

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI



Beauveria bassiana'nın CANLILIĞI ÜZERİNE SAKLAMA
YÖNTEMLERİNİN ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ASİYE CENDEK

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mehmet Erhan GÖRE

BOLU, TEMMUZ - 2023

KABUL VE ONAY SAYFASI

Asiye CENDEK tarafından hazırlanan “*Beauveria Bassiana*’nın Canlılığı Üzerine Saklama Yöntemlerinin Etkisi ” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir. 28/07/2023

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Mehmet Erhan GÖRE
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Göksel ÖZER
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Harun BAYRAKTAR
Ankara Üniversitesi

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir,

aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin 18/08/2023 tarihinde Turnitin adlı intihal tespit programından enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 10 olarak tespit edilmiştir.

.....
ASİYE CENDEK

ÖZET

***Beauveria Bassiana*'nın CANLILIĞI ÜZERİNE SAKLAMA YÖNTEMLERİNİN ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ASİYE CENDEK
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. MEHMET ERHAN GÖRE)

BOLU, TEMMUZ - 2023

XI + 36

Dünyada geniş bir ekolojide yaşayabilen ve tarım zararlılarına karşı en yaygın kullanılan entomopatojen funguslardan biri olan *Beauveria bassiana*, üzerinde en çok araştırma yapılan organizmalardan biridir. Bilimsel çalışmalarda kültür stoklarına kolayca ulaşabilmek ve organizmanın özelliklerini uzun süre bozulmadan muhafaza edebilmek için uygun saklama yöntemleri geliştirilmiştir. Bu amaçla geliştirilmiş birçok saklama yöntemi bulunmakla birlikte fungal organizmaya göre tercihler farklılık gösterebilmektedir. Bu nedenle organizmanın özelliklerini sağlıklı bir şekilde koruyan saklama yöntemlerine ihtiyaç bulunmaktadır. Bu çalışmada, %15 DMSO-dondurma, %15 gliserol-dondurma ve alt kültürleme ile 1 yıllık korumanın sporların büyümesi, üretimi ve canlılığı ile iki *B. bassiana* izolatının makro ve mikro morfolojisi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, alt kültürlemenin *B. bassiana* izolatlarının sağlıklı muhafazası için basit ve uygulanabilir bir yöntem olduğunu ortaya koymuştur. Ancak bu yöntemin yüksek kontaminasyon riski, yüksek iş gücü gereksinimi, yüksek tüketim ve maliyet, çok sayıda kültürün saklanması durumunda zaman kaybı nedeniyle kullanılması mümkün görünmemektedir. Bu durumlarda *B. bassiana*'nın en sağlıklı şekilde -135°C'de %35 gliserol içeren ultra derin dondurucuda saklanabileceği belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Entomopatojen funguslar (EPF), *Beauveria Bassiana*, Biyolojik Kontrol Ajanı, Saklama Koşulları, Canlılık

ABSTRACT

EFFECT OF PRESERVATION METHODS ON VIABILITY OF BEAUVERIA BASSIANA

MSC THESIS

ASIYE CENDEK

BOLU ABANT IZZET BAYSAL UNIVERSITY

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

DEPARTMENT OF PLANT PROTECT

(SUPERVISOR: PROF. DR. MEHMET ERHAN GÖRE)

BOLU, JULY 2023

XI + 36

Beauveria bassiana, which can live in a wide ecology in the world and is one of the most widely used entomopathogenic fungi against agricultural pests, is one of the most researched organisms. In scientific studies, appropriate storage methods are developed in order to easily access the culture stocks and to preserve the fungal properties for long periods without deterioration. Although there are many storage methods developed for this purpose, they may vary according to the fungal organism. For this reason, there is a need for storage methods that preserve the characteristics of the organism in a healthy way. In this study, we evaluated the effect of 1-year preservation by 15% DMSO-freezing, 15% glycerol-freezing and subculturing on the growth, production and viability of spores and macro and micro morphology of two isolates of *B. bassiana*. The obtained data revealed that subculturing is a simple and applicable method for the healthy preservation of *B. bassiana* isolates. However, it does not seem possible to use this method due to the high risk of contamination, high labor requirement, high consumption and cost, and loss of time in case of storing a large number of cultures. In these cases, it has been determined that *B. bassiana* can be stored in the ultra-deep freezer at 35% glycerol at -135°C in the healthiest way.

KEYWORDS: Entomopathogenic fungi (EPF), *Beauveria Bassiana*, Biological Control Agent, Preservation Methods, Viability

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	ix
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ.....	x
TEŞEKKÜR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>Beauveria Bassiana</i> Hakkında Genel Bilgiler	4
2.2. Entomopatojen Fungus Koleksiyonları için Saklama Yöntemleri	5
2.3. Literatür Özetleri	8
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	13
3.1. <i>Beuaveria bassiana</i> izolatları.....	13
3.2. Farklı Saklama Koşullarının <i>Beauveria Bassiana</i> İzolatlarının Canlılığına Etkileri	13
3.3. Canlılık Ölçümü	15
3.4. Konidi Üretimi	15
3.5. Sporların Canlılığı	15
3.6. Kolonilerin Makroskopik ve Mikroskopik Karakterizasyonu.....	15
3.7. Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi	16
4. BULGULAR.....	17
4.1. Canlılık Ölçümü Değerlendirmesi.....	17
4.2. Konidi Üretimi Değerlendirmesi.....	18
4.3. Spor Canlılığı Değerlendirmesi.....	20
4.4. Makroskopik ve Mikroskopik Gözlemler	21
5. TARTIŞMA.....	30
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	32
7. KAYNAKLAR	33

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1.	<i>Beauveria bassiana</i>	2
Şekil 3.1.	Bilimsel çalışmalarda kullanılan <i>Beauveria bassiana</i> izolatının petri ve mikroskopik görüntüsü.....	13
Şekil 3.2.	<i>Beauveria bassiana</i> izolatlarının farklı saklama koşullarında depolanması	14
Şekil 3.3.	Elde edilen sonuçların yazılması.....	16
Şekil 4.1.	Petri kaplarında bulunun <i>Beauveria bassiana</i> izolatlarının canlılık ölçümü.....	18
Şekil 4.2.	Konidi üretimi a) 20-01 -135°C gliserol, b) 20-02 -86°C gliserol, c) 20-02 -20°C gliserol.....	19
Şekil 4.3.	Spor canlılığı a) 20-02 24 °C oda sıcaklığı çimlenme, b) 20-02 -86°C gliserol, c)20-01 -135°C DMSO.....	21
Şekil 4.4.	Petri kaplarında -86°C’de <i>Beauveria bassiana</i> 20-02 izolatlarında makroskopik gözlemler.....	22
Şekil 4.5.	Petri kaplarında -86°C’de <i>Beauveria bassiana</i> 20-01 izolatlarında makroskopik gözlemler.....	23
Şekil 4.6.	Petri kaplarında -135°C’de <i>Beauveria bassiana</i> 20-02 izolatlarında makroskopik gözlemler.....	24
Şekil 4.7.	Petri kaplarında -135°C’de <i>Beauveria bassiana</i> 20-01 izolatlarında makroskopik gözlemler.....	25
Şekil 4.8.	Petri kaplarında -20°C’de <i>Beauveria bassiana</i> 20-02 izolatlarında makroskopik gözlemler.....	26
Şekil 4.9.	Petri kaplarında -20°C’de <i>Beauveria bassiana</i> 20-01 izolatlarında makroskopik gözlemler.....	27
Şekil 4.10.	Petri kaplarında 24°C’de <i>Beauveria bassiana</i> 20-01 ve 20-02 izolatlarında makroskopik gözlemler.....	28
Şekil 4.11.	Petri kaplarında bulunan <i>Beauveria bassiana</i> izolatlarının mikroskopik görüntüsü.....	29

