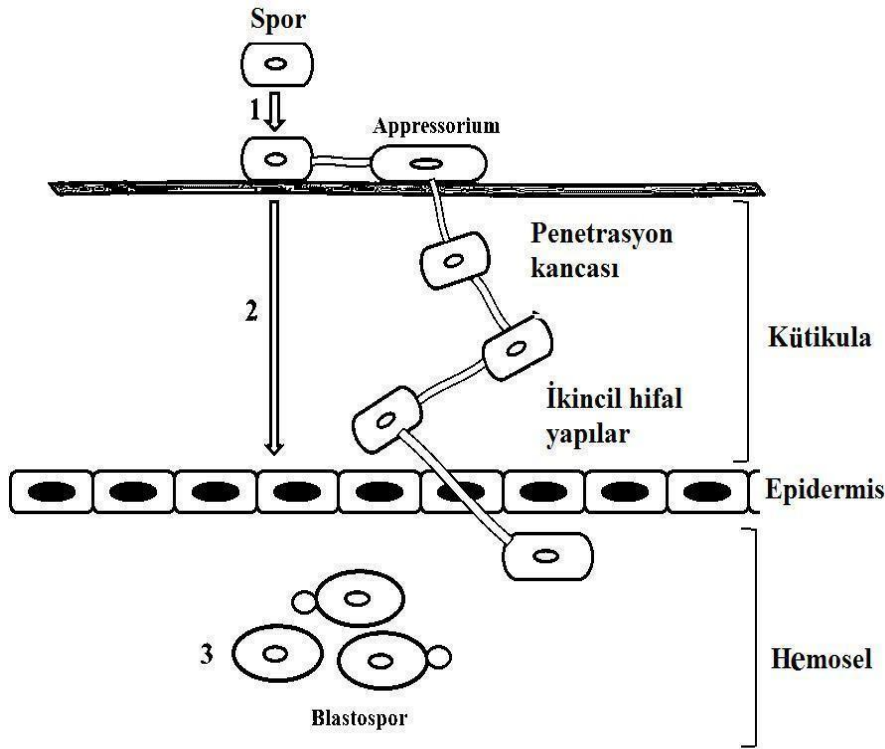
2.3.5.2 Entomopatojen Fungusların Etki Mekanizmaları

Entomopatojen funguslar spor çimlenmesi için uygun şartları bulduğunda konukçu içerisine aktif bir şekilde girebilmeleri, ucuz ve uygulaması kolay olması nedeniyle, en önemli biyolojik mücadele gruplarından biri olarak bilinirler (Demirci et al., 2011).Yapılan çalışmalarla mikrokapsüller içerisine alınan bu patojenlerin etkinliği gitgide artmaktadır (Rosas-García et al., 2015).

Entomopatojen fungusların yaşam döngüleri genellikle konaklarının gelişme safhaları ile eş zamanlı olarak gerçekleşmektedir (Shah ve Pell, 2003). Bakteri ve virüslerden farklı olarak, entomopatojen funguslar konaklarını bağırsağın yanı sıra, böceklerin solunum deliklerinden ve integumentin yüzeyinden de enfekte edebilirler. Bu özellik sayesinde konağı tarafından yenilmesine gerek yoktur ve böylece konak aralığı çiğneme yapan böcekler ile sınırlı kalmamaktadır (Fuxa, 1987). Bu durum entomopatojenfunguslara büyük bir avantaj sağlamaktadır (Lacey&Goettel, 1995; Goettel et al., 2005).

Entomopatojen fungusların yaşam döngüsünde öncelikle fungus enfektif bir spor üretir ve bu spor konağın kütikulasına tutunarak penetre olur. Bu aşamada; lipaz, proteaz ve kitinaz gibi kütikulayı parçalayan bazı enzimler konağa girişte önemli rol oynarlar (Clarkson and Chamley, 1996; Castrillo et al., 2005). Penetrasyondan sonra spor çimlenir germ tüpünü oluşturur. Sonra appressorium oluşur. Bu penetrasyon işlemi sıklıkla integümentin enfeksiyon bölgelerinde melanizasyon reaksiyonuna yol açar (Ferron, 1978). Sonra entomopatojen funguslar epidermise ve hipodermise penetre olmaktadır. Fakat bu süreçte, böcekte bulunan bazı savunma mekanizmaları patojeni etkisiz hale getirmeye çalışmaktadır. Eğer fungus konukçu böceğin savunma mekanizmasından geçmeyi başarırsa konukçusunun vücut boşluğuna ulaşarak istila etmekte ve sonuç olarak toksin üretimi veya fungal yapıların çoğalması gibi nedenlerle böceğin ölümüne neden olmaktadır (Shah and Pell, 2003; Goettel ve ark., 2005). Böceğin ölümünden sonra fungus burada sporlarını üretir ve bu yeni oluşmuş sporlar başka bir konağı enfekte edebilir. Uygun koşullar olduğu sürece, bu yaşam döngüsü devam eder (Hajek and Leger, 1994).

Entomopatojen fungusların hastalık oluşturmada abiyotik faktörlerin önemi büyüktür (Goettel ve ark., 2005). Ayrıca fungusun virulensliği, spor yoğunluğu, konukçu böceğin fizyolojik ve biyolojik durumu, böceğin popülasyon yoğunluğu gibi biyotik faktörlerde enfeksiyon oluşması için önem arz etmektedir(Kushiyev ve ark., 2018).



Şekil 2.1 Entomopatojen fungus enfeksiyon şeması (Sevim, 2010)

2.3.5.3 Entomopatojen Fungusların Etki Şekilleri

Entomopatojenik funguslar, ürettikleri metabolitler ve salgıladıkları toksinler sayesinde zararlı böcekleri öldürmektedir (Öncüler,1984; Zimmermann, 2007b). Üretilen bu metabolitlerin bazıları önemli patojenite etmenidir (Strasser vd., 2000).Çoğu çalışmada birçok araştırmacı,en önemli mikrobiyal mücadele etmeni oldukları için *Beauveria spp.* ve *Metarhizium anisopliae* tarafından üretilen metabolitler üzerine araştırmalarını sürdürmüştür (Zimmerman, 2007a). Bu metabolitlerin bazıları tablo2.2'de verilmiştir (Sevim ve ark., 2015).

Tablo 2.2 Entomopatojen Fungusların Ürettiği Metabolitler (Sevim ve ark., 2015).

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

2.3.5.4 Entomopatojenik Fungusların Yayılımı

Toprak, birçok organizmaya ev sahipliği yaptığı gibi entomopatojen funguslar için de önemli bir yaşam alanıdır, topraktan izole edilen entomopatojen funguslar biyolojik mücadele açısından büyük önem taşımaktadır (Roberts, 1989; Yıldız, 2015). Toprak, fungusları UV ışınlarından koruyup, biyotik ve abiyotik faktörlere karşı tampon görevi gördüğü için fungusların uzun süre canlı kalmasını sağlar (Samson et al., 1988; Keller & Zimmermann 1989). Hypocreales takımına ait *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* ve *Paecilomyces* spp. gibi pek çok entomopatojen fungus yaşam döngülerinin çoğunu toprakta geçirmektedir (Keller, 1989; Jackson et al., 2000).

Hypocreales ordosuna ait entomopatojen fungusların enfektif yapıları, ölü böcekler üzerinden rüzgar ve yağmur gibi pasif etmenlerle yayılım gösterir (Meyling and Eilenberg, 2007). Entomophthoralean ordosundaki fungusların sporları, hidrostatik basınç altında aktif olarak salınmaktadır ve sporların yayılımı, rüzgarla gerçekleşmektedir (Shah and Pell, 2003). Entomopatojen funguslar canlı olan enfekte böcekten diğer böceğe bulaşarak da yayılabilirler (Sevim ve ark., 2015). Bunun yanında bazı eklem bacaklıların entomopatojenik türlerin yayılımının da görev aldığı bilinmektedir (Dromph, 2003).

Entomopatojen fungusların yayılımında etkili olan faktörlerden birisi de olumsuz çevre koşullarında ürettikleri uzun süre toprakta kalabilen resting sporlardır (Goettel et al., 2005).

2.3.5.5 Entomopatojen Fungusların Kullanımındaki Avantaj ve Dezavantajlar

Entomopatojen fungusların biyolojik mücadelede kullanımındaki avantajlar aşağıdaki gibi sıralanabilir: (Demirbağ, 2008; Sevim, 2010; Sevim ve ark., 2015)

- Entomopatojenik funguslar diğer entomopatojenik organizmalara göre daha geniş konukçu aralığına sahiptirler.
- Konak seçicilikleri yüksektir. Zararsız ve yararlı böcek populasyonlarını etkilemeden, zararlı böceklerle etki ederler. Böylece doğal ekosisteme zarar vermezler.
- Sıcakkanlılar üzerinde toksik etkileri bulunmaz veya bu etki yok denecek kadar azdır.
- Uygulama sonrasında çevrede uzun süre kalarak biyolojik mücadelede etkili olurlar.
- Çoğunlukla konağın tüm gelişme fazlarını enfekte ederler.
- Konaklarının hızlı ölümüne sebep olurlar.
- İnsektisitler ile birlikte kullanılabilirler.
- Biyoteknolojik araştırmalar açısından geliştirilmeye uygundur.

Entomopatojen fungusların biyolojik mücadelede kullanımındaki dezavantajlardan bazıları ise aşağıdaki gibidir: (Klingen and Haukelan, 2006; Kushiyeu, 2018)

- Entomopatojen funguslar kimyasal mücadeleye göre zararlıları daha uzun sürede öldürürler.
- Uygulama sırasındanem, sıcaklık gibi bazı çevre koşullarına ihtiyaç duyarlar.
- Konak aralıkları geniş olduğu için etkinlikleri farklı böceklerde değişkenlik gösterebilir.
- Fungal izolatlarınsaklanması için özel koşullara ihtiyaç vardır.
- Zararlıyı öldürürken toksin salgılayabilirler ve bu toksinlerin diğer canlılar üzerindeki etkileri tam olarak bilinmemektedir.

Bazı dezavantajların izolat seçimi, formülasyon oranı ve değişik uygulama teknikleri sayesinde ortadan kaldırılabilceği düşünülmektedir. (Goettel ve ark., 2005; Sevim ve ark., 2015).

2.4 *Beauveria bassiana*

Domain: *Eukaryota*

Kingdom: *Fungi*

Phylum: *Ascomycota*

Subphylum: *Pezizomycotina*

Class: *Sordariomycetes*

Subclassis: *Hypocreomycetidae*

Order: *Hypocreales*

Family: *Cordycipitaceae*

Genus: *Beauveria*

Species: *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana (Balsamo-Crivelli) geniş konukçu kitlesine sahip Hypocreales (Ascomycota) takımına bağlı entomopatojen fungus türlerinden biridir (McCoy 1971; Rehner, 2005).

Beauveria bassiana ilk kez 1835 yılında İtalyan araştırmacı Agostino Bassi di Lodi tarafından ipek böcekleri (*Bombyx mori*) üzerinden izole edilip tanımlanmış ve böceklerde hastalık yapabileceği gösterilmiştir (Webster and Weber, 2007).

B. bassiana, ılıman ve tropik bölgelerde bulunan kozmopolit bir mantardır. *Beauveria*'ları böcek, mayt ve topraktan izole etmek mümkündür (Larone, 2002). *B. bassiana* yaklaşık 90 kadar zararlı böcek üzerinde kontrol potansiyeline sahiptir (Kıslı, 2000).

Tablo 2.3 *Beauveria bassiana*'nın Enfekte Ettiği Bazı Konaklar

Order	Susceptible hosts
Coleoptera	<i>Lathrobium brunnipes</i> , <i>Calvia quattuordecimguttata</i> , <i>Phytodectra olivacea</i> , <i>Otiorhynchus sulcatus</i> , <i>Sitona lineatus</i> , <i>S. sulcifrons</i> , <i>S. macularius</i> , <i>S. hispidulus</i> , <i>Anthonomus pomorum</i> , <i>Hylaster ater</i>
Heteroptera	<i>Picromerus bidens</i> , <i>Anthocoris nemorum</i>
Lepidoptera	<i>Hepialus</i> spp., <i>Hypocrita jacobaea</i> , <i>Cydia nigricans</i>
Diptera	<i>Leria serrata</i>
Homoptera	<i>Eulecanium</i> spp.
Hymenoptera	<i>Ichneumonidae</i> , <i>Lasius fuliginosus</i> , <i>Vespula</i> spp., <i>Bombus pratorum</i>

Beauveria bassiana böceklerle karşı konidial spreyler olarak uygulanmaktadır. *B. Bassiana* beyazsinek, ekinbiti ve yaprakbiti gibi çok sayıda zararlı böceğe karşı arazide ve laboratuarda kontrol ajanı olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında *B. bassiana* 'nın hedef olmayan organizmalara da zarar vermediği bilinmektedir.

Makroskobik Özellikler:

PDA'da (Potato Dextroz Agar) *Beauveria bassiana* kolonileri 8 günde 8–23 µm olur.

Yüzeyi tozsuz olan pamuksu görünümde koloniler oluşur.

Sinnema oluştururlar.

Koloni gençken beyaz, yaşlandıkça pembe-ten rengi olur.