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Saklama yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları.....	7
Tablo 4.1. <i>Beauveria bassiana</i> izolatlarının 9. günde canlılık ölçümü değerleri.	17
Tablo 4.2. <i>Beauveria bassiana</i> izolatlarının 18. günde canlılık ölçümü değerleri.	18
Tablo 4.3. <i>Beauveria bassiana</i> izolatlarının 9. günde konidi üretimi değerleri...	19
Tablo 4.4. <i>Beauveria bassiana</i> izolatlarının 18. günde konidi üretimi değerleri.	19
Tablo 4.5. <i>Beauveria bassiana</i> izolatlarının 9. günde spor canlılığı değerleri.....	20
Tablo 4.6. <i>Beauveria bassiana</i> izolatlarının 18. günde spor canlılığı değerleri...	20

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

ppm	: Milyonda bir birim
gr	: Gram
mm	: Milimetre
mL	: Mililitre
L	: Litre
kg	: Kilogram
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
PDA	: Patates Dekstroz Agar
DMSO	: Dimetil sülfoksit
vd.	: ve diğerleri

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca, her türlü yardımlarını sağlayan, çalışmam süresince yapıcı ve yönlendirici fikirleri ile yol gösteren değerli danışman hocam Prof. Dr. Mehmet Erhan GÖRE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince beni destekleyen değerli hocam Doç. Dr. Aysun ÇAVUŞOĞLU ve değerli yüksek lisans tez arkadaşlarım Ebru KURTARICI, Bedriye DEMİRER ve Melis GADİŞ'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi olarak her zaman desteğini hissettiğim sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

İnsan beslenmesinde bitkisel kaynaklı ürünler geçmişten günümüze önemini korumaktadır. Bu ürünlerin dünyada artan insan nüfusuna yetebilmesi amacıyla, tarımda ürün kalitesini ve verimliliğini artırmak için çeşitli üretim yöntemleri kullanılmaktadır. Ürün kayıplarını en aza indirmek ve zararlılara karşı mücadele etmek içinde birçok yöntem etkin bir şekilde uygulanmaktadır. Tarım ürünlerinde zararlılar arasında birçok böcek türü vardır. Tarımsal zararlı böceklerle karşı çoğunlukla kimyasal mücadele yöntemi kullanılır. Kimyasallar kolay uygulanabilmesi ve çabuk etki göstermesinden dolayı sıkça tercih edilir. Ancak bu yöntem maliyetli, insan ve çevre sağlığına zararlıdır, aşırı doz kullanımı zararlı da direncin artmasına neden olurken ürün üzerinde de ciddi kalıntı problemi oluşturmaktadır (Delen vd., 2005; Aroiee vd., 2005). Kimyasal mücadeleye karşı insan ve çevre sağlığına zarar vermeyen, doğa ile uyumlu alternatif mücadele yöntemlerine yönelim gün geçtikçe artmaktadır. Alternatif mücadele yöntemlerinden biri de biyolojik mücadeledir. Biyolojik mücadele de predatörler, parazitoidler ve entomopatojen mikroorganizmalar (funguslar, bakteriler, virüsler, nematotlar, protozoalar vb.) kullanılır (Kılınçer vd., 2010).

Biyolojik mücadele de entomopatojen fungusların içinde yer aldığı funguslar, hem eşeyli hem eşeysiz üreyebilen, spor üreten, hifli bir yapıya sahip, klorofil taşımayan bu yüzden dışardan beslenmeye ihtiyacı olan ökaryotik organizmalardır (Alexopoulos vd. 1996). Funguslar ile ilgili ilk bilimsel çalışmalar 250 yıl öncesine dayanmaktadır. Hawksworth (1991)'a göre yaklaşık olarak 1.5 milyon fungus türü vardır ve bu türlerden 700 den fazlası entomopatojen fungus olarak tanımlanmıştır (Roy vd., 2006; Sandhu vd., 2012; Yüksel vd., 2017).

Böceklerde patojenik etki gösteren ve ölümüne sebep olan funguslara entomopatojen fungus (EPF) denir. Funguslar aynı zamanda bitkide hastalık yapan etmenlere karşı da yaygın olarak kullanılmaktadır. Uygun şartlar oluştuğunda konukçusunu kolayca enfekte edebilmesi, memeliler üzerinde olumsuz etkilerinin günümüze kadar yapılan çalışmalarda saptanmamış olması, böcek direncine neden olmaması, çevrede uzun süreler kalabilmesi, ucuz ve uygulaması kolay olabilmesi sebebiyle önemli biyolojik mücadele ajanlarından biridir (Demirci vd., 2011). Entomopatojenik funguslar özellikle *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*,

Metarhizium anisopliae, *Paecilomyces fumosoroseus*, *P. farinosus* ve *Lecanicillium lecanii*, böceklerin ticari biyokontrol ajanları olarak artan ilgi görmektedir (Jaronski, 2007). Bu türlerin içinde *Beauveria bassiana* biyokontrol amaçlı ilk ve en çok kullanılan entomopatojenik funguslar arasındadır (Sandhu vd., 2012).



Şekil 1.1. *Beauveria bassiana*

Entomopatojen fungus populasyonlarının belirlenmesi, koleksiyonlarının oluşturulması, uzun yıllar boyunca muhafazasının sağlanması biyoteknoloji ve tarımsal araştırmaların devamlılığı için büyük önem arz etmektedir. EPF stoklarının uzun süre sağlıklı koşullarda depolanabilmesi yapılacak araştırmaları destekleyecek fungal kültürlerin erişimi kolaylaşacaktır. Fungusların korunması için çok sayıda yöntem bulunmuştur, ancak tek bir koruma yöntemi tüm fungal türlerinin korunması için çoğunlukla yeterli olamamaktadır (Ryan vd., 2000). Bu amaçla fungal kültürlerinin zamanla canlılığını, morfolojik, fizyolojik ve genetik bütünlüğünü ilk gün ki gibi stabil koruyabilecek depolama yöntemlerine ihtiyaç bulunmaktadır (Oliveira vd., 2011).

Beauveria bassiana için çok sayıda farklı saklama yöntemleri test edilmesine ve geliştirilmesine rağmen, bazı koruma yöntemlerinin özel ekipman gerektirmesi ve pahalı olması, bazı yöntemlerin karmaşıklığı ve bazı yöntemlerin ise fungal

özelliklerini tam yansıtmaması fungusa özgü yüksek oranda koruma sağlayan yeni bir protokolün geliştirilmesi gerektiğini düşündürmektedir (Oliveira vd., 2011).

Dünyada ve ülkemizde entomopatojen funguslar içerisinde *Beauveria bassiana* hakkında tarımda önemli kayıplara sebep olan böcek zararlıları mücadelesinde biyokontrol ajanı olarak etkinliğine yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Dembilio vd., 2010; Ying ve Feng, 2004; Dannon vd., 2020; Kılıç ve Yıldırım, 2008; Derya vd., 2020). Toprakta ve böcekten izole yöntemleri araştırılmaktadır (Kırışik, 2021). Ancak fungusun uzun süreler canlılığını koruyarak saklanması yönelik çalışmalar yetersiz kalmaktadır. Bu çalışma ile saklama yöntemlerine bir katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Bu çalışmanın amacı, *Beauveria bassiana* izolatlarının gliserol ve DMSO (dimetil sülfoksit) içerisinde 3 farklı sıcaklıkta (-20, -86, -135°C) dondurma yöntemi ile her ay PDA da alt kültürleme yapılarak 1 yıllık saklamadan sonra kolonilerin canlılık ölçümü, konidi üretimi, spor canlılığı, mikro ve makro karakterizasyonu değişikliklerinin belirlenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Beauveria Bassiana* Hakkında Genel Bilgiler

Beauveria Bassiana'nın bilimsel sınıflandırmadaki yeri:

Alem: Fungi

Bölüm: Ascomycota

Sınıf: Sordariomycetes

Takım: Hypocreales

Familya: Cordycipitaceae

Cins: *Beauveria*

Tür: *Beauveria Bassiana*

Dünyada yaygın olarak bulunan *Beauveria bassiana*, Deuteromycetes sınıfından olan entomopatojenik bir fungusdur. Doğal olarak böceklerden ve toprak örneklerinden kolaylıkla izole edilmektedir. In vitro koşullarda petrilerin üzeri kreme yakın, plakaların arkası turuncuya yakın renktedir. Toprakta 5-38°C arasında, en iyi 23-28°C sıcaklık aralıklarında sporları üreyebilir, %92-100 bağıl nem aralığında çimlenebilir (Zimmermann, 2007).

Konidi yoluyla çoğalan *Beauveria bassiana* konukçuları üzerinde beyaz muskardin hastalığına sebep olmaktadır. Fungusun sporları böceğin üst deri tabakasına yapışarak çimlenir. Apressorium sonrasında penetrasyon çivisi oluşturarak üst deriye baskı uygular. Konukçunun üst derisinden vücudunun içine doğru hızla büyür. Bu mekanik baskıda etmenin enzimleri de önemli rol oynar. Proteazlar, kitinazlar ve lipazlar gibi çeşitli enzimler ve toksinler salgılayarak ve böceğin besinlerini kurutarak hızla çoğalır. Konukçusunun derisini ve tüm yüzeyini beyaz bir toz tabakası ile kaplar. Konukçusunun ölmesiyle birlikte nemli koşullar altında fungus konukçusunun vücudundan dışarı çıkar ve kadavranın dış yüzeyinde konidi üretir. Bu beyaz toz tabakası, içerisinde barındırdığı sporlarla diğer böcekleri enfekte etmek için büyük görev üstlenir. *Beauveria bassiana* konukçusunu enfekte etmesi için sadece temas yeterlidir. Diğer bakteriyel ve viral patojenler gibi konukçusunun kendisini yemesine ihtiyaç duymaz (Ocak vd., 2007). Enfekte ettiği

tarım zararlısı böcek türlerinden bazıları coleoptera, orthoptera, hymenoptera, homoptera ve lepidoptera türleridir (Fargues vd., 1997).

Beauveria bassiana ilk olarak böcek bilimci olan Agostino Bassi Di Lodi tarafından keşfedilmiş ve Vuillemin tarafından fungusu Bassi'nin ismi verilmiştir. Etmenin 1835'te İtalya da ipek böcekleri üzerinde beyaz pamuksu tabakalar oluşturan pebrine hastalığına neden olduğu saptanmıştır. Daha sonra fungusun beyaz bir toz ile kaplı olan ölü böceklerdeki görüntüsü, beyaz muskardin hastalığı olarak adlandırılmıştır (Mascarin, G. M. & Jaronski, S. T., 2016). *Beauveria bassiana* ilk tanımlandığı tarihten günümüze zararlı böceklerle mücadelede biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılmaktadır (Zimmermann, 2007).

Dünyada hem ılıman hem tropikal bölgelerde geniş yayılım gösterir ve cinsinin en yaygın türüdür. 707'e yakın zararlı böceğe karşı patojenik etkiye sahiptir. Hem saha koşullarında hem in vitro koşullarda beyazsinek, ekinbiti, ve yaprakbiti gibi çok sayıda zararlıya karşı kontrol ajanı olarak kullanılır. Türüne özgüdür bu yüzden hedef olmayan mikroorganizmalara karşı patojenik etki göstermemektedir (Sáenz-de-Cabezón Irigaray vd., 2003; Ocak vd., 2007; Zimmermann, 2007).

Konukçularına karşı beauvericin, bassianolide, isarolides ve beauverolides toksik maddeleri ürettiği bilinmektedir (Sandhu vd., 2012). Kültürde yada ılıman koşullarda çok fazla sayıda eşeysiz sporlar üreterek konukçusuna kolayca nüfuz etmekte ve bu sporlar rüzgar veya yağmur ile çok geniş alanlara taşınmakta, geniş alanlarda daha fazla konukçusuyla etkileşim haline girerek onlarda patojenik etki oluşturmaktadır (Deacon, 1983).

2.2. Entomopatojen Fungus Koleksiyonları için Saklama Yöntemleri

Fungal izolatların muhafazası için birçok yöntem geliştirilmiştir. Gallo ve ark. (2008)'e göre saklama yöntemleri 2 grupta değerlendirilebilir.

1. Fungusların metabolizma faaliyetlerinin devam etmesine izin veren,
2. Metabolizma faaliyetlerini durdurmasına göre sınıflandırılabilir.

Fungusların metabolizma faaliyetlerinin devam etmesini sağlayan yöntemler içerisinde saf suda koruma (Burdall, 1994), besiyerinde alt kültürleme (Smith ve Onions, 1994), 5-8 derecelerde soğuk saklama ve -20°C'de derin dondurma vardır. Steril suda saklamak birçok fungus türünün muhafazasında kolay ve ucuz bir yöntem olarak görünse de, fungus sporlarının canlılığını ve morfolojisini kaybetmeden sürdürebilmesi için başka depolama yöntemleriyle desteklenmelidir (Borman vd., 2006). Alt kültürleme fungusların korunması için basit ve az sayı da kültür için kolay bir işlemdir. Çok sayıda kültürün saklanması durumunda zaman alıcı, kontaminasyon riski fazla ve fungusun mutasyona uğrama durumu vardır (Homolka vd., 2007).

Fungus metobolizma faaliyetlerini durdurmada kullanılan yöntemler -70°C'de kurutma, silika jel (Ryan vd., 2001), liyofilizasyon (Morgan vd., 2006), sıvı nitrojen (Webb vd., 2018) veya kriyojenik dondurucu boncuklar yoluyla (Lakshmana vd., 2018) koruma kullanılabilir (Oliveira vd., 2011). Liyofilizasyon (dondurarak kurutma) ve kriyoprezervasyon (criyo tüp, sıvı nitrojenle depolama) ilk olarak 1960'larda tanıtılmış ve Hwang (1960) tarafından kaydedilmiştir. Kullanımları pek çok laboratuvarıda yaygınlaşmıştır. Çoğu fungus için en çok tercih edilen uzun süreli saklama yöntemleridir (Smith ve Ryan, 2004). Bu yöntemler funguslarda oluşabilecek yapısal hasar olasılığını en aza indiren yöntemler olsa bile (Borman vd., 2006); liyofilizasyon sporsuz kültürler için uygulanabilir değildir. Kriyoprezervasyon; Canlı hücreler aşırı donma ve çözünmeden zarar görmemesi için kimyasal kriyoprotektanlar kullanılır. Gliserol, trehaloz veya DMSO (dimetil sülfoksit) gibi uygun bir kriyoprotektan varlığında kontrollü soğutmayı içerir (Nakasone vd., 2004). Kriyoprotektanlarla kontrollü soğutma mikroorganizmalar için en güvenli yöntemlerden biri olmasına rağmen belli aralıklarla kaba, sıvı nitrojen verilmesini gerektirir (Hwang vd., 1976). Bu teknikler maliyetli olmasından dolayı pek tercih edilmeyebilir (Nakasone vd., 2004). Aşağıdaki tabloda diğer saklama yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları verilmiştir.

Tablo 2.1. Saklama yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları (Humber, R. A., 2012).

SAKLAMA YÖNTEMİ	AVANTAJLARI	DEZAVANTAJLARI
Saklama Sıcaklığı $\geq 0^{\circ}\text{C}$ (oda sıcaklığı yada buzdolabında)		
Seri aktarım (4°C'de saklama)	Teknolojik olarak basit Fenotipin sürekli izlenmesini sağlar	Fenotipik karakterler değişebilir Sürekli malzeme, işçilik ihtiyacı
Mineral yağ	Ucuz, teknolojik olarak basit	Yoğun yer kaplar; tüpler dik olmalıdır Kontaminantlar için izleme yapılmalıdır
Damıtılmış su durağanlığı	Ucuz, teknolojik olarak basit Küçük şişeler kullanılıyorsa çok az alana ihtiyaç duyar	Su seviyelerini kontrol etmeli ve muhafaza etmelidir Kontaminantlar için izlenmesi gerekir
Liyofilize (dondurularak kurutma)	Birçok fungus için standart yöntemler Kurutulmuş kültürler kolayca saklanır Oda sıcaklığında saklanabilir (ama 4C'de daha iyi)	Ekipman için ilk masraf büyüktür Ampuller buzdolabında saklanmalıdır Bazı funguslar için uygun değildir.
Standart veya ultra soğuk elektrikli (mekanik) dondurucularda $< 0^{\circ}\text{C}$'de saklama		
Silika jel (-20 °C'de)	Ucuz, teknolojik olarak basit Standart cihaz tipi dondurucu kullanır Kültür başına birden fazla tüp depolama zorunluluğu yoktur -20 °C'de yada oda sıcaklığında saklanabilir	Uzun vadeli başarı vidalı kapağın güvenliğine bağlıdır Elektrik kesintileri sırasında kayıplara maruz kalır
Standart dondurucu (-20 °C)	Ucuz ve kolaylıkla temin edilebilir	Önerilmez (silika jel veya filtre kağıdı üzerindeki kültürler hariç) Elektrik kesintileri sırasında kayıplara maruz kalır
Ultra soğuk dondurucu (-80 yada -120°C)	Kullanışlı, birçok laboratuvarında yaygın olarak bulunur Sıvı N ₂ olmadan uzun süreli depolama Yaklaşık tüm kültürlü (ve kültürsüz) funguslar için uygundur	Buz kristalleri, kriyoviallerin işlenmesine bağlı olarak oluşabilir ve büyüyebilir Elektrik kesintileri sırasında kayıplara tabidir Sıvı nitrojen yedeklemesi şiddetle tavsiye edilir
Sıvı nitrojen (LN₂) dondurucularında (dewars) $\leq -120^{\circ}\text{C}$'de saklama		