Koloni altı renksiz görünür. Koku ve eksuda ve yoktur.

Beauveria bassiana 25° C' de üreyebilirken 35° C' de üreyemez (Tucker et al., 2004).



Şekil 2.2 *Beauveria bassiana* koloni görüntüsü (Society for Invertebrate Biology, 2013).

Mikroskopik Özellikler:

Batık hifler şeffaf, çeperleri düz, 1,5–3 μm eninde görülürken, havai hifler de düz çeperli 1–2 μm enindedir.

Mikroskopik incelemede tabanı şişkin konidyogenöz hücrelerin simpodiyal bir uzama ile zigzag oluşturmaları karakteristiktir

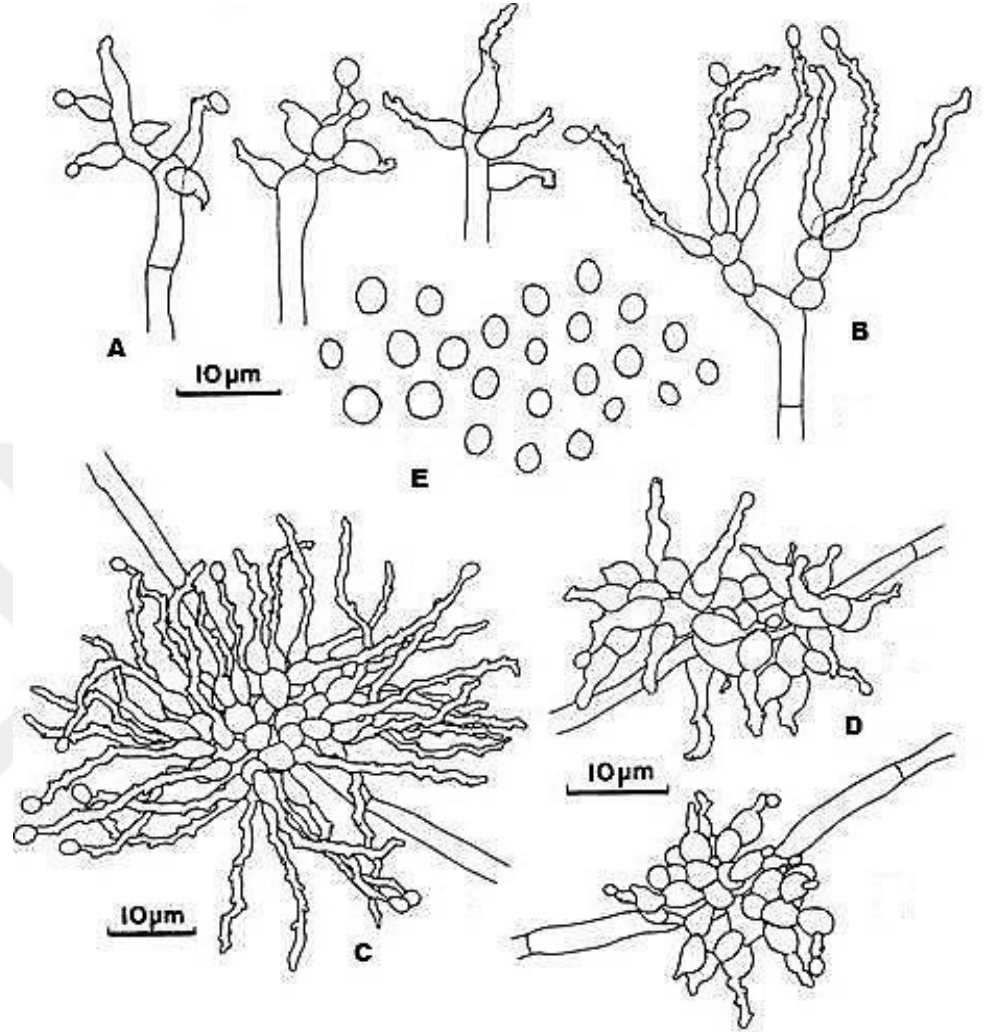
Konidyogenöz hücreler tek olmak yerine daha çok kümeler şeklinde dizilirler.

Konidiyogenöz hücreler elips şeklinde veya yarı silindirik şekildedir. Yanal hücreler üzerinde küçük gruplar halinde bulunabildiği gibi tek olarak da gelişebilmekte veya doğrudan hifler üzerinden gelişmektedir.

Globoz mikrokonidyumlar çok sayıda bulunur ve ufaktırlar, konidyoforlar çevresinde kümeler oluşturabilirler.

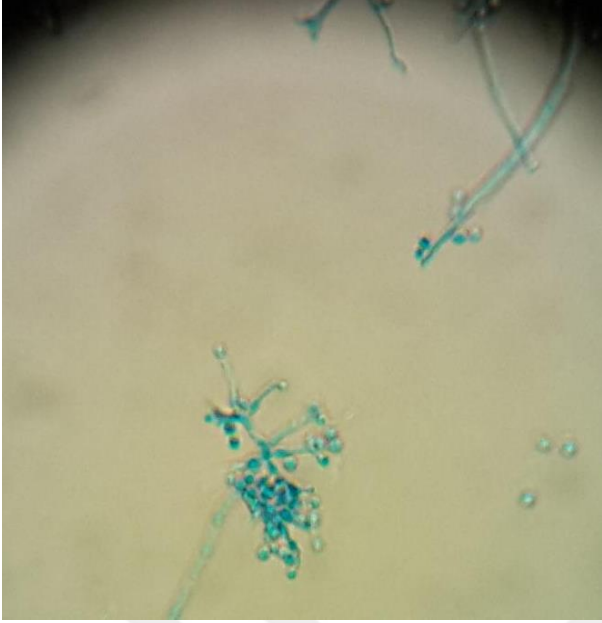
Küresel konidyogenöz hücreler 1,5–6 μm ölçülerinde; şişe şeklinde uzamış taban kısımları ise 3–6 x 2,5–3,5 μm ölçülerindedir, terminal hücreler salkım şeklinde olup 1 μm enindedir ve 20 μm 'ye kadar uzunlukta görülebilmektedirler.

Konidiler şeffaf, düz çeperli, küresel görünümündedir, 2–3 x 2–2,5 µm ölçülerindedir.



Şekil 2.3 *Beauveria bassiana* konidyal yapılar ve sporlar

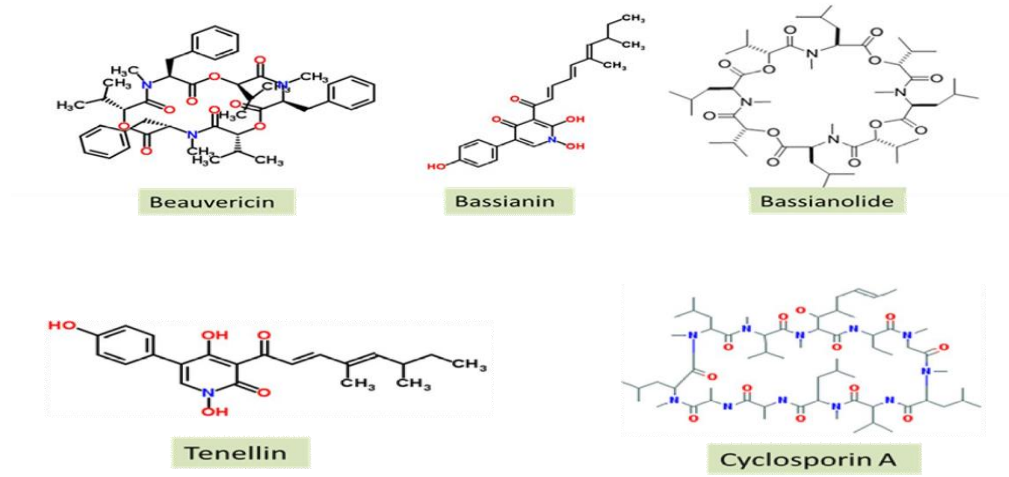
http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802230001 (Nisan 2015)



Şekil 2.4 *Beauveria bassiana* mikroskop görüntüsü (Yıldız, 2015)

B. bassiana, üstün bir entomopatojenik fungus olmasını sağlayan çeşitli sekonder metabolitler üretir. Beauverisin, bassianin, bassianolid, tenellin, destruksin B ve siklosporin A, *Beauveria bassiana* tarafından üretilen anahtar sekonder metabolitlerdir.

- Beauverisin üzerine yapılan araştırmalar, bu metabolitin insektisidal, antibiyotik, sitotoksik ve iyonoforik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Hücre zarı geçirgenliğini bozar, bu nedenle hücrede gerçekleşen olaylar zarar görür.
- Bassianin ve tenellin, eritrosit membran ATPazlarını inhibe eden, iki sarı renkli, peptit içermeyen sekonder metabolittir.
- Bassianolide, beauverisine benzer iyonoforik ve antibiyotik aktiviteye sahiptir.
- Bassiacridin toksik bir protein olup, düşük dozda *Locusta migratoria* enfekte eden ve neredeyse % 50 mortaliteye neden olan bir *B. bassiana* suşundan saflaştırılmıştır.
- Beauveritler, artroskleroz tedavisi için potansiyel adaylardır (Keswana et. Al, 2013).



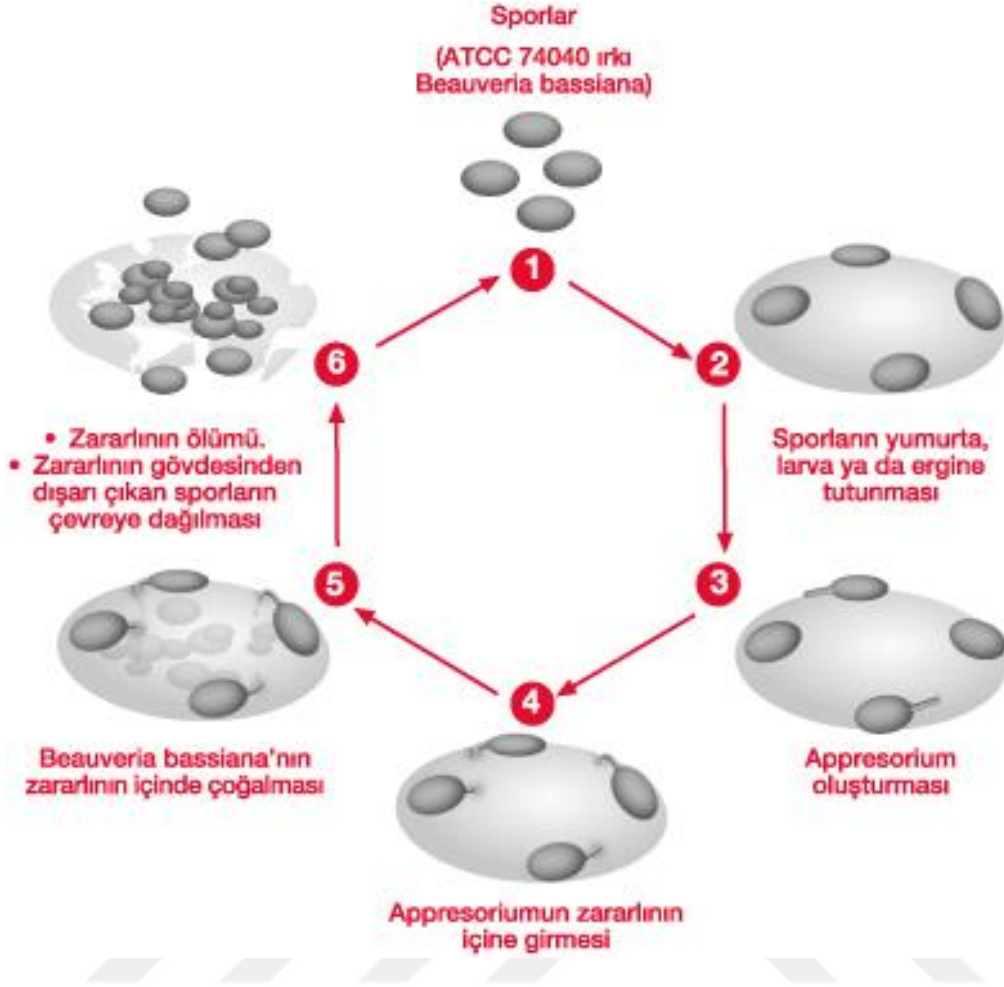
Şekil 2.5 *Beauveria bassiana* 'nın major anti-mikrobiyal sekonder metabolitleri (Keswana et. al, 2013).

B. bassiana 'nın çeşitli virulans faktörleri arasında enzimleri de yer almaktadır. Kütinaz, lipaz ve proteaz bu enzimler arasında ilk sırayı almaktadır.

Entomopatojen olan *Beauveria bassiana* gibi anamorfik funguslar genellikle zararlı popülasyonlara toplu halde uygulanan biyolojik kontrol ajanı olarak geliştirilmektedir (Saenz-de Cabezón Irigaray et al., 2003).

Bu fungusların uygulamalar esnasında biyotik çevre içerisinde çoğalacakları ve devamlı kalacakları beklentisi azdır.

Dolayısıyla bu funguslarla ilgili yapılan çalışmalar temel ekolojilerinden ziyade biyopestisit olma yönleri ile ilgilidir.