Buhar fazı (- 120 ila -196°C)	Eşsiz depolama süresi Uzun vadeli uygulanabilirlik maksimize edilir Tüm kültürlenmiş (veya kültürlenmemiş) fungus türleri saklanabilir LN ₂ kaynağı flakon içeriğini kontamine edemez Çözündüğünde flakonların patlama riski yoktur	Yüksek başlangıç ve devam eden maliyetler Uygun fiyatlı LN ₂ 'ye sürekli erişim gereklidir Sıcaklık stabilitesi, dewar tasarımına ve depolama raf sistemine bağlıdır LN ₂ seviyelerini sürekli olarak izlemeli ve sürdürmelidir Kesintisiz elektrik hizmetine bağlı olarak otomatik LN ₂ seviye kontrolü ve ikmali gerekli
LN ₂ 'ye daldırılmış (- 196 °C)	Daldırıldığında sıcaklık sabittir Depolama sırasında buz kristali oluşumu olası değildir Azot seviyelerinin izlenmesi en aza indirilir LN ₂ dewarda kaldığı sürece elektrik kesintilerinden etkilenmez	LN ₂ 'nin kriyoviallere sızmasına karşı garanti yok Flakon içeriği LN ₂ sızıntısı ile kontamine olabilir Sızan LN ₂ içeren flakonlar çözündüğünde patlayabilir

2.3. Literatür Özetleri

Ayala-Zermeño vd., (2017), bu çalışmada, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium acridum*, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium rileyi*, *Isaria javanica*, *Hirsutella thompsonii*, *Hirsutella citriformis* ve *Lecanicillium lecanii* türleri mineral yağ (MO), steril suda saklama (SW), silika jel (SG), liyofilizasyon (L), -70 °C'de ultra derin dondurucu ve -196 °C'de kriyoprezervasyon saklama yöntemleri kullanılmıştır. Fungus konidilerinin yaşabilirliği saflığı konidi üretimi ve kültürlerin morfolojik özelliklerinin 6, 12 ve 24 aylarda korunması değerlendirilmiştir. Genetik stabilite, 24 ayda çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi (AFLP) analizi ile test edilmiştir. Test edilen sekiz EPF türünden üçü SW'de, beşi MO ve L'de, altısı -70 °C'de, yedisi SG'de ve sekizi -196 °C'de canlı kalmıştır. -196 °C'de kriyoprezervasyon, -70°C'de derin dondurma, liyofilizasyon ve silika jel, entomopatojen fungus türünün korunması için en etkili saklama yöntemi olmuştur. *Beauveria bassiana*, *Metarhizium acridum*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria javanica* ve *Metarhizium rileyi* izolatları değerlendirilen tüm

yöntemlerle stabil kalırken, *Hirsutella thompsonii*, *Hirsutella citriformis* ve *Lecanicillium lecanii* daha az uyumlu olduğu bulunmuştur. Bu fungusların konidi canlılığını koruyacak farklı saklama yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

Toegel vd., (2010), yaptığı çalışmada, *Beauveria bassiana* gibi entomopatojenik fungus olan *Beauveria brongniartii* ve *Metarhizium anisopliae* liyofilizasyon işlemi yapılarak konidyumları ve biyokütleleri üzerinde etkisi değerlendirilmiştir. *Beauveria brongniartii* ve *Metarhizium anisopliae*'nin konidileri yüksek derecede dondurmaya karşı önemli derece hassasiyet gösterirken, *Metarhizium anisopliae* kurutma işlemine karşı hassasiyet göstermiştir. Liyofilizasyon işleminden sonra konidilerin hayatta kalması üzerinde etkisini değerlendirmek amacıyla farklı formülasyonların sağladığı stabilite araştırılmıştır. Kriyoprotektan olarak kullanılan früktoz, glikoz ve sakarozun fungusların konidilerinin yaşabilirliğini artırdığı gözlenmiştir. Ayrıca früktoz ile dekstran 4 'un kombinasyonu, fungus biyokütlesine iyi fiziksel özellikler vererek işlenmesini kolaylaştırmıştır. *Beauveria brongniartii*'nin izolatları -70 °C'deki ultra dondurmada 24 ay sonrasında canlı kalmış, iyi büyüme ve sporlama göstermiştir. Ancak *Metarhizium anisopliae* -70°C'de 6 ay sonra canlılığını kaybetmiştir.

Japonya'da Kitamoto ve Suzuki (2002), yapmış oldukları çalışmada Oomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota ve mitosporik misetler dahil olmak üzere 66 fungus stok kültürünün düşük sıcaklıklarda ve sıvı nitrojende dondurularak konidi canlılık testlerine tabi tutulmuştur. Bu çalışmada kültürler , -85°C'de %10 gliserol içeren talaş besiyerinde 20 ay süre ile başarılı bi şekilde muhafaza edilmiştir. Gliserolün etilen glikolden daha etkili bir kriyoprotektan olduğu ve bir kriyoprotektan kullanılan talaş dondurma yönteminin, agar diskleri kullanılan diğer dondurma yöntemlerine göre en uygun yöntemlerden biri olduğu sonucuna varılmıştır. %10 gliserol içeren talaş ortamının, kriyoprezervasyon yönteminde en iyi sonucu verebileceğini bildirilmişlerdir.

Sandhu (1993), yapmış olduğu çalışmada, *Beauveria bassiana*'nın formüle edilmemiş konidileri beş farklı sıcaklıkta (0, 10, 20, 30 ve 40°C) altı farklı bağıl nemde (RH) (0, 33, 53, 75, 85 ve %98) saklanmıştır. Konidi canlılığı ve nohut kurdu olarak bilinen *Helicoverpa armigera*'nın üçüncü evre lavralarına karşı virülansı 24 ay boyunca test edilmiştir. Konidi, daha düşük sıcaklıklarda (0-20°C) ve daha düşük

RH seviyelerinde (%0-53 RH) en uzun süre hayatta kalmıştır. Daha yüksek sıcaklıklarda (30-40°C) konidi yaşamamıştır. Sıcaklık 30°C'den 0°C'ye düşürüldüğünde, neredeyse tüm bağıl nem seviyelerinde konidyumların ömrü artmıştır. Konidi, *Helicoverpa armigera*'nın üçüncü evre larvaları için uygun depolama koşulları altında 24 ay boyunca virulent olarak kalmıştır. *Beauveria bassiana*'nın konidileri, daha düşük sıcaklıklarda (0-10°C) 24 aylık depolamadan sonra bile canlılığını koruduğu tespit etmişlerdir.

Brezilya'da Alves ve arkadaşlarının (1996), yapmış olduğu çalışmada, depolama sıcaklıklarının *Beauveria bassiana*'nın konidilerinin yaşayabilirliği üzerindeki etkisini analiz etmişlerdir. Formülasyonlarda kullanılan taşıyıcı malzemeler arasında talc (sulu magnezyum silikat), silika jel, toz pirinç ve mısır nişastası kullanılmıştır. Formülasyonlar plastik kaplarda üç farklı sıcaklık koşullarında saklanmıştır. Ortam sıcaklığı (15-38 °C), buzdolabı (6 ± 2 °C) ve dondurucu da (-10 -7 °C). Çalışmanın amacı, farklı taşıyıcı malzemelerle formüle edilmiş *Beauveria bassiana*'nın canlılığı ve virülansı üzerinde uzun süreli depolamanın etkilerini incelenmesidir. Saklanan konidilerin en yüksek çimlenmesi için gerekli olan süre ve saklama koşullarının çimlenme hızına etkisi üzere çalışma yürütülmüştür. Ortam sıcaklığında saklanan formülasyonlar 1±8 ay sonra canlılığını tamamen yitirmiştir. Buzdolabında saklamanın neden olduğu çimlenmedeki gecikme ve düşük virülans, *B. bassiana* konidilerinin uzun süreli saklanması için bu koşullardan kaçınılması gerektiği düşündürmüştür. *Beauveria bassiana* konidilerinin canlılığının ve virülansının uzun süre maksimum düzeyde korunması için dondurucuda (- 10 - 7°C) saklanması önerilmiştir, canlılığın korunması en az 7 yıl olmak üzere daha uzun süreler boyunca gerçekleşmiştir.

Beauveria bassiana'nın canlılığı ve virülansı, düşük sıcaklıkta uzun süreli depolamadan sonra değerlendirildiği başka bir çalışmada, fungus daha önceden pişirilmiş pirinçte üretilmiş ve %15.5 nem içeren saf konidi -7 ± 1 °C'de bir dondurucuda saklanmıştır. 0, 5, 8, 50, 75 ve 80 aylık depolama sonrasında PDA besiyerinde konidi canlılığı ve *Diatraea saccharalis* (F.) larvaları üzerinde virülans testleri yapılmıştır. *Diatraea saccharalis* larvalarına karşı yüksek virülans ile fungus tüm uygulamalarda %100 canlılığını korumuştur, bu nedenle dondurucuda

saklama, saf *Beauveria bassiana* konidisini en az 80 ay boyunca saklamak için iyi bir prosedür olduğu kanıtlanmıştır (Marques vd., 2000).

Faria vd., (1999), yapmış olduğu çalışmada, aralarında *Beauveria bassiana*'nın da olduğu bazı funguslar (*Metarrhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi*, *Paecilomyces farinosus*, *Paecilomyces fumosoroseus* ve *Paecilomyces lilacinus*) konidial canlılıkları değerlendirilmek amacıyla liyofilizasyon ve sıvı nitrojen içinde muhafaza edilmiştir. Kriyoprotektan olarak %10 gliserol kullanılan sıvı nitrojende saklamada, kültürler 16 ila 84 aya kadar saklanmış ve kültürlerin çimlenme oranları ortalama %13,3'ten daha az düşmüştür. Konidinin liyofilizasyonunda %3 glikoz ve %3 jelatin karışımı kullanılmıştır. 4 °C'de 29 ila 49 aylık saklanan kültürler için %41 ila %94 arasında bir canlılık kaybı gözlenmiştir. Sonuç olarak sıvı azotun özellikle entomopatojenik fungusların uzun süreli saklamada canlılığını koruduğu belirlenmiştir.

Pasarell vd., (1992), yapmış olduğu çalışmada, *Beauveria bassiana* izolatları, -70°C'de patates dekstroze agar (PDA) üzerinde 6 ay ile 13 yıl arasında değişen sürelerle alt kültürleme yapılmıştır. Düşük sıcaklıkta depolama kısa ve uzun süreler tıbbi ve tarımsal açıdan önemli olan fungusların birçoğunu korumak için uygun bir yöntemdir, çünkü izolatlar metabolik olarak inaktif durumda tutulmaktadır.

Depolama sıcaklıklarının ve farklı taşıyıcıların *Beauveria bassiana*'nın konidileri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Sporlar 3 farklı taşıyıcıda ve 22, 4 ve -20°C de test edilmiştir. Çalışma, canlılık yüzdesi ve çimlenme *Tenebrio molitor* (hedef organizma)'a karşı virülans değerlerini kapsamıştır. Çimlenme değerleri için hem taşıyıcı hemde sıcaklıklar arasında büyük ölçülerde değişkenlik tespit edilmiştir. *B. bassiana*'nın saklanması için her açıdan, özellikle her iki düşük sıcaklıkta da tutulduğunda, besleyici taşıyıcının en uygun olduğu bulunmuştur. 4°C'de 90 gün süreyle saklanmada çimlenme değeri %97.67 olarak gözlenmiştir (Šimková, J. 2009).

Kore'de Kim vd., (2019), yapmış olduğu çalışmada, *Beauveria bassiana*'nın uzun süreli koruma için en uygun şartları belirlemek için, fungusun darı ve pirinç taneleri üzerinde farklı sıcaklıklarda konidi çimlenme değerleri ölçülmüştür. Konidi çimlenme oranı darı ve pirinçte, 37 °C'de 6 aylık saklamadan sonra %50 ila

%75 oranında düşmüştür ve 7 ayın sonunda tamamen düştü. 4 °C'de ve 25, 30°C sıcaklıklarda 24 aya varan sürelerde çimlenme oranı yüksek %85 ölçülmüştür. Süre ve sıcaklık çimlenme oranını etkilemiştir. Bu sonuçlara bakılarak 4 ile 30 °C'de saklanması konidi canlılığını ve virülensini koruduğu sonucuna varılmıştır.

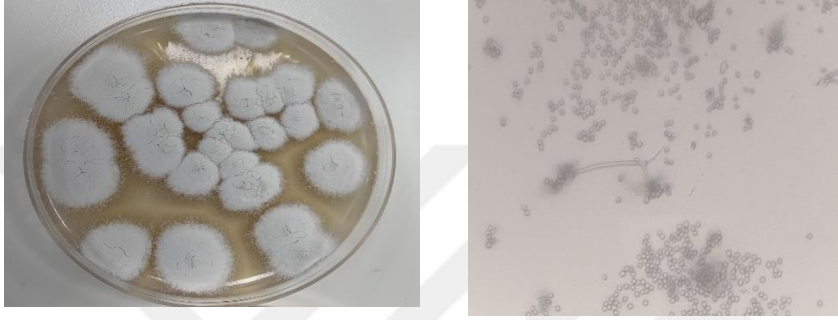
Sánchez-Peña vd., (1995), yapılan çalışmada, 2 farklı *Beauveria bassiana* izolatlarının sıvı nitrojen ve laboratuvar koşullarında saklamasının ardından duyarlı konukçuları *Pogonomyrmex barbatus* üzerinde virülansı karşılaştırılmıştır. 4 yıl boyunca sıvı nitrojende tutulmuştur. Karıncalar konidi süspansiyonlarında çalkalanıp nemli odalarda inkübe edilmiştir. 6. günün sonunda karıncalar arasında ölüm oranı karşılaştırılmıştır. Sıvı nitrojende (-196°C) saklama fungusun virülensini, 4-25°C'lik bir termal ortamda saklanan diğer fungusa kıyasla önemli ölçüde değişmediği gözlenmiştir.

Friulu vd., (2021), yapmış oldukları çalışmada, *Beauveria bassiana* izolatları Hidroksietil selüloz steril toz (HEC) ile dondurulacak kurutulmuştur ve konidi konsantrasyonun stabilitesi değerlendirilmiştir. Numuneler $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de ve %90 bağıl nemde karanlık bir bağlayıcı klima odası içinde tutulmuştur. *Beauveria bassiana* büyüme hızı ve konidial konsantrasyon stabilitesi 24 gün boyunca 4 günde bir değerlendirilmiştir. Rehidrasyon sonrası etmenin canlılığı test edilmiştir. HEC' nin *Beauveria bassiana* için toksik olmadığı ve kontrol numuneye kıyasla büyümesini ve yaşayabilirliği gözlemlenmiştir. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde depolama sonrasında hiçbir konidial konsantrasyon kaybı görülmediği gözlenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. *Beauveria Bassiana* İzolatları

Bu çalışmada *Beauveria bassiana*'nın 20-01 ve 20-02 kodlu izolatları Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bitki Koruma bölümü Mikoloji Laboravutarı kültür stoklarından sağlanmıştır.