Şekil 2.6 *Beauveria bassiana* Enfeksiyon döngü şeması (Keswana et al., 2013)

Tablo 2.4 Ticari olarak üretilen *Beauveria bassiana* ve hedef zararlı grupları

Ticari Ürün Adı	Fungus Türü	Hedef Zararlı	Üretici Firma ve Ülke
Ostrinil	<i>Beauveria bassiana</i>	Mısır Kurdu	Natural Plant Protection (NPP), Fransa
Bemisin	<i>Beauveria bassiana</i>	Hemiptera (beyazsinekler)	Probiagro, Venezuela
Conidia	<i>Beauveria bassiana</i>	Kahve kurtları	Live System Technology, Kolombiya
Tri-Sin	mix with <i>B. bassiana</i> and <i>M. anisopliae</i>	Hemiptera (Psyllidae)	Agrobiologicos del Noroeste S.A. de C.V. (Agrobionsa), Meksika
Priority	<i>Beauveria bassiana</i>	Acari (Tetranychus urticae, Panonychus ulmi, Aculus schlectendall)	T.Stanes & Company, Hindistan
Mycotol GH	<i>Beauveria bassiana</i>	Çekirgeler	Mycotech, USA
ComGuard	<i>Beauveria bassiana</i>	Avrupa Mısır kurdu	Mycotech, USA
Mycotol WP ve Botanigard	<i>Beauveria bassiana</i>	Beyaz sinekler, Afidler, Çekirgeler	Mycotech, USA
Naturalis-L	<i>Beauveria bassiana</i>	Pamuk zararlıları	Troy Biosciences, USA
Proecol	<i>Beauveria bassiana</i>	Lepidoptera larvaları	Probioagro, Venezuela
Boverin	<i>Beauveria bassiana</i>	Patates Böceği	Former, Rusya
Boverol	<i>Beauveria bassiana</i>	Patates Böceği	Çekoslovakya

B. bassiana biyolojik kontrol ajanı olarak tescil edilmeden önce insanlara karşı etkileri araştırılmıştır. Küçük vakalarda, endüstriyel üretimde çalışan bazı işçile düzenli olarak yüksek spor konsantrasyonlarına maruz kaldıklarından, *B. bassiana* bazlı formülasyonlar alerjilere neden olmuştur. Bu bulgular, *Beauveria* türlerinin konidiumların alerjik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Alerjinin yanı sıra, *B. bassiana*'nın insanlarda ve diğer memelilerde mikotik keratitin nedeni olarak bildirildiği bazı durumlar vardır. Genel olarak, nadir görülen fakat tıbbi açıdan önemli fungus patojenlerinin çizelgelerinde, *Beauveria* cinsi gösterilmemiştir (Keswana et. al, 2013; Zimmerman, 2007a).

2.5 Proteaz

Proteazlar, proteinlerin hidrolizini gerçekleştiren enzimlerdir.

Endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin %80'i polimerlerin doğal yapısını bozabilme yeteneğine sahip olan hidrolazlardır. Endüstriyel açıdan çok önemli olan bu enzim türünün %60'ını ise proteazlar oluşturmaktadır (Polgar, 1989).

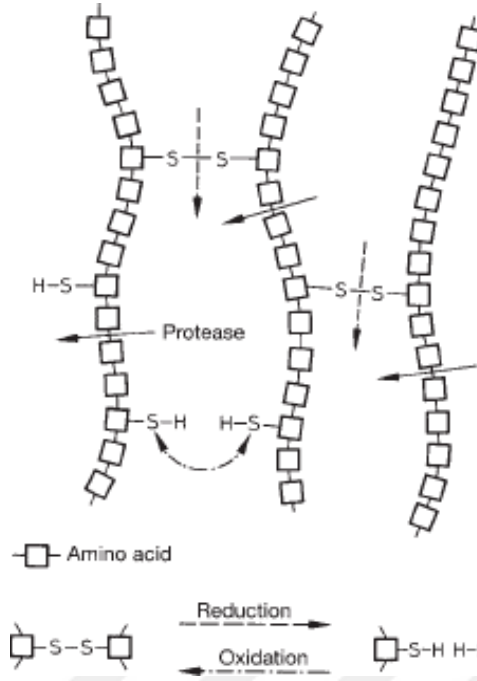
Proteinaz ve peptidazlar olarak da bilinmektedir. Diğer enzimler gibi proteazlar da protein yapısındadırlar (Rao et. All., 2009).

Proteazlar, doğada çok çeşitli olarak bulunan proteinlerdeki peptid bağlarının kırılmasını katalizleyen enzim grubudur.

Proteazlar bütün canlı organizmalarda bulunan, hücrenin gelişmesi ve farklılaşması için gerekli olan enzimlerdendir.

Proteinlerin hidrolizinde spesifik katalitik role sahiptirler (Rawlings et al., 2007).

Bu enzimler, çok çeşitli olmalarının yanında metabolizma, gen ekspresyonun regülasyonu, patojenite ve transportta büyük protein moleküllerinin küçük moleküllere hidrolizi ve bunun gibi biyolojik olaylarda önemli görevler yapmaktadır (Kataoka et al., 2005).



Şekil 2.7 Proteaz enziminin etki şekli (Aehle, 2007).

Son on yılda gıda, deri, farmasötik, biyolojik atık giderimi ve tekstil endüstrisinde protein bazlı boyaların uzaklaştırılmasında alkalin proteaz uygulamaları çok hızlı bir şekilde artmıştır.

Memelilerin sindirim sistemlerinde çok önemli bir role sahip olan proteaz enzimi, mide ve pankreasta bol miktarda üretilerek besinlerdeki protein içeriğinin yapıtaşlarına ayrılmasını sağlar (Rao et al., 1998).

Diğer proteazların üretiminde bakteriler, mayalar, mantarlar ve bitkiler kullanılır.

Proteazın uygulama alanını belirleyen biyokimyasal parametreler:

- pH,
- Sıcaklık,
- İyon gereklilikleri,
- Spesifikklik,
- Aktivite ve kararlılık

Bu özellikler hidroliz edilecek olan peptid bağından bulunan aminoasitlere bağlıdır (Rai and Mukherjee, 2010).

Proteaz Kaynakları

Proteazlar doğada oldukça yaygın bulunan önemli enzim gruplarından birini oluşturmaktadır.

Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi canlı gruplarında geniş çeşitlilik göstermektedirler (De Azeredo et al., 2004).

Bitkilerden proteaz üretimi zaman gerektiren bir işlemdir.

Kültür koşullarının devamlılığı ve gelişme için gerekli olan iklim koşulları gibi faktörler bitkisel proteazların kullanımını yönlendirmektedir (Kumar and Takagi, 1999).

Papain, bromelin, keratinazlar ve fisin bazı iyi bilinen bitki orijinli proteazlardır.

Hayvansal orijinli proteazları pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve renin oluşturmaktadır (Ward, 1985).

Bu proteazlar büyük hacimlerde fazla miktarda saflaştırılabilmektedir.

Ancak bunların üretimi fazla miktarda çiftlik hayvanının kesimini gerektirdiği için tarımsal politikalarla yönlendirilmektedir.

Bitkisel ve hayvansal proteazların elde edilmesindeki kısıtlamalar nedeni ile mikrobiyal proteazlara karşı ilgi tüm dünyada artmaktadır (Kataoka et al., 2005).

Biyokimyasal çeşitlikleri ve genetik manipulasyonlara olanak sunması nedeni ile mikroorganizmalar uygun proteaz kaynaklarıdır (Kwon et al., 1994)

Mikrobiyal proteazlar dünya piyasasındaki enzim satışlarında yaklaşık olarak %40'ını kapsamaktadır (Kumar and Takagi, 1999).

Mikroorganizma kaynaklı proteazlar biyoteknoloji metodlarla elde edilmesini sağlayan özellikleri nedeni ile bitkisel ve hayvansal proteazlara karşı tercih edilmektedir

Mikrobiyal proteazlar uzun raf ömürleri ile ideal koşullarda haftalarca aktivitelerini kaybetmeden depolanabilmektedirler.

Proteazlar, mikroorganizmalar tarafından hücre içi ve hücre dışı olarak sentezlenirler.

Hücre içi proteazlar sporulasyon, farklılaşma, enzimlerin ve hormonların olgunlaşması, protein katlanması gibi hücresel ve metabolik olaylarda görev yapmaktadır.

Hücre dışı proteazların hücre dışı koşullarda hidrolitik ürünlerin hücre içine alınmasına imkan sağlamak gibi rolleri vardır (Haki ve Rakshit, 2003).

Hücre dışı üretilen ve fermantasyon besiyerine direkt olarak salgılanan mikrobiyal proteazlar üretilmelerindeki kolaylık nedeni ile bitkisel ve hayvansal proteazlara karşı tercih edilmektedirler.

2.5.1 Fungal Proteazlar

Funguslar, bakterilere göre daha çeşitli enzimler üretebilmektedir.

Fungal proteazlar pH 4.0-11.0 gibi çok geniş pH aralığında aktivite göstermekte ve çok geniş bir substrat spesifikliği sergilemektedirler.

Ancak, bu proteazların reaksiyon hızları ve bakteriyel proteazlara göre termo toleransları daha düşüktür (Rao et al., 1998).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1. Çalışma Materyalleri

Türkiye'nin çeşitli illerinden Hacettepe Üniversitesi'nde görevli Prof. Dr. Nevin Keskin tarafından izolasyonu gerçekleştirilen toplamda 31 adet *Beauveria bassiana* izolatu ile çalışılmıştır. Bu izolatların fenotipik ve genotipik tayinleri Ege Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görevli Prof. Dr. Alev Haliki Uztan, Doç Dr. Özlem Abacı Günyar ve Araş. Gör. Ayşegül Yoltaş tarafından yapılmıştır (Uztan et al., 2016). Bu izolatlara verilen kodlar tablo 3.1' de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 *Beauveria bassiana* izolatlarına ait kodlar

Ank3	SB2	SB4(b)	Aydın Kızılderköyü
Ank4	Ank11	Aydın Söke	KVL1
Manisa 019-020	Ank13	AnkH3	Den2
Bb19	Bb15	Bb12	Ordu
Ank10	Ank6	Ank1	SB1(b)
Lül2	Karaman Dilbileyen	Ank2	Den1
Aydın Akbük	Lül1	İst. Çatalca	Patates Böceği
Lül5	Bb3	Ank5	

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

3.1.2.1 Besiyerleri

Tez çalışması sırasında kullanılan çözeltiler aşağıdaki gibidir.

Besiyeri 1- Potato Dextrose Agar(PDA) (Merck, 110130)

Patates ekstraktı	4 g/L
Agar	15 g/L
Glikoz	20 g/L
Distile su	1 litre

PDA besiyeri ticari olarak hazır halde bulunmaktadır. Litrede 39 gr olacak şekilde distile su içerisinde çözündürülerek, 121°C’de, 1.1atm basınçta, 15 dakika otoklavlanmıştır. Saf kültürlerin stoklanması besiyeri kaynatılarak cam tüplere 5’er ml gelecek şekilde paylaştırılmıştır ve otoklavlandıktan sonra yatık halde dondurularak saf kültürlerin +4 ° C’ de saklanması kullanılmıştır.

Besiyeri 2- Malt Extract Agar (MEA)

Agar	20 g/L (Merck, 101613)
Glukoz	20 g/L (Sigma, SZBA3420V)
Malt ekstraktı	20 g/L (Merck, 105391)
Pepton	1 g/L (Merck, 107214)
Distile su	1 litre

Besiyeri bileşimi gereken miktar doğrultusunda tartılarak distile su ile karıştırılmıştır. 121°C’de 15 dk steril edildikten sonra, 15- 20 ml olacak şekilde petrilere dökülmüştür. Bu besiyeri morfolojik incelemeler için kullanılmıştır.

Besiyeri 3- Malt Extract Broth

Glukoz	20 g/L (Sigma, SZBA3420V)
Malt ekstraktı	20 g/L (Merck, 105391)
Pepton	1 g/L (Merck, 107214)
Distile su	1 litre

Besiyeri bileşimi gereken miktar doğrultusunda tartılarak distile su ile karıştırılmıştır. Besiyeri iyice çözündükten sonra 5 ml olacak şekilde cam tüplere paylaştırılır. 121°C'de 1,1 atm basınçta 15 dk steril edilir. Bu besiyeri izolatların gliserol stoğunu hazırlamak için çift kuvvet olarak kullanılmıştır.

Besiyeri 4- Skim Milk Agar

Skim milk powder	(Difco, 232100)
KH ₂ PO ₄	0.48g (Merck, 104873)
Nitrojen base	1.07g (Fluka Biochemica)
Na ₂ HPO ₄	0.71g (Merck Calbiochem®)
Agar	3g (Merck, 107214)
Distile su	180 ml

%10'luk Skim milk powder olacak şekilde gerekli miktarlarda tartım yapılır. Skim milk çözeltisi ve diğer kimyasallar birbirinden ayrı besiyeri şişelerine alınır. Mineral ortamı 121°C'de 1,1 atm basınçta 15 dk steril edilirken, skim milk çözeltisi 121°C'de içerisindeki bileşenler çökeleceğinden dolayı 105 °C'de, 10 dk steril edilir. Her iki karışımda steril edildikten sonra uygun sıcaklığa geldiklerinde birbiri ile karıştırılır. pH=7'ye ayarlanır. Sonrasında sterilpetrilere 15-20 ml olacak şekilde

paylaştırılmıştır. Bu besiyeri proteaz enzim aktivitesine bakmak için kullanılmıştır.