Şekil 3.1. Bilimsel çalışmalarda kullanılan *Beauveria bassiana* izolatının petri ve mikroskopik görüntüsü

3.2. Farklı Saklama Koşullarının *Beauveria Bassiana* İzolatlarının Canlılığına Etkileri

Kültür stoklarından alınan 20-01 ve 20-02 kodlu izolatlar PDA (200 g/L Patates infüzyonu, 15 g/L Agar, 20 g/L şeker) ortamına ekilmiş ve karanlıkta $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 18 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra gelişen kültürlerden 6×10^7 spor/mL'lik spor süspansiyonları oluşturulmuş ve bunlar %35 gliserol ve %15 DMSO'de, 2 mL'lik cryo tüpler içerisinde -20 , -86 ve -135°C 'de 4 tekerrürlü olacak şekilde saklanmıştır. Bunun yanında 24°C 'de fungal kültürlerin saklanması için izolatlar üzerindeki olası etkileri kültürlerin PDA ortamına aylık aktarılmasıyla takip edilmiştir. Bu amaçla PDA'da geliştirilen 4 haftalık kültürlerin kenarlarından 10 mm'lik diskler kullanılmıştır.



Şekil 3.2. *Beauveria bassiana* izolatlarının farklı saklama koşullarında depolanması

3.3. Canlılık Ölçümü

Her izolatın canlılığı 1 yıllık bir depolamadan sonra değerlendirilmiştir. Fungal kültürlerin değerlendirilmesi, ilgili işlemin cryo tüplerinde bulunan 3×10^7 spor/mL'lik spor süspansiyonundan 2 µL'nin içerisinde PDA bulunan 9 cm çapındaki petri kaplarının merkezine inokulasyonuyla gerçekleştirilmiştir. Deneme 4 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve petriler 18 gün boyunca $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilerek fungal kültürlerin radyal büyümesi ölçülmüştür.

3.4. Konidi Üretimi

Her bir izolat tarafından üretilen konidi potansiyeli 18 günlük bir inkübasyondan sonra 9. ve 18. günlerde değerlendirilmiştir. Bunun için canlılık değerlendirilmesinde elde edilen PDA kültürlerinden 500 µL sulu bir Tween 80(0,02, v/v) çözeltisine konidi süspansiyonu alınmış ve sonrasında Thoma lamı yardımıyla konidi üretim potansiyeli mL/konidi olarak saptanmıştır.

3.5. Sporların Canlılığı

Sporların canlılığı, çimlenen konidi yüzdesi belirlenerek ölçülmüştür. İşlemler 9. ve 18. gün sayımları için 2 sefer yapılmıştır. Bu amaçla, ilgili işlemlerin cryo tüplerinde bulunan 10^7 spor/mL'lik süspansiyondan 500 µL alınarak 10^6 spor/mL içeren spor süspansiyonları oluşturulmuş ve bunlardan 1 mL alınarak, agar ortamı (15g/L agar-agar) içeren 9 cm'lik petri kaplarına yayılmıştır. 24 saat boyunca karanlıkta $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de inkübasyondan sonra, çimlenme yüzdesi, petri kabı başına toplam 300 spordan çimlenen ve çimlenmeyen sporların sayısı belirlenerek değerlendirilmiştir. Her depolama yöntemi için ölçüm 4 kez tekrarlanmıştır.

3.6. Kolonilerin Makroskobik ve Mikroskobik Karakterizasyonu

Kolonilerin makroskobik özellikleri 18 günlük bir inkübasyonun sonunda fungal kültürlerin miseliyal dokusu, koloniyal renk ve sınır görünümü, besiyeri pigmentasyonu ve ekzudat üretimi incelenerek ortaya konulmuştur. Mikroskobik karakterizasyon 18 günlük bir inkübasyonun sonunda kültürlerin laktofenol

mavisiyle boyanması sonrasında Zeiss Primostar 3 model mikroskop altında yapılan incelemelerle belirlenmiştir.

3.7. Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi

Tesadüf parselleri deneme desenine göre 4 tekerrürlü olarak yürütülen denemelerde, elde edilen veriler, SAS programıyla varyans analizine tabi tutulmuş (SAS Enstitüsü, Cary, NC, ABD), ortalamaların karşılaştırılmasında Duncan (DMRT) testi kullanılmıştır ($p < 0,05$).



Şekil 3.3. Elde edilen sonuçların yazılması

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, *Beuaveria bassiana* izolatlarının laboratuvar koşullarında uzun süreli saklamanın gerekli olduğu durumlar için en uygun saklama yönteminin tespiti amaçlanmıştır. Bir yıllık depolamanın ardından kurulan denemeler 9. ve 18. günde yapılan 2 gözlemle değerlendirilmiştir.

4.1. Canlılık ölçümü Değerlendirmesi

Ölçüm sonuçlarına bakıldığında 9. günde *Beauveria bassiana* 20-01 %15 DMSO -135°C'de, kontrol izolatına kıyasla en yüksek farklı sonucu vermiştir (59,25 mm). 18. gün ölçüm sonuçlarına bakıldığında da benzer bir sonuç ile en yüksek değeri verdiği gözlenmiştir (67,75 mm). 9. günün ölçümünde *Beauveria bassiana* 20-02 %35 gliserol (-135 °C) tüm izolatların içinde en düşük sonuçları verirken (47,75 mm), son ölçümde kontrol izolatlarının üstünde bir değere ulaştığı saptanmıştır. (59,25 mm).

Tüm işlemlerde ölçülen radyal koloni çapı değerleri son ölçümde/18. günde kontrol grubuna göre daha yüksek seyretmiştir

Tablo 4.1. *Beauveria bassiana* izolatlarının 9. günde canlılık ölçümü değerleri

Canlılık Ölçümü (mm)				
İşlem	%35 Gliserol		%15 DMSO	
	<i>Beauveria bassiana</i> 20-01	<i>Beauveria bassiana</i> 20-02	<i>Beauveria bassiana</i> 20-01	<i>Beauveria bassiana</i> 20-02
-135°C	55,75 ^a	45,75 ^a	59,25 ^a	45,00 ^a
-86°C	49,50 ^b	46,50 ^a	51,00 ^b	48,00 ^b
-20°C	52,75 ^{ab}	48,50 ^a	51,00 ^b	49,00 ^a
24°C	49,25 ^b	46,75 ^a	49,25 ^b	46,75 ^a

*Bir sütünde yer alan aynı harfle gösterilen ortalama değerler, istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir (p<0,05) (SAS Institute, Cary, NC, ABD).

Tablo 4.2. *Beauveria bassiana* izolatlarının 18. günde canlılık ölçümü değerleri

Canlılık Ölçümü (mm)				
İşlem	%35 Gliserol		%15 DMSO	
	<i>Beauveria bassiana</i> 20-01	<i>Beauveria bassiana</i> 20-02	<i>Beauveria bassiana</i> 20-01	<i>Beauveria bassiana</i> 20-02
-135°C	66,50 ^a	59,25 ^a	67,75 ^a	59,00 ^a
-86°C	64,25 ^a	59,75 ^a	66,75 ^a	60,50 ^a
-20°C	62,50 ^a	56,00 ^a	62,75 ^a	60,00 ^a
24°C	57,00 ^b	56,50 ^a	57,00 ^b	56,50 ^a



Şekil 4.1. Petri kaplarında bulunan *B. bassiana* izolatlarının canlılık ölçümü

4.2. Konidi Üretimi Değerlendirmesi

Konidi üretiminde, 9. günün ölçümünde *Beauveria bassiana* 20-02 %35 gliserol (-86 °C) diğer izolatlarla göre en yüksek değeri verirken ($7,05 \times 10^6$ spor/mL), *Beauveria bassiana* 20-01 %15 DMSO (-86°C) ise kontrol grubunun da dahil olduğu tüm işlemlerde en düşük değeri vermiştir ($1,80 \times 10^6$ spor/mL). *B. bassiana* 20-01 %35 gliserol ile 20-02 %15 DMSO ise -135°C’de benzer sonuçlar vermiştir.