Besiyeri 5-Protease Screening Agar (PSA)

Skim milk powder (Difco, 232100)

K₂HPO₄ 0,1 g (Merck, 105101)

MgSO₄7H₂O 0,05 g (Merck, 105886)

KCl 0,05 g (Merck, 104936)

Agar 1,6 g (Merck, 107214)

Distile su 100 ml

Skim milk powder son konsantrasyonu % 4.8 olacak şekilde hazırlanır. Skim milk çözeltisi ve diğer kimyasallar birbirinden ayrı besiyeri şişelerine alınır. Mineral ortamı 121°C'de 1,1 atm basınçta 15 dk steril edilirken, skim milk çözeltisi 121°C'de içerisindeki bileşenler çökeleceği için 105 °C'de, 10 dk steril edilir. Her iki besiyeri de steril edildikten sonra uygun sıcaklığa geldiklerinde birbiri ile karıştırılır (Topal ve ark., 2000). Bu besiyeri proteaz enzim aktivitesine bakmak için kullanılmıştır.

3.1.2.2 Çözeltiler

Tez çalışması sırasında kullanılan çözeltiler aşağıdaki gibidir.

Çözelti 1- Gliserol Çözeltisi (%60'lık)

Gliserol 60ml (Merck, 104092)

Distile su 40ml

İzolatların gliserol stok kültürlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Çözelti 2- TCA (Trikloro Asetik Asit)

Enzim aktivitesini durdurmak için kullanılmıştır 10 g TCA 60 mL distile su içerisinde çözüldükten sonra son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır (Chi et all., 2007).

3.1.2.3 Kullanılan Cihazlar

- İnkübatör (Binder, Sanyo)
- Steril Kabin (LabcaireBH18)
- Terazi (Sartorius BP610)
- Otoklav (Hiclave HVE -50, Hirayama)
- Işık mikroskobu (OlympusCX22)
- Otomatik pipetler (Brand)
- Mikrodalga (ArçelikMD574)
- Hassas terazi (Denver Instrument)
- pH metre (WTW)
- Buzdolabı (Beko)
- Vortex (Heidolph)
- Çalkalamalı inkübatör (Shaker)- ZHICHENG- ZHWY-2112B
- Su banyosu
- Isıtıcı-karıştırıcı- Biosan Magnetic Stirer MSH300
- Santrifüj (Hettich®-ROTINA 35/35R) (API)
- Spektrofotometre (Cary 300 UV-Vis)

3.2 Yöntem

3.2.1 *Beauveria bassiana* İzolatlarının Canlandırılması

31 adet izolat iğne öze kullanılarak MEA besiyerine inokule edilmiştir. Daha sonra 25°C'de 7 gün inkübasyona kaldırılmıştır (Şekil 4.1, Şekil 4.2)

3.2.2 Gliserol ile Stok Kùltür Hazırlanması

Yatık PDA besiyerine iğne öze ile inoküle edilen izolatlar stok hazırlamada kullanılmak üzere 25°C’de 7 gün inkübe edilmiştir.

% 60’lık gliserol çözeltisi 2ml’lik cryo tüplere mikropipet yardımı ile 750µl olacak şekilde paylaştırılmıştır ve steril edilmiştir.

5 ml tüpler içerisinde çift kuvvet malt extract broth besiyeri hazırlanmış ve steril edilmiştir.

PDA’da ekili olan organizmanın içerisinde malt extract broth dökülerek up-down yapılarak çalkalanmıştır.

Organizmadan 750 µl çekilerek gliserollü cryo tüplere aktarılmıştır.

Cryo tüplerdeki stok kùltürler istenildiğinde kullanılmak üzere -80°C’ye kaldırılmıştır.

3.2.3 Proteaz Aktivitesinin Saptanması

Enzim taraması için Skim Milk Agar ve PSA besiyerleri kullanılmıştır. Her iki besiyeri için de skim milk eklemeyen sadece mineral ortamından 1’er petri hazırlanarak kontrol besiyeri olarak kullanılmıştır. Enzim taraması için zon oluşumunu daha iyi gözlemleyebilmek adına gliserol stokları kullanılmıştır. Hazırlanan gliserol stoklarından besiyerlerine aşılama işlemi yapılmıştır. Sonra petriler 25°C’de, 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında zon çapları kontrol edilerek, gelişim olup olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5)

3.2.4 Enzim Üretimi

Enzim taranması yapıldıktan sonra, spektrofotometrik yöntemler kullanılarak aktivite ölçümü yapmak için, enzim üretimi gerçekleştirilmiştir.

Peptone from meat (Merck); protein substratı

Yeast extract(Merck)

Mineral sıvısı

Amonyum nitrat (NH_4NO_3)

Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)

Magnezyum sülfat (MgSO_4)

Sodyum klorür (NaCl)

Distile su

Spor süspansiyon

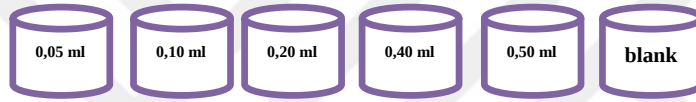
Toplam hacim 50 ml olacak şekilde, 250 ml'lik erlenlere hazırlanmış olan enzim üretim ortamı içerisine 1 ml ($\sim 10^6$ - 10^4 spor/ml) spor süspansiyonu pipetlenmiştir ve 150 rpm'de 27°C' de 5 gün çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Üretim esnasında aktivasyonu kontrol etmek için 3. ve 5. günlerde, üretim sıvısından 1'er ml ependorf içerisine alınarak daha sonra kullanılmak üzere uygun koşullarda saklanmıştır. Üretim tamamlandıktan sonra tüm enzim sıvısı toplanarak, enzim aktivitesi ölçmek için kullanılmıştır.

3.2.5 Spektrofotometrik Yöntem ile Proteaz Aktivitesi Ölçümü

Üretim tamamlandıktan sonra, toplanan enzim sıvısı aktive ölçümü için kullanılmıştır. Aktivite ölçümü, oluşturulan tirozin standardına göre yapılmıştır (Kocaöğüt, 2015).

- 15 ml'lik deney tüpleri içerisine 5ml substrat (kazein) solusyonundan aktarılır ve 27°C'lik su banyosunda 5dk inkübasyona bırakılır. Deneyin kontrollü olması için her izolat 2 paralel şekilde hazırlanır ve 1 tane de blank vial olacaktır. İnkübasyonun ardından test etmek istediğimiz enzim solusyonundan tüplere, 1 ml eklenir. Blank tüpüne enzim solusyonundan eklenmez.
- Sonra 10 dk 27°C' de yeniden inkübasyona bırakılır. Bu inkübasyon süresi çok önemlidir; çünkü bu süre zarfında salınan tirozin miktarı enzim aktivitesini belirleyecektir.

- İnkübasyondan sonra blank tüpü de dahil olmak üzere her bir tüpe 5 ml TCA eklenir, reaksiyon durdurulur. Son konsantrasyonun eşit olması için, reaksiyon durdurulduktan sonra blank tüplere de 1'er ml enzim solusyonu ilave edilir. Tüplerdeki sıvı konsantrasyonunun eşit olması, spektrofotometrik ölçüm sırasında absorbans değerinin doğru hesaplanması için yapılmaktadır.
- Blank olan tüplere de enzim solusyonları eklendikten sonra; 27°C'de 30 dk inkübasyona bırakılır.
- Bu 30 dk'lık bekleme sürecinde, tirozin standardı seyreltmeleri hazırlanır.



- Yukarıdaki miktarlarda hazırlanan tirozin seyreltmeleri, son konsantrasyonlar 2 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanır. Blank tüpüne ise yalnızca distile su konulur.
- 30 dk inkübasyon süresi bittikten sonra, her test tüpü 7000 rpm'de 5dk santrifüj edilir. Bu çöktürme işlemi substratın daha homojen filtre edilebilmesi için yapılmıştır.
- Santrifüj işlemi sonrasında enzim solusyonu 0,45 µm'lik şırınga filtreden geçirilir. Filtrasyon işlemi amacı çözünmeyen maddeleri uzaklaştırmaktır.
- Blank tüp de dahil her vial içerisine 5ml sodyum karbonat eklenir ve hemen sonrasında 1ml Folin reaktifi eklenir.
 - Sodyum karbonat ilavesinden sonra, solusyonlar casein ile reaksiyona girdiğinden, bulanık bir görüntü oluşur.

- Folin reaktifi ilavesinden sonra; inkübasyon süresi sonrası açığa çıkan tirozin ile folin etkileşime geçer.
- İki reaktif de eklendikten sonra, 27°C'de 30 dk yeniden inkübe edilir. Bu inkübasyon süresi manyetik ısıtıcılı karıştırıcı olmadığı için 1dk ara ile tüpler yavaşça çalkalanarak 27°C'lik su banyosunda yapılmıştır.
- İnkübasyon sonrasında, deney tüplerinden 2'şer ml çekilerek, spektrofotometre küvetlerine pipetlenmiştir. Spektrofotometre cihazında blank tüplerle sıfırlama yaptıktan sonra 660 nm absorbans değerinde ölçümler yapılmıştır.

Standart belirlendikten sonra, belirlenen seyreltmede enzim aktivite ölçümleri diğer izolatlar için de yapılmıştır. Böylece 31 adet izolatın proteaz enzim aktivitelerine bakılarak, en iyi aktivite gösteren izolatlar belirlenmiştir. Bunu belirlemek için de her izolattan salınan enzim sıvısının 1U enzim aktivitesi hesaplanır.

1U Enzim aktivitesi; deney koşulları altında, 660 nm'de 0,1'lik (%10 seyreltmeleri kullanıldığı için), absorbans artışına neden olan proteaz miktarı olarak tanımlanmıştır.

Enzim aktivitesi;

$$\square/\square\square = \frac{\Delta\text{Abs}_{660\text{nm}} \times 11}{0,1 \times 10 \times 2}$$

Formülü ile hesaplandı.

- ❖ $\Delta\text{Abs}_{660\text{nm}}$ = Salınan enzim miktarının μmol cinsinden değeri. Okuma yapıldıktan sonra not edilir.
- ❖ 11= Total reaksiyon hacmi
- ❖ 10= İnkübasyon süresi(dk)

- ❖ 0,1= Enzim hacmi (ml) (%10 seyreltme yapıldığı için)
- ❖ 2= Spektrofotometre küvetinin hacmi



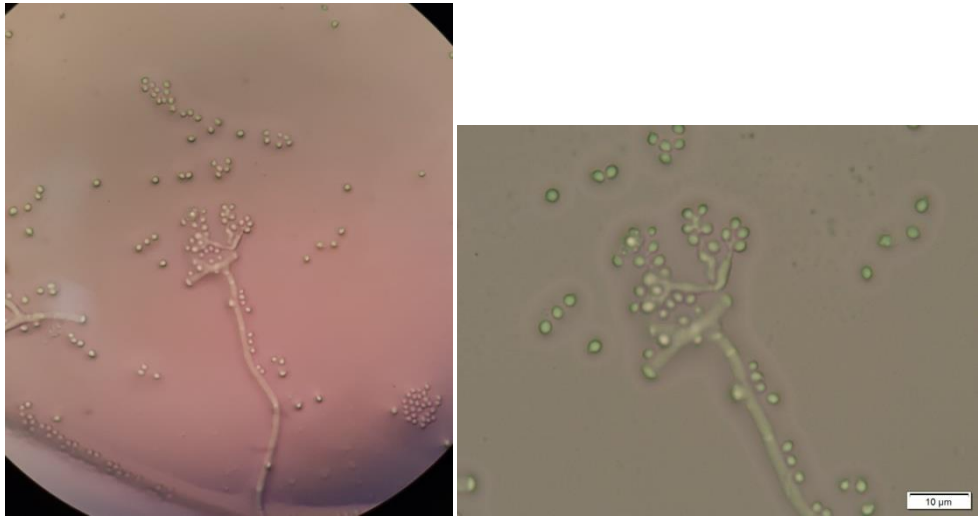
4. BULGULAR

4.1 İzolatların Petri ve Mikroskopta İncelenmesi

MEA besiyerine ekilen izolatlar inkübasyon sonrasında *Beauveria bassiana* olduğunu doğrulamak adına fenotipik olarak incelenmiştir.