18. günün ölçüm sonuçlarına göre ise, *B. bassiana* 20-01 ve 20-02 -20°C’de %35 gliserol ve %15 DMSO’da en yüksek değerleri vermiş ($1,3 \times 10^7$ spor/mL). Onu -135 ve 24°C işlemleri takip etmiştir.

Tablo 4.3. *Beauveria bassiana* izolatlarının 9. günde konidi üretimi değerleri

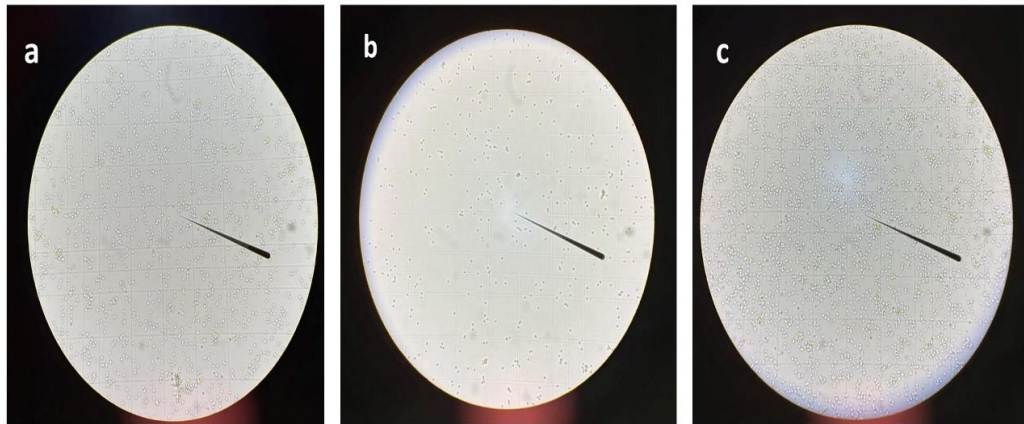
Konidi Üretimi (10^6 spor/mL)				
İşlem	%35 Gliserol		%15 DMSO	
	<i>Beauveria bassiana</i> 20-01	<i>Beauveria bassiana</i> 20-02	<i>Beauveria bassiana</i> 20-01	<i>Beauveria bassiana</i> 20-02
-135°C	3,92 ^a	3,30 ^b	2,52 ^b	3,40 ^a
-86°C	3,15 ^a	7,05 ^a	1,80 ^b	4,02 ^a
-20°C	3,00 ^a	6,70 ^a	2,87 ^{ab}	5,70 ^a
24°C	4,30 ^a	5,40 ^{ab}	4,30 ^a	5,40 ^a

* Bir sütünde yer alan aynı harfle gösterilen ortalama değerler, istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir ($p < 0,05$) (SAS Institute, Cary, NC, ABD).

Tablo 4.4. *Beauveria bassiana* izolatlarının 18. günde konidi üretimi değerleri

Konidi Üretimi (10^6 spor/mL)				
İşlem	%35 Gliserol		%15 DMSO	
	<i>Beauveria bassiana</i> 20-01	<i>Beauveria bassiana</i> 20-02	<i>Beauveria bassiana</i> 20-01	<i>Beauveria bassiana</i> 20-02
-135°C	4,40 ^{bc}	4,08 ^{bc}	5,25 ^b	4,37 ^{ab}
-86°C	4,80 ^b	3,37 ^c	3,80 ^c	3,02 ^b
-20°C	13,08 ^a	11,75 ^a	9,27 ^a	4,92 ^a
24°C	3,40 ^c	5,65 ^b	3,40 ^c	5,65 ^a

* Bir sütünde yer alan aynı harfle gösterilen ortalama değerler, istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir ($p < 0,05$) (SAS Institute, Cary, NC, ABD).



Şekil 4.2. Konidi üretimi a) 20-01 -135°C gliserol, b) 20-02 -86°C gliserol, c) 20-02 -20°C gliserol

4.3. Spor Canlılığı Değerlendirmesi

9. gün ölçüm sonuçlarına göre *B. bassiana* 20-01 24°C’de en yüksek değeri vermiş onu %35 gliserol -135°C işlemi takip etmiştir (179,50). En düşük değerler ise *B. bassiana* 20-01 %15 DMSO -20°C işleminde ölçülmüştür.

18. gün ölçüm sonuçlarına spor canlılığı en yüksek 24°C’de saptanmış, bunu 20-02 %35 gliserol -86°C işlemi takip etmiştir (106,75). Çalışmada en en düşük spor canlılığı 20-02 %35 gliserol -20°C işleminde saptanmıştır.

9. ve 18. gün ölçüm sonuçları birlikte değerlendirildiğinde 24°C’de aylık aktarmalarda en iyi spor canlılık değerleri elde edilmiş, bunu -135°C’de Gliserol ve DMSO işlemleri her iki izolat için verdiği istikrarlı ve birbirine yakın değerlerle takip etmiştir. Ancak -86°C’de izolatların Gliserol ve DMSO tercihlerinin oldukça geniş bir aralıkta değiştiği saptanmıştır.

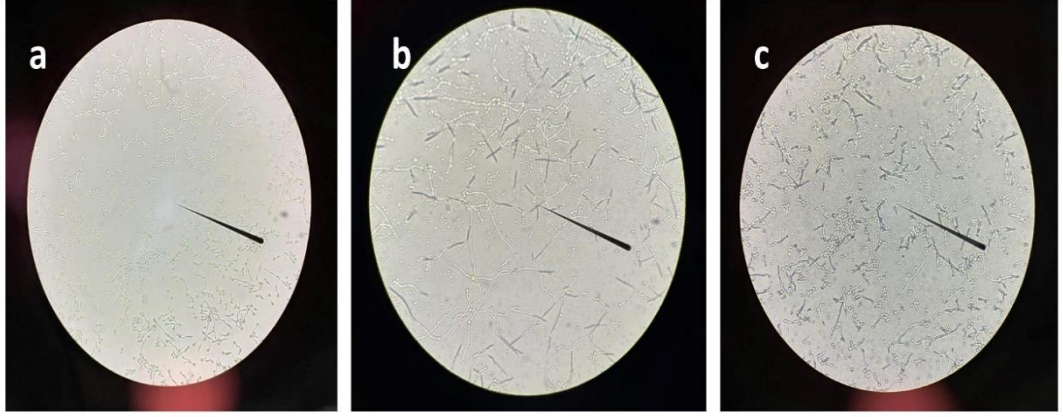
Tablo 4.5. *Beauveria bassiana* izolatlarının 9. günde spor canlılığı değerleri

Spor Canlılığı				
İşlem	%35 Gliserol		%15 DMSO	
	<i>Beauveria bassiana</i> 20-01	<i>Beauveria bassiana</i> 20-02	<i>Beauveria bassiana</i> 20-01	<i>Beauveria bassiana</i> 20-02
-135°C	179,50 ^b	178,25 ^b	109,25 ^b	77,50 ^b
-86°C	100,25 ^c	91,00 ^c	96,75 ^b	66,25 ^b
-20°C	5,25 ^d	12,25 ^d	3,50 ^c	10,25 ^c
24°C	242,25 ^a	206,75 ^a	242,25 ^a	206,75 ^a

* Bir sütünde yer alan aynı harfle gösterilen ortalama değerler, istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir (p<0,05) (SAS Institute, Cary, NC, ABD).