Şekil 4.1 *Beauveria bassiana* koloni görüntüsü



Şekil 4.2 *Beauveria bassiana* mikroskop görüntüsü, spor yapıları

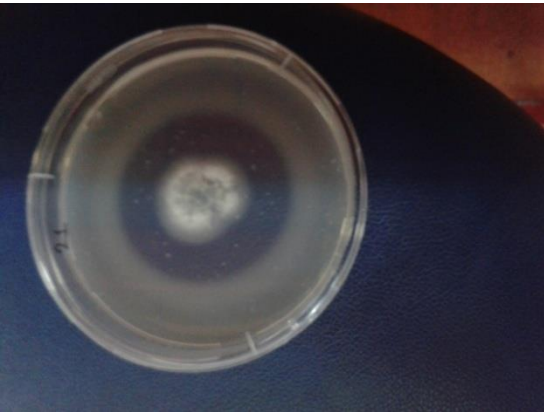
4.2 Enzim Taraması Sonuçları

İnkübasyon süresi sonunda izolatların koloni ve zon çapları ölçülmüştür. Fungal izolatlar proteaz aktivitesi yönünden ICMC (Index of Relative Enzyme Activity) kriterlerine göre proteaz enzim aktivitesi yüksek ve düşük olarak sınıflandırılmıştır. Buna göre 12 izolat çok yüksek proteaz aktivitesine sahip olarak değerlendirilmiştir. Diğer izolatlardan 9 tanesi yüksek ve 10 tanesi de orta düzeyde aktivite göstermiştir.

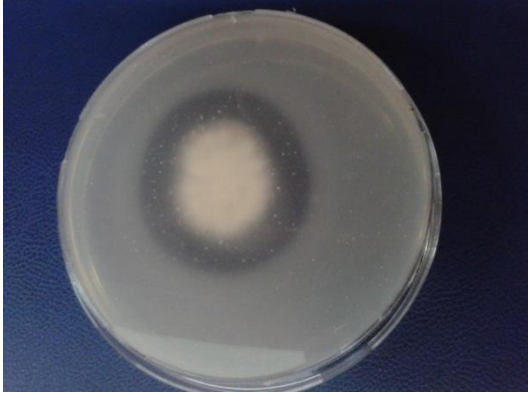
Enzim aktivitesi (Pz); Koloni çapının, koloni ve zon çaplarının toplamına oranı olarak hesaplanır. Bu oranlara göre enzim aktivite değerlendirmesi dört gruba ayrılmaktadır;

- 0,9-1 (+) çok düşük,
- 0,89-0,80 (++) düşük ,
- 0,79-0,70 (+++) yüksek,
- <0,69 (+++++) çok yüksek aktivite sonuç grubudur.

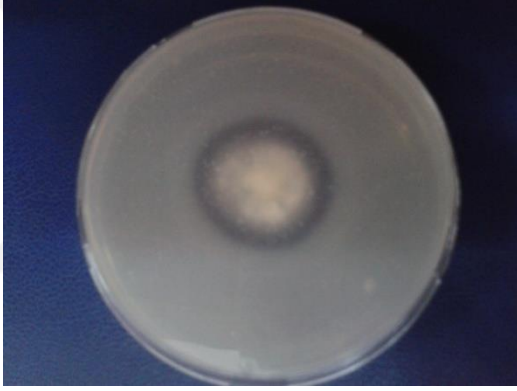
Pz=1,00 değeri ise enzim aktivitesi olmadığını göstermektedir. (Arslan ve Fındık, 2003). Fungusların agarlı besiyerinde enzim tarama çalışmalarında birçok araştırmacının bu yöntemi tercih ettiği görülmüştür (Kothavade ve Panthaki, 1998; Sharon vd., 1997).



Şekil 4.3Ank3 kodlu izolat- çok yüksek aktivite (net aktivite zonu: 15mm, Pz değeri 0,44)



Şekil 4.4 Bb 12 kodlu izolat- yüksek aktivite (net aktivite zonu: 5mm, Pz değeri 0,77)



Şekil 4.5 Den2 kodlu izolat- düşük aktivite (net aktivite zonu: 4mm, Pz değeri 0,83)

Tablo 4.1 Enzim tarama denemesi sonuçları

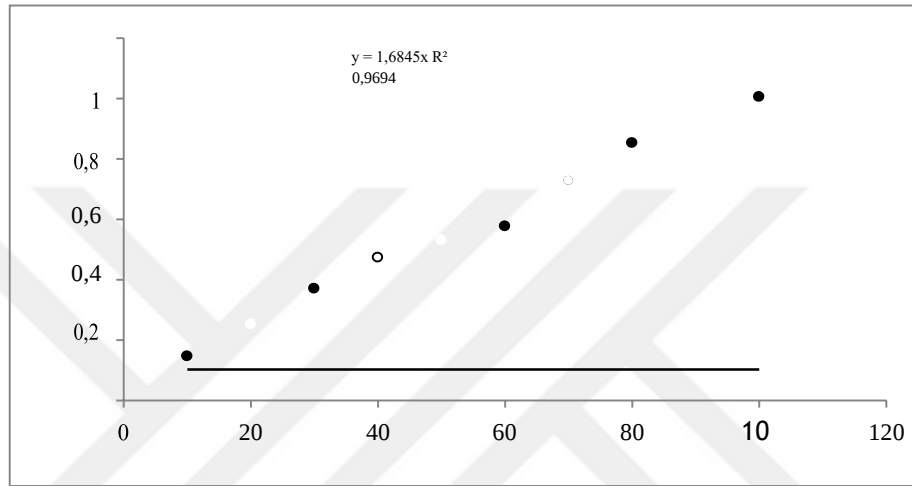
ORGANİZMA	KOLONİ ÇAPI (mm)	ZON ÇAPI (mm)	KOLONİ ÇAPI/ZON ÇAPI (mm)	NET AKTİVİTE ZONU (mm)
Ank3	12	27	12/27	15
Ank4	11	21	11/21	10
Manisa 019-020	12	23	12/23	11
Bb19	11	19	11/19	8
Ank10	17	28	17/28	11
Lül2	18	29	18/29	11
Aydın Akbük	13	21	13/21	8
Lül5	19	30	19/30	11
SB2	20	31	20/31	11
Ank11	21	32	21/32	11
Ank13	21	32	21/32	11
Bb15	17	25	17/25	8
Ank6	22	31	22/31	9
Karaman Dilbileyen	22	31	22/31	9
Lül1	20	28	20/28	8
Bb3	20	27	20/27	7
SB4(b)	21	28	21/28	7
Aydın Söke	18	24	18/24	6
AnkH3	24	31	24/31	7
Bb12	17	22	17/22	5
Ank1	23	29	23/29	6
Ank2	22	27	22/27	5
İst. Çatalca	17	21	17/21	4
Ank5	18	22	18/22	4
Aydın Kızılderköyü	18	22	18/22	4
KVL1	14	17	14/17	3
Den2	19	23	19/23	4
Ordu	23	27	23/27	4
SB1(b)	23	27	23/27	4
Den1	23	26	23/26	3
Patates Böceği	22	25	22/25	3

Tablo 4.2 Enzim aktivite değerlendirmesi

ORGANİZMA	ENZİM AKTİVİTESİ (Pz)	ENZİM AKTİVİTESİ
Ank3	0.44	(++++)
Ank4	0.52	(++++)
Manisa 019-020	0.52	(++++)
Bb19	0.58	(++++)
Ank10	0.61	(++++)
Lül2	0.62	(++++)
Aydın Akbük	0.62	(++++)
Lül5	0.63	(++++)
SB2	0.65	(++++)
Ank11	0.66	(++++)
Ank13	0.66	(++++)
Bb15	0.68	(++++)
Ank6	0.71	(+++)
Karaman Dilbileyen	0.71	(+++)
Lül1	0.71	(+++)
Bb3	0.74	(+++)
SB4(b)	0.75	(+++)
Aydın Söke	0.75	(+++)
AnkH3	0.77	(+++)
Bb12	0.77	(+++)
Ank1	0.79	(+++)
Ank2	0.81	(++)
İst. Çatalca	0.81	(++)
Ank5	0.82	(++)
Aydın Kızılderköyü	0.82	(++)
KVL1	0.82	(++)
Den2	0.83	(++)
Ordu	0.85	(++)
SB1(b)	0.85	(++)
Den1	0.88	(++)
Patates Böceği	0.88	(++)

4.3 Enzim Üretimi Sonuçları

Substrat düzeyinde fermentasyon ile izolatların tamamında üreme gözlenmiştir. Enzim üretimi sonrasında tüm izolatların enzim sıvıları toplanmıştır. Standart enzim aktivite ölçüm yönteminden yararlanılarak tirozin standardı oluşturulmuştur ve spektrofotometrik ölçümler yapılarak, en iyi proteaz aktivitesi belirlenmeye çalışılmıştır.



Şekil 4.6 Tirozin Standart Grafiği.

Tablo 4.3 Proteaz aktivite değerlendirmesi (U/ml)

ORGANİZMA	Spektrofotometrik Ölçüm Sonuçları (U/ml)	ORGANİZMA	Spektrofotometrik Ölçüm Sonuçları (U/ml)
Ank3	226.85	SB4(b)	210.63
Ank4	226.80	Aydın Söke	209.57
Manisa 019-020	226.80	AnkH3	205.85
Bb19	225.92	Bb12	206.83
Ank10	225.91	Ank1	197.66
Lül2	225.56	Ank2	194.45
Aydın Akbük	225.56	İst. Çatalca	180.52
Lül5	225.54	Ank5	182.65
SB2	225.50	Aydın Kızılderköyü	178.87
Ank11	223.45	KVL1	156.54
Ank13	223.45	Den2	163.58
Bb15	220.92	Ordu	165.85
Ank6	219.89	SB1(b)	173.85
Karaman Dilbileyen	215.53	Den1	154.45
Lül1	215.53	Patates Böceği	152.54
Bb3	210.63		

5. TARTIŞMA

Tez hazırlama süresince birçok literatür taranmış olup farklı yayınlardan da edinilen bilgiler doğrultusunda biyolojik mücadelenin ne kadar önemli olduğu kanısına varılmıştır. Ancak günümüz şartlarında gerek yanlış uygulamalar gerekse kimyasal kullanmaya olan düşkünlüğümüz ile bu durum göz ardı edilmektedir.

Biyolojik mücadelede amaç hiçbir zaman doğada zararlı olan organizmaların ortadan kaldırılması olmamıştır. Ekosistemdeki dengeleri bozmadan zararları en aza indirmek hedeflenmektedir. Bu demek değildir ki kimyasal mücadeleden tamamen vazgeçilsin, gerektiğinde iki mücadele yöntemi de birlikte kullanılabilir olmalıdır. İlaç kullanımının zorunlu olduğu durumlarda da seçici ilaçlar tercih edilmelidir; yani bütün canlıları öldüren ilaçlar yerine hedef alınan zararlıları öldüren seçici ilaçlar tercih edilmelidir. Ayrıca biyolojik mücadelede başarıya ulaşmak için ilaç uygulamaları, doğal düşman faaliyetinin en yoğun olduğu dönemin dışında yapılmalıdır.

Entomopatojen funguslar spor çimlenmesi için uygun şartları bulduğunda konukçu içerisine aktif bir şekilde girebilmeleri, ucuz ve uygulaması kolay olması nedeniyle, en önemli biyolojik mücadele gruplarından biri olarak bilinmektedir (Demirci et al., 2011). Ayrıca, yapılan çalışmalarla mikrokapsüller içerisine alınan bu patojenlerin etkinliği giderek artmaktadır (Rosas-García et al., 2015).

Entomopatojen funguslar böceğin üst deri tabakası ile temasa geçtiği zaman çimlenirler bir penetrasyon yapısı oluşturarak enfeksiyonu başlatırlar ve doğrudan zararlının vücudu içerisine doğru büyürler. Hemakole ulaşan fungus genellikle maya benzeri şekilde hemolimf içerisinde çoğalır. Sonrasında toksin üreterek veya enzim salgılayarak ve böceğin gıdalarını kurutarak vücudunda hızla çoğalır. Bundan dolayı böceklerin bakteriyel ve viral enfeksiyonlarının aksine fungal patojenlerin enfeksiyonu için sadece temas yeterli olmaktadır. Konak tarafından yenmelerine gerek yoktur. Bu yüzden de biyolojik mücadelede ilk sırada tercih edilen organizmalar arasında yer almaktadır. Konukçu ölümünden sonra fungus hifsel gelişim gösterir ve çevre şartlarının uygun olup olmamasına göre ölü konukçu üzerinde sporulasyon gerçekleştirerek böceği beyaz bir küf tabakası ile kaplayarak

dışarıya doğru büyür ve böylelikle milyonlarca yeni infektif spor üretilmiş olur (Ocak ve ark., 2007). Ölüm konukçu-fungus etkileşimine bağlı olarak 3-5 günde gerçekleşebilmekte ancak arazi uygulamaları sonucunda çevre şartlarına bağlı olarak bu süreç uzayabilmektedir.

Pek çok entomopatojen fungus konağa özgüdür ve hedef dışı organizmalar üzerinde (bazı istisnalar hariç) herhangi bir etki göstermez. (Hajek, 1999).

Bizim de tez organizmamız olan *Beauveria bassiana* ülkemizde ve dünyanın birçok yerinde zararlı eklem Bacaklılarla mücadelede yaygın bir şekilde kullanılmaktadır, yaklaşık 90 kadar zararlı böceğe karşı kontrol potansiyeline sahiptir. *Beauveria bassiana*' yı böylesine önemli kılan özellikleri çok çeşitli ve etkin virulans faktörlerine [invaziv özelliği, enzimleri (proteaz, kitinaz, lipaz) ve toksinleri (destruxin, beauvericin, beauverolide, bassianolide)] sahip olmasıdır. Bunların salgıladıkları toksinler böceklerin ölümüne neden olurlar.

B.bassiana'nın önemli virulans faktörlerinden bir tanesi de proteaz enzimidir. Bu çalışmada entomopatojenik *Beauveria bassiana* izolatlarının proteaz enzimi taraması yapılarak, en etkin proteaz aktivitesine sahip izolatlar belirlenmiştir. Bu izolatlar üretim ortamına alınarak, enzim üretimi gerçekleştirilip aktiviteleri araştırılmıştır.

Fenotipik ve genotipik tayinleri yapılmış olan toplamda 31 adet *Beauveria bassiana* izolatı ile çalışılmıştır. Bütün izolatlar proteaz enzim ön taraması yapılmak üzere Skim milk agara inokule edilmiştir. Skim milk agarda kontaminasyonu önlemek amacıyla plateleme yöntemi kullanılmıştır. Bunun için öncelikle gliserol içeren cryo tüplere stok kültürler hazırlanmıştır. 5 gün inkübasyon süresi sonunda izolatların koloni ve zon çapları ölçülmüştür. Fungal izolatlar proteaz aktivitesi yönünden ICMC (Index of Relative Enzyme Activity) kriterlerine göre proteaz enzim aktivitesi yüksek ve düşük olarak sınıflandırılmıştır. Buna göre 12 izolat çok yüksek proteaz aktivitesine sahip olarak değerlendirilmiştir. Diğer izolatlardan 9 tanesi yüksek ve 10 tanesi de orta düzeyde aktivite göstermiştir. Araştırmamızın devamında; proteaz üretimi gerçekleştirilip, spektrofotometrik

yöntemler ile aktivite tayini yapılmıştır ve organizmanın virülans faktörlerinden biri olan proteaz enzimin etkinliği belirlenmiştir.

Ancak entomopatojen bir fungusun tek bir özelliği dikkate alınarak biyolojik mücadele etmeni olarak kullanıldığı kanısına varmamak gerekir. Bütün virülans faktörleri birlikte değerlendirilmelidir.

Beauveria bassiana, çeşitli böcekleri enfekte eden ve böcek kontrolü için yüksek potansiyele sahip olan entomopatojenik bir fungustur (Ferron, 1985). Bu fungus genel olarak konakçı böceği kütikül (Pekrul and Grula, 1989) içinden geçerek enfekte eder. Böcek yüzeyindeki konidiadan üretilen üreme tüpleri konağa nüfuz eder. Mantarın, kütiküllere doğru yöneldiği ve enzimatik etki (Zacharuk, 1970) ile birlikte mekanik yollarla nüfuz ettiği varsayılmaktadır. İlgili enzimler, hücre dışı proteazları, kitinaz ve lipazları içerir (Gabriel, 1968; Dean and Domnas, 1983; Leopold and Samsinakova, 1970). Böcek entegrasyonunu geçtikten sonra, mantar sulu hemolenf içinde büyür. Orada konağı öldüren toksinler üretir. Konak ölümünden sonra, miselyum kadavra boyunca büyür. Hücre dışı enzimlerin mantar enfeksiyon sürecine katkısının netleştirilmesi, temel olarak saf enzim preparatlarının bulunamaması nedeniyle kesinlik kazanamamaktadır.. Gabriel, *B. bassiana* kaynaklı hücre dışı proteazlar olduğunu bildirmiştir ve Kucera ve Samsinakova bu hücre dışı proteazları kısmen saflaştırmıştır. Bununla birlikte, bu durumda, proteazların moleküler ağırlığı, saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonu rapor edilmemiştir. Proteazın böcek enfeksiyonu prosesinde kesin rolünü açıklamak için, önce enzimi karakterize etmek gerektiği düşünülmektedir ve yapılan denemeler sonucunda *B. bassiana*'nın hücre dışı proteazının, böcek enfeksiyon sürecinin bir bileşeni olarak gösterilmiştir ve farklı azot kaynakları kullanılarak, çeşitli *B. bassiana* proteazlarının üretilebileceği bildirilmiştir (Bidochka et al., 1987).

Her ülkenin kendi doğal koşullarına uyum sağlamış türlerin bulunması ve kullanılması biyolojik mücadelede kontrol yüzdesini yüksek oranda arttırmaktadır. Taranan literatürlerde, biyolojik mücadele yapılacak bölgeye uygulanacak entomopatojen fungusların o bölgenin kendi koşullarına uyum sağlamış türler olması farklı bir bölgeden izole edilmiş entomopatojen fungus türlerinin

kullanımına göre daha iyi sonuçlar vermektedir (Beron and Diaz , 2005). Bu nedenle biyolojik mücadele amacıyla yapılan çalışmaların önceliği çalışılan bölgede doğada mevcut olan mikrofungus biyotasının tespit edilmesidir. Eğer başka bir bölgeden izole edilen organizmalar kullanılacaksa da, bölgeye adaptasyon süreci göz önünde tutulmalı, hızlı sonuçlar beklenmemelidir.

Entomopatojenik fungusların en önemli yerleşim yerlerinden birisi toprak çevresidir ve toprakta bulunan entomopatojenik funguslar pek çok karasal ekosistemin önemli ve geniş yayımlı üyelerindendir. *Beauveria spp.* gibi pek çok entomopatojenik fungus türü de yaşam döngülerinin önemli bir kısmını toprakta geçirirler (Keller and Zimmerman, 1989; Chandler et al., 1997; Jackson et al., 2000; Ali-Shtayeh et al., 2002; Sevim ve ark., 2010). Topraktaki entomopatojenik fungusların doğal varlığının araştırılmasında, fungal enfeksiyonlara hassas tuzak böcekler veya bazı spesifik funguslar için (*B. bassiana* ve *M. anisopliae* gibi) seçici ortamlar kullanılır (Meyling ve Eilenberg, 2007). Aynı zamanda arazi çalışmalarında bulunan enfekte böceklerden veya araziden toplanıp laboratuvara getirilen ve sonradan enfeksiyon görülen böceklerden de entomopatojenik fungusların izole edildiği yapılan çalışmalar arasında vardır.

Tez kapsamında kullanılan organizmaların izolasyonu da ülkemizin çeşitli bölgelerinden yapılmıştır.

Ticari olarak biyolojik mücadele etmenleriyle çalışılmak isteniyorsa ilk basamak etmenin izolasyonu, karakterizasyonu ve zararlı böceğe karşı patojenitesinin belirlenmesi olmalıdır. Bu amaçla ülkemizde yapılan pek çok çalışma vardır ancak bu çalışmaların birçoğu bölgesel anlamda gerçekleştirilmiştir. (Sevim ve ark., 2010).

Bu tip izolasyon çalışmalarından elde edilen veriler biyolojik mücadele yöntemi kullanacak olan araştırmacılara hem yerel tür çeşitliliği hakkında bilgi vermekte hem de yerel izolatların elde edilmesi açısından önem taşımaktadır (Meyling and Eilenberg, 2006).

Ülkemiz ormanlarında birçok zararlı böcek türü yaşamakta ve değişik oranlarda zararlara neden olmaktadırlar (Eroğlu, 1995). Gelişmiş ülkeler ekosisteme verilen zararı en aza indirmek için bu zararlılarla mücadelede biyolojik mücadeleyi tercih etmektedirler.

Beauveria bassiana doğada geniş yayılım gösteren entomopatojen bir fungus olup çok sayıda zararlıya karşı başarılı bir şekilde uygulanmaktadır (Saenz de Cabezón Irigaray et al., 2003).

Beauveria bassiana'nın böceklerle mücadelede formülasyon haline getirilerek başarıyla uygulandığı çalışmalar mevcuttur (Kpindou et al., 1997; Faria and Wraight., 2001; Webster and Weber, 2007).

Çam ormanlarında zararlı olan çam kese böceğine (*Thaumetopoea pityocampa* (Schiff.) (Lepidoptera: Thaumetopoeidae)) karşı (Sevim vd., 2010; Er vd., 2007), çınar ağaçlarında zararlı olan çınar dantel böceğine (*Corythucha ciliata* (Say) (Hemiptera: Tingidae)) karşı (Sevim vd., 2013), laadin ormanlarında zararlı olan dev soymuk böceğine (*Dendroctonus micans* (Kugelann) (Coleoptera: Curculionidae)) karşı (Sevim vd., 2010; Tanyeli vd., 2010) ve kavak ağaçlarında zarar oluşturan kavak küçük tekeböceğine (*Saperda populnea* (L.) (Coleoptera: Cerambycidae)) karşı (Eken vd., 2006) *Beauveria bassiana* başta olmak üzere entomopatojenik fungusların pek çok türü denenmiş ve ileriki çalışmalar için ümit verici sonuçlar elde edilmiştir.

Kahramanmaraş iline ait köylerde buğday tarlalarından entomopatojen fungus izolasyonu ve tanınması yapılmıştır. Toprakten tuzak böcek yöntemi kullanılarak yapılan izolasyonlar sonucunda 62 adet *Beauveria bassiana* teşhis edilmiştir. Elde edilen türlerin *Galeria mellonella* larvaları üzerine patojenitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Patojenite testinde kullanılan *B. bassiana* izolatlarında % 100 fungus enfeksiyonu gözlenmiştir (Koz and Güven, 2014).

Kuzey Amerika orijinli istilacı yabancı bir böcek türü olan *Leptoglossus occidentalis* iğne yapraklı ağaçları tercih eden bir zararlıdır. 2009 yılından beri ülkemizdeki çam ormanlarına zarar verdiği tespit edilmiştir. Bu böcek türü

ülkemizde hızla yayılmakta olup özellikle fıstık çamlarında büyük kayıplara neden olmaktadır. *Beauveria bassiana*'nın laboratuvar ve dış mekan koşullarında *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae)'e karşı patojenitesini değerlendiren çalışmalar yapılmıştır (Hızal and İnan, 2012).

Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) Güney Amerika, Avrupa ve Kuzey Afrika'dan sonra ülkemizde de domates üretimi için temel zararlı olarak kabul edilmektedir. Yapılan bir çalışmada, entomopatojen funguslardan *Beauveria bassiana* ve *Metarhizium anisopliae*'nin *T. absoluta*'nın hem larva hem de yumurta dönemine karşı etkinlikleri araştırılmıştır. Kullanılan *B. bassiana* izolatları Menemen (İzmir) domates üretim alanlarından toplanmıştır ve o bölgedeki zararlılara karşı kullanılmıştır. Yapılan laboratuvar çalışmaları sonrasında *B. bassiana*'nın yumurta döneminde *T. absoluta*'nın yok edilmesinde etkili bir mikrobiyal savaş etmeni olabilecek potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır (İnanlı ve ark., 2012).

Tetranychus urticae'nin yetişkin ve yumurtaları üzerinde *Beauveria bassiana*'nın mikoinsektisit olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir. (Meyling, 2008).

Manyok bitkisi üzerinde zararlı olan tetranikid akarlardan *Mononychellus tanajoa* üzerinde denenilen *Beauveria bassiana* izolatlarının etkili olduğu bulunmuştur (Barreto et al., 2004).

Beauveria bassiana'nın laboratuvar koşullarında entomopatojenik aktivitesi araştırılmıştır. Akarlar 1 ml'de 10^7 – 10^9 konidiyum ihtiva eden solüsyona batırıldıktan sonra fungus akarın vücut yüzeyini tamamen misellerle kaplamış ve sporlanmıştır. Fungus enfeksiyonu nedeniyle yumurtlamada azalma olmamış, fakat hem yumurtaların açılma oranı ve hem de yumurtadan çıkan larvaların yaşam süresi önemli ölçüde azalmıştır. Sonuçta *Beauveria bassiana*'nın *Psoroptes* türlerine karşı yüksek oranda patojenik aktiviteye sahip olduğu ve tavşan, koyun ve sığırlarda parazit olan *Psoroptes* türlerine karşı biyolojik kontrol etmeni olarak kullanılmasının daha fazla önemsenmesi gerektiği vurgulanmıştır (Lekimme et al., 2006).

Çok sayıda biyotik ve abiyotik faktörün (sıcaklık, nem, solar radyasyon ve önemli çevresel faktörler) entamopatojen fungusların hayatta kalmalarını etkilediğini, sıcaklık etkisinin patojenin çimlenmesi, büyümesi, virulanslığını ve konukçu-patojen ilişkisini etkilediği bilinmektedir (Benz, 1987; Inglis et al., 2001; Ekesi et al., 1999; Dimbi et al., 2004).

Laboratuvar koşullarında domates örümceği akarına karşı (*Tetranychus evansi*) yapılan bir araştırmada *B. bassiana* 'nın virulansı araştırılmıştır. Sıcaklığın çimlenmeye etkisi, radyal seçilmiş izolatların büyümesi ve virülansı *T. evansi* üzerinde laboratuvar da incelenmiştir. Tüm fungus izolatlarının test edilenler *T. evansi*'nin yetişkin dişileri için patojenik olduğu görülmüştür. Seçilen izolatların tümünün virulent olduğu, ancak virulans değerinin sıcaklık ile değiştiği gözlemlenmiştir (Bugeme et al., 2008).

Beauveria bassiana Brezilya'da muz kurduna (*Cosmopolites sordidus*), Çin'de çam tırtılına (*Dendrolimus* spp.), Avrupa'da ise afidlere ve mısır kurduna (*Ostrinia nubilalis*) karşı başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Goettel vd., 2005).

Bal arılarının paraziti olan akarlardan elde edilen *B. bassiana* izolatı, bu akarlarla parazitlenen bal arılarının (*Apis mellifera*) tedavisinde kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Tucker et al., 2010).



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kimyasal mücadele, kolay uygulanabilmesi ve sonucunun hemen alınabilmesi gibi özellikleri nedeniyle, kimyasalların uzun vadede çevreye yaptıkları olumsuz etkiler geriye dönüşsüz oluşu göz ardı edilerek diğerlerine oranla çok daha fazla kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. Fakat tarımsal zararlılara karşı yapılan kimyasal mücadelenin doğal yaşama karşı olumsuz etkileri bilimsel çalışmalarla tespit edilmiştir. Ürün kayıplarında artış yaşanması, zararlılarda ilaçlara karşı dayanıklılığın artması, potansiyel zararlıların ekonomik zararlı durumuna geçmesi ve doğal düşmanların öldürülmesi nedeniyle doğal denge giderek daha fazla bozulmakta, ekosistem büyük oranda zarar görmektedir. Bunlara insan ve hayvan sağlığının tehdit edilmesi, gıda maddelerindeki ilaç kalıntıları, çevre kirlenmesi ve yüksek ilaç fiyatları da eklenince, kimyasal mücadeleye alternatif çevre dostu ve daha ucuz mücadele yöntemlerine geçilmesi zorunlu hale gelmiştir. Bu yöntemlerden en ümit verici, en çevre dostu, en ucuzu ve en sürdürülebilir olanı ise bir çok gelişmiş ülkede de uygulanan “Biyolojik Mücadele” dir

Ülkemizde biyolojik mücadele çalışmaları yeni yeni hız kazanmaktadır. Bizim araştırma konumuz olan *Beauveria bassiana* doğada yüksek oranda yayılım gösteren entomopatojen bir fungus olup biyolojik mücadelede çok sayıda zararlıya karşı başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Halen ticari olarak kullanılan entomopatojen ilaçların ithal olduğu göz önüne alınırsa, uygulama bölgelerinde doğal partner olarak yerleşebilen ülkemiz mikrobiyotasına ait izolatlarla yapılacak çalışmalara öncelikle gereksinim duyulduğu açıktır. Ayrıca başarılı olanların sektöre tanıtılması ve kullanılmasını içeren çalışmalara ihtiyaç olduğu göz ardı edilmemelidir. Biyolojik mücadele daha yaygın olarak kullanılabilir hale gelirse, ithal mikrobiyal mücadele ajanları ile yapılan uygulamalarda karşılaşılan bazı ekolojik sorunların önlenmesi amaçlanmaktadır ve bunun sonucunda da ithal edilen ürünlerdeki ekonomik kayıplar göz önüne alınca fiyatlandırmada düşüş sağlanarak ülke ekonomisine katkı sağlanacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Anderson, D., Harris, R., Polayes, D., Ciccarone, V., Donahue, R., Gerard, G. Jessee, J.,** 1996, Rapid generation of recombinant baculoviruses and expression of foreign genes using the Bac-to-Bac® baculovirus expression system, Focus, 17, 53-58p.
- Arslan, U., Fındık D.,** 2003, Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* türü maya mantarlarında virulans faktörlerinin (proteinaz, slime ve fosfolipaz) in-vitro araştırılması. Turkish Journal of Infection, 4: 471-481s.
- Azizoğlu, U., Bulut, S., Yılmaz, S.,** 2012, Organik Tarımda Biyolojik Mücadele; Entomopatojen Biyoinsektisitler, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 28(5): 375-381s.
- Barreto, R.S., Marques, E.J., Gondim, M.G.C., Jr, de Oleivera, J.V.,** 2004, Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok. for the control of the mite *Mononychellus tanajoa* (Bondar). Environment. In: Fuxa, Sci Agr 61:659–664p.
- Benz, S.,** 1987, Environment. In: Fuxa JR, Tanada Y (eds) Epizootiology of insect diseases. Wiley, New York, pp 177–214p.
- Beron C.M. and Diaz, B.M.,** 2005. Pathogenicity of hyphomycetous fungi against *Cyclocephala signaticollis*. BioControl, 50: 143-150p.
- Bidochka M.J. and Khachatourians, G.G.,** 1987, Purification and Properties of an Extracellular Protease Produced by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. Appl. Environ. Microbiol., 53(7):1679p.
- Bischoof, J.F., Rehner, S.A., Humber, R.A.,** 2009, A Multilocus Phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* Lineage, Mycologia, 101, 512-530p.
- Bora, T. ve Özaktan, H.,** 1998, Bitki hastalıklarıyla biyolojik savaş. Prizma Matbaası, İzmir. 205 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Brurberg, M.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G.,** 1996, Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. *Microbiology*, 142, 7, 1581–1589p.
- Bugeme, D.M., Maniania, N.K., Knapp, M., Boga, H.I.,** 2008, Effect of temperature on virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to *Tetranychus evansi*, *Exp Appl Acarol*,) 46: 275–285p.
- Castrillo, L.A., Roberts. D.W., Vandenberg, J.D.,** 2005. The Fungal Past, Present, and Future: Germination, Ramification, and Reproduction, *Journal of Invertebrate Pathology*, 89, 46-56p.
- Chi, Z., Ma, C., Wang, P., and Li, H.F.,** 2007. Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresource Technology*. 98: 534-538p.
- Clarkson, J.M., Chamley, A.K.,** 1996, New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in microbiology*, 4-5p.
- Coşkuntuncel Öztemiz, S.,** 2008. Organik Tarımda Biyolojik Mücadele, GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi, 25(2), 19-27s.
- De Azeredo L.A.I., Freire D.M.G., Soares R.M.A., Leite S.G.F., Coelho R.R.R.,** 2004, Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil, *Enzyme Microb Technol*, 34, 354-8p.
- Dean, D. D., and Domnas, A. J.,** 1983, The extracellular enzymes of the mosquito-parasitizing fungus *Lagenidium giganteum*. *Exp. Mycol.* 7: 31-39p.
- Demirbağ, Z.** 2008, Entomopatojenler ve Biyolojik Mücadele, Esen Ofset Matbaacılık, Trabzon, 325s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Demirci, F., Muştu, M., Kaydan, M.B., Ülgentürk, S.,** 2011, Laboratory evaluation of the effectiveness of the entomopathogen; *Isaria farinosa*, on citrus mealybug, *Planococcus citri*. *Journal of Pest Science*, 84: 337–342p.
- Dimbi, S.; Maniania, N.K.; Lux, S.A. and Mueke, J.M.,** 2004, Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. *Biocontrol*. 49: 83–94p.
- Dromph, K.,** 2003, Collembolans as vectors of entomopathogenic fungi. *Pedobiologia*, 47, 245-256p.
- Eilenberg, J., Hajek, A., Lomer, C.** 2001, Suggestions for unifying the terminology in biological control. *Biocontrol*, 46, 387-400p.
- Ekesi, S., Maniania, N.K., and Ampong-Nyarko K.,** 1999, Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. *Biocontrol Sci Technol*. 9: 177–185p.
- Eroğlu, M.,** 1995, *Dendroctonus micans* (Kug.) (Coleoptera, Scolytidae)'ın popülasyon dinamiğine etki eden faktörler üzerine araştırmalar. I. Ulusal Karadeniz Ormancılık Kongresi, Trabzon, 148-159s.
- Faria, M., Wraight, S.P.,** 2001, Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. *Crop Prot.*, 20, 767–778p.
- Ferron, P.,** 1978. Biological control of insects by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology*, 23, 409-42p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ferron, P. 1985.** Fungal control, In G. A. Kerkut and L. I. Gilbert (ed.), Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, vol. 4. Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y, 314-346p.
- Flexner, J. L. ve Belnavis, D. L.,** 2000, Microbial insecticides. Editör: J. E. Rechcigl ve N. A. Rechcigl. Biological and Biotechnological Control of Insect Pests. CRC Press, Boca Raton, USA, 35-62p.
- Goettel, M.S., Eilenberg, J., Glare, T.,** 2005, Entomopathogenic Fungi and Their Role in Regulation of Insect Populations. In: Comprehensive Molecular Insect Science, (Ed; Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S.), Amsterdam, 361-405p.
- Gabriel, B. P.,** 1968, Enzymatic activities of some entomophthorous fungi. J. Invertebr. Pathol. 11: 70-81p.
- Jackson, T.A., Saville, D.J.,** 2000, Bioassays of replicating bacteria against soil-dwelling insect pests. Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. (Eds., Navon, A., Ascher, K.R.S.), CABI, New York. pp. 73-94p.
- Haki G.D., Rakshit S.K.,** 2003, Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresour. Technol, 89, 17–34p.
- Hall, R.A., Papierok, B.,** 1982, Fungi as biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance. Parasitology, (Eds: Anderson, R.M., Canning, E.U.), Cambridge University, Great Britain. 84, pp. 205-240p
- Hajek, A.E., St. Leger, R.J.,** 1994, Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts, Annual Review of Entomology, 39, 293-322p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hajek, A.E., Webb, R.E.**, 1999. Inoculative augmentation of the fungal entomopathogen *Entomophaga maimaiga* as a homeowner tactic to control gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *Biological Control*, 14, 11-18p.
- Hızal, E. and İnan, M.**, 2012, *Leptoglossus occidentalis* (Heidemann, 1910) is an invasive insect species. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 14 (21), 56-61p.
- Hodge, K.T.**, 2003, Clavicipitaceous anamorphs. In *Clavicipitacean Fungi: Evolutionary Biology, Chemistry, Biocontrol and Cultural Impacts*, ed. JF White, CW Bacon, NL Hywel-Jones, JW Spatafora, New York: Marcel Dekker, 75-123p.
- Humber, R.A.**, 2008, Evaluation of Entomopathogenity in Fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98, 262-266p.
- İnanlı, C., Yoldaş, Z., and Birgücü, A.K.**, 2012, Entomopatojen Funguslar *Beauveria bassiana* (Bals.) ve *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)'nin *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)'nın Yumurta ve Larva Dönemlerine Etkisi. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 49 (3): 239-242s.
- Inglis, D.G.; Goettel, M.S.; Butt, T.M. and Strasser, H.**, 2001, Use of hyphomycetes fungi for managing insect pests. In: Butt TM, Jackson C, Magan N (eds) *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. CABI International, Wallingford, 23-69p.
- Jackson, T.A., Saville, D.J.**, 2000, Bioassays of replicating bacteria against soil-dwelling insect pests. *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. (Eds., Navon, A., Ascher, K.R.S.), CABI, New York. pp. 73-94p.
- Katı, H.**, 2008, Bakteriler ve biyolojik mücadele. *Entomopatojenler ve biyolojik mücadele*, (Ed: Demirbağ, Z.), Esen Ofset Matbaacılık, Trabzon. ss. 109-174s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kataoka Y., Takada K., Oyama H., Tsunemi M., James M.N., Oda K., 2005,** Catalytic residues and substrate specificity of scytalidoglutamic peptidase, the first member of the eqolisin in family (G1) of peptidases, FEBS Lett, 579, 2991–2994p.
- Keller, S., Zimmerman, G., 1989,** Mycopathogens of Soil Insects, In: Insect-Fungus Interactions, (EdS., Wilding, N., Collins, N.M., Hammond, P.M., Webber, J.F.), London, 239-270p.
- Keswani, C., Singh, S.P. and Singh, H.B., 2013,** *Beauveria bassiana*: Status, Mode of action, Applications and Safety issues. Biotech Today, 3(1), 16-20p.
- Kılınçer, N., Yiğit, A., Kazak, C., Er, M.K., Kurtuluş, A., Uygun, N., 2010,** Teoriden pratiğe zararlılarla biyolojik mücadele. Türk. biyo. мүc. derg., 1 (1): 15-60s.
- Kisla, T.A., Cu-Unjieng, A., Sigler, L. and Sugar, J., 2000,** Medical management of *Beauveria bassiana* keratitis. Cornea, 19: 405-406p.
- Klingen, I., Haukelan, S., 2006,** The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. An Ecological and Societal Approach to Biological Control, (Eds: Eilenberg, J., Hokkanen, H.M.T.), Springer, Netherlands. pp. 145-212p.
- Kocaöğüt, Elif, 2016,** Ege Üniversitesi Hastanesi Yeni DoğanYoğun Bakım Ünitesinden İzole EdilenPotansiyel Patojen *Aspergillus fumigatus* Fresen.'nin Bir Virulans FaktörüOlan Proteaz EnzimAktivitelerinin Araştırılması ve Karakterizasyonu, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 106s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Koz, C., Güven, Ö.,** 2014, Kahramanmaraş merkez köylerindeki buğday tarlalarından izole edilen Entomopatojenfunguslar. Türk. biyo. мү. derg., 5 (1): 39-51p.
- Kothavade, R.J. and Panthakı, M.H.,** 1998, Evaluation of phospholipase activity of *Candida albicans* and its correlation with pathogenicity in mice. Journal of Medical Microbiology, 47: 99-102p.
- Kpindou, O.K.D.; Lomer, C.J.; Langewald, J.; Togo, T. and Sagara, D.,** 1997, Field treatment of desert locust (*Schistocerca gregaria* Forskal) hoppers in Mauritania using an oil formulation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride*. Biocontrol Sci.Technol. 7, 603–611p.
- Kumar C. G., Takagi H.,** 1999, Microbial alkalene proteases: From a bioindustrial viewpoint, Biotechnology Advances. 17, 561–594p.
- Kurt, A.,** 2005, Coleoptera-Specific (cry3Aa) Delta-Endotoxin Biosynthesis by A Local Isolate of *Bt* subsp. *tenebrionis*, Gene Cloning and Characterization, Master Thesis, University of Middle East Technical, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Ankara.
- Kushiyeв, R., Tuncer, C.,Erper, İ.,** 2018, Kabuk ve ambrosya böceklerine karşı alternatif mücadele olarak entomopatojen fungusların kullanımı. Ormancılık Araştırma Dergisi, 5:2, 176-184s.
- Kwon Y.T., Kim J.O., Moon S.Y., Lee H.H., and Rho H.M.,** 1994, Extracellular alkaline protease from alkalophilic *Vibrio metschnikovii* strain RH530. Biotechnol.Lett. 16, 413–18p.
- Lacey, L.A., Goettel, M.S.,** 1995, Current Developments in Microbial Control of Insect Pests And Prospects for The Early 21st Century. Entomophaga, 40, 3-27p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Larone, D.H., 2002, Medically Important Fungi. A Guide to Identification. Washington, DC: ASM Press.

Lekimme, M., Mignon, B., Tombeux, S., Focant, C., Marecha, F., Losson, B., 2006, In vitro entomopathogenic activity of *Beauveria bassiana* against *Psoroptes* spp. (Acari: Psoroptidae), Vet. Parasitol, 139(1-3):196-202p.

Leopold, J., and Samsinakova, A., 1970. Quantitative estimation of chitinase and several other enzymes in the fungus *Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol. 15: 34-42p.

Maddox, J.V., 1987, Protozoan Diseases. In “Epizootiology of Insect Diseases , Ed. Fuxa, J.R., Tanada, Y., Wiley, New York 417-452p.

McCoy C.W., Sehime A.G., Kanavel R.F. and Hill A.J., 1971, Suppression of citrus rust mite populations with application of fragmented mycelia of *Hirsutella thompsonii*. J. Invertebr. Pathol. 43: 414–421p.

Meyling, N., V., 2008, PCR-Based Characterisation of Entomopathogenic Fungi for Ecological Studies, Vegqure, Copenhagen, 14p.

Meyling, N.V., Eilenberg, J., 2007, Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control, Biological Control 43, 145–155p.

Nalçacıoğlu, R., 2008, Virüsler ve biyolojik mücadele. Entomopatojenler ve biyolojik mücadele, (Ed: Demirbağ, Z.), Esen Ofset Matbaacılık, Trabzon. ss. 51-108s.

Özaktan, H., Aysan, Y., Yıldız, F. Ve Kınay, P., 2010, Fitopatolojide biyolojik mücadele, Türk. biyo. мү. derg., 1 (1): 61-78s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pantou, M.P., Mavridou, A., Typas, M.A.**, 2003, IGS Sequence Variation, Group-I Introns and the Complete Nuclear Ribosomal DNA of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium*: Excellent Tools for Isolate Detection and Phylogenetic Analysis, *Fungal Genetics and Biology*, 38: 159-174p.
- Pekrul, S., and Grula, E. A.**, 1979, Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. *J. Invertebr. Pathol*, 34: 238-247p.
- Polgar L.**, 1989, Mechanisms of protease action, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, Pp. 43-76p.
- Poppy, G. M.**, 1997, Tritrophic interactions: improving ecological understanding and biological control. *Endeavour*, 21: 61-65p.
- Rai S. K., Mukherjee A. K.**, 2010, Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. *Biochemical Engineering Journal* 48, 173–180p.
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S. and Deshpande V.V.**, 1998, Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 597–635p.
- Rao, C.S., Sathish, T., Ravichanda, P., Rrakasham, R. S.**, 2009, Characterization of thermo and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco .friendly application. *Process Biochemistry*, 44, 262-268p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Rawlings N. D., , Morton F. R., Barrett A.J., 2007, An Introductöon To Peptidases And The Merops Database, Industrial Enzymes Structure, Function and Applications ed: Poalina J., Maccabe A.P., Springer, Valencia, Spain, 64p.

Raymond, B., et al., 2010, Bacillus thuringiensis: An Impotent Pathogen, Trends in Microbiol., 18(5), 189-194p.

Rehner, S., A., Buckley, E. 2005, A Beauveria Phylogeny Inferred from Nuclear ITS and EF1- α Sequences: Evidence for Cryptic Diversification and Links to Cordyceps Teleomorphs, Mycologia, 97, 84-98p.

Rehner, S.A., Posada, F., Buckley, E.P., Infante, F., Castillo, A., Vega, F.E., 2006, Phylogenetic Origins of African and Neotropical Beauveria bassiana s.l. Pathogens of the Coffee Berry Borer, Hypothenemus hampei, Journal of Invertebrate Pathology, 93, 11-21p.

Roberts, D.W.,1989, Word Picture of Biological Control of Insects by Fungi, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 84, 89-100p.

Rosas-Garcia, N.M., Acuna-Jimenez, M., Lopez-Meyer, M., Sainz-Hernandez, C. J., Mundo- Ocampo, M., Garcia-Gutierrez., C., 2015, Pathogenicity of microencapsulated insecticide from Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae against Tobacco Budworm, Heliothis virescens (Fabricius). Society of Southwestern Entomologists, Southwestern Entomologist, 40(3):531-538p.

Roy, H.E.,Steinkraus, D.C., Eilenberg, J., Hajek, A.E., Pell, J.K., 2006, BizarreInteractionsandEndgames: EntomopathogenicFungiandTheirArthropodHosts, *AnnualReview of Entomology*, 51, 331-357p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Samson, R.A., Evans, H.C. and Latge, J.P., 1988, Atlas of entomopathogenic fungi. Springer- Verlag, New York.

Sandhu, S.S., Sharma, A.K.V., Beniwal,G., Goel, P., Batra, A., Kumar, S., Jaglan, A.K., Sharma and Malhotra, S., 2012, Myco-biocontrol of insect pests: Factors Involved, mechanism, and regulation. Journal of Pathology Article ID 126819:1-10p.

Saenz-de-Cabezón Irigaray, F.J., Marco-Mancebón, V. and Pérez-Moreno, I., 2003, The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and compatibility with triflumeron: effects on the twospotted spider mite *Tetranychus urticae*. Biological Control, 26: 168-173p.

Sevim, A., Sevim, E., Demirbağ, Z., 2015, Entomopatojenik fungusların genel biyolojileri ve türkiye’de zararlı böceklerin mücadelesinde kullanılma potansiyelleri. Erzincan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 8(1): 115-147p.

Sevim, A.,2010, Doğu Karadeniz Bölgesi’nden Entomopatojenik Fungusların İzolasyonu, Karakterizasyonu Ve Virülanslarının Belirlenmesi, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

Shah, P.A., Pell, J.K.,2003, Entomopathogenic Fungi as Biological Control Agents, Applied Microbiology and Biotechnology, 61, 413-423p.

Sharon C.A., Muller, M., Zhou, J.Z., Wright, L.C., Sorrell, T.C., 1997, Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor. The Journal of Infectious Diseases, 175: 414-420p.

Society for Invertebrate Biology, 2013.

http://www.sipweb.org/micro_control/microb_gallery.html

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Stanbridge, L.J., Dussupt, V.,** 2003, Maitland, N.J., Journal of Biomedical Biotechnology, 2, 79–91p.
- Strasser, H., Vey, A., Butt, T.M.** 2000, Are There any Risks in Using Entomopathogenic Fungi for Pest Control, with Particular Reference to the Bioactive Metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species. Biocontrol Science and Technology, 10, 717- 735p.
- Tamez-Guerra, P., et al.,** 2004, Characterization of Mexican *Bacillus thuringiensis* Strains Toxic for Lepidopteran and Coleopteran Larvae, J. Invertb, Pathol., 86 (1-2), 7-18p.
- Tekin S.,** 2012, Kahramanmaraş İli Sınırları İçerisindeki Değişik Habitatlardan İzole Edilen *Bacillus thuringiensis* Suşlarının Karakterizasyonu ve Tarımsal Zararlılar Üzerindeki Etkinliklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Topal, Ş., Pembeci, C., Batum, M., Borcaklı, M., Çeltik, Ö.,** 2000, Türkiye'nin tarımsal mikoflorasının endüstriyel öneme sahip bazı enzimatik aktivitelerinin incelenmesi-I: Amilaz, Proteaz, Lipaz. Turkey Journal Biology 24: 79–93s.
- Toprak, U.,** 2004, Bazı Bakulovirüs Preparatlarının Laboratuvar Koşullarında Noctuidae Familyasındaki Önemli Tarımsal Zararlı Türler Üzerinde Etkinliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Torrado-Leon, E., Montoya-Lerma, J., Valencia-Pizo, E.,** 2006, Sublethal Effects of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on the Whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius)(Hemiptera: Aleyrodidae) Under Laboratory Conditions. Mycopathologia, 162, 411-419p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tucker, D.L., Beresford, C.H., Sigler, L. and Rogers, K.,** 2004, Disseminated *Beauveria bassiana* infection in a patient with acute lymphoblastic leukemia. J Clin Microbiol, 42: 5412-5414p.
- Uygun, N., Ulusoy, M.R. ve Satar, S.,** 2010, Biyolojik mücadele, Türk. biyo. mük. derg., 2010, 1 (1): 1-14ps.
- Uztan A., Günyar Abacı, Ö., Yoltaş, A., Keskin, N.,** 2016, Isolation and identification of entopathogenic fungi *Beauveria bassiana* from Turkey. Fresenius env. Bull., 25: 5180-5185p.
- Vaae-Kolstad, G., Horn, S.J., van Aalten, D.M.F., Synstad, B., Eijsink, V.G.H.,** 2005, The non-catalytic chitin-binding protein Cbp21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation, Journal of Biological Chemistry, 280, 31, 2849228497.
- Wan, H.,** 2003, Molecular Biology of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*: Insect-Cuticle Degrading Enzymes and Development of a New Selection Marker for Fungal Transformation, PhD thesis, Combined Faculties for the Natural Sciences and for Mathematics of the Ruperto-Carola University of Heidelberg, Germany.
- Ward O.P.,** 1985, Proteolytic enzymes. In: Blanch HW, Drew S, Wang DI, editors. Comprehensive Biotechnology-The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Volume 3. Oxford and New York: Pergamon Press, 709–818.
- Webster, J., Weber, R.W.S.,** 2007, Introduction to Fungi, Cambridge University Press, New York, Third Edition, 701p.
- Wilson, E.O.,** 1990, First word. Omni, 12, 6p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yıldız, S.S.,** 2015,Entomopatojen Fungus *Beauveria bassiana* ve *Paecilomyces fumosoroseus* Sporlarının Bazı Vektör Sinekler Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, 104s.
- Zacharuk, R. Y.,** 1970, Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). III. Penetration of the host integument. J. Invertebr. Pathol, 15: 372-396p.
- Zimmermenn,G.,** 2007a., Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. Biocontrol Science and Technology, 17, 553-596p.
- Zimmermann, G.,** 2007b., Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Science and Technology, 17, 879-920p.
- http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802230001**
(Nisan 2015)

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olan, tecrübelerini ve bilgi birikimini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Alev HALİKİ UZTAN'a, çalışmalarım süresince tecrübesiyle her zaman yanımda olan ve manevi desteğini her zaman hissettiğim Doç. Dr. Özlem Abacı GÜNYAR'a, katkılarını asla unutamayacağım Araş. Gör. Ayşegül YOLTAŞ'a sonsuz teşekkürleri bir borç bilirim.

Hacettepe Üniversitesi'nden Prof. Dr. Nevin Keskin'e organizmaları bizimle paylaşıp çalışmamızda kullanılmasına olanak sağladığı için teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca yardımını esirgemeyen ve bana destek olan değerli laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, hep yanımda olan aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (2014 FEN 049). Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na teşekkür ederiz



ÖZGEÇMİŞ

16.01.1987’de Kocaeli/İzmit’ de doğmuştur. Ortaöğretim ve ilköğretimini sırası ile İzmir Ziya Gökalp İlköğretim Okulu ve Akıncılar İlköğretim Okullarında tamamlamıştır. Lise eğitimini İzmir Selma Yiğitalp Lisesi’nde tamamlamıştır.. Lisans eğitimini Ege Üniversitesi Biyoloji bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji opsiyonunda tamamlamıştır. Lisans öğrenim döneminde Dialab Özel Laboratuvar Hizmetleri LTD ŞTİ’ inde zorunlu stajını yapmıştır. Ege üniversitesi Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans yapmaktadır. 2018 yılında Ege Üniversitesi Eğitim Fakültesinden formasyon belgesi almıştır. Yüksek lisans eğitimi süresince uluslararası kongrelerde yapılan 2 adet poster ve 1 adet sözlü sunumda yer almıştır.