Tablo 4.6. *Beauveria bassiana* izolatlarının 18. günde spor canlılığı değerleri

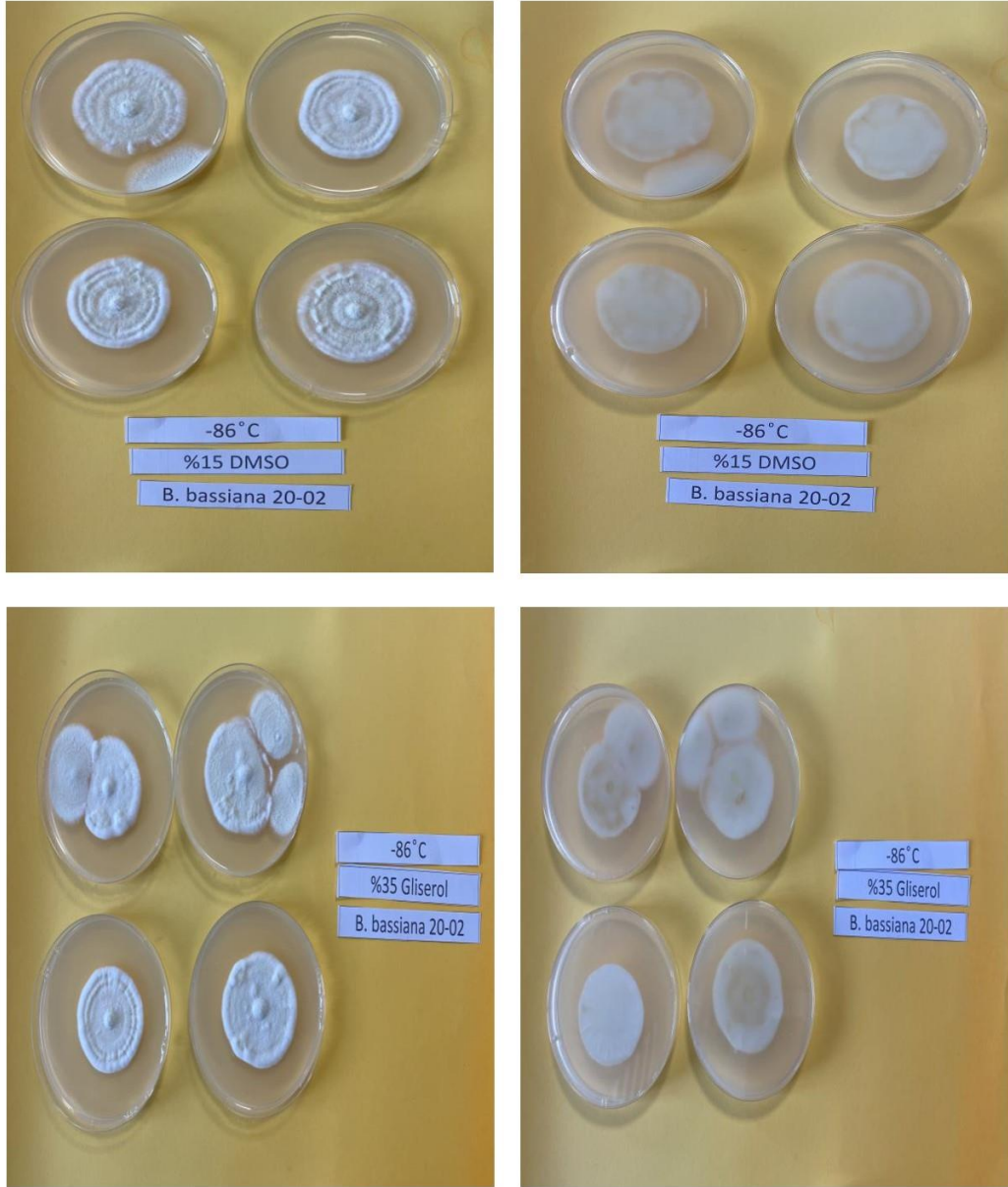
Spor Canlılığı				
İşlem	%35 Gliserol		%15 DMSO	
	<i>Beauveria bassiana</i> 20-01	<i>Beauveria bassiana</i> 20-02	<i>Beauveria bassiana</i> 20-01	<i>Beauveria bassiana</i> 20-02
-135°C	79,75 ^b	86,00 ^b	80,75 ^b	79,50 ^b
-86°C	59,50 ^c	106,75 ^b	33,50 ^c	84,75 ^b
-20°C	7,75 ^d	3,00 ^c	4,50 ^d	3,25 ^c
24°C	248,50 ^a	255,75 ^a	248,50 ^a	255,75 ^a



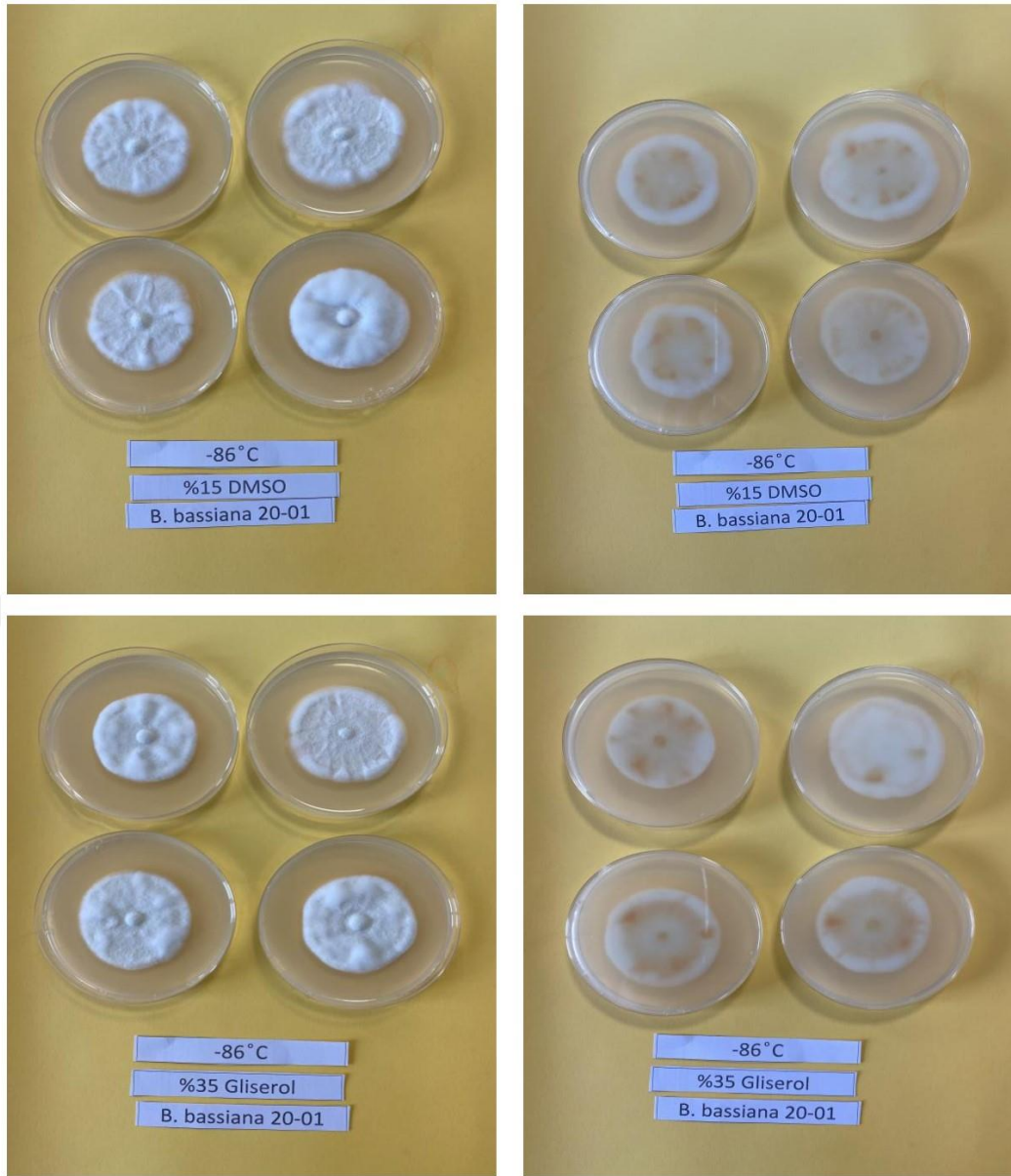
Şekil 4.3. Spor canlılığı a) 20-02 24 °C oda sıcaklığı çimlenme, b) 20-02 - 86°C gliserol, c) 20-01 -135°C DMSO

4.4. Makroskopik ve Mikroskopik Gözlemler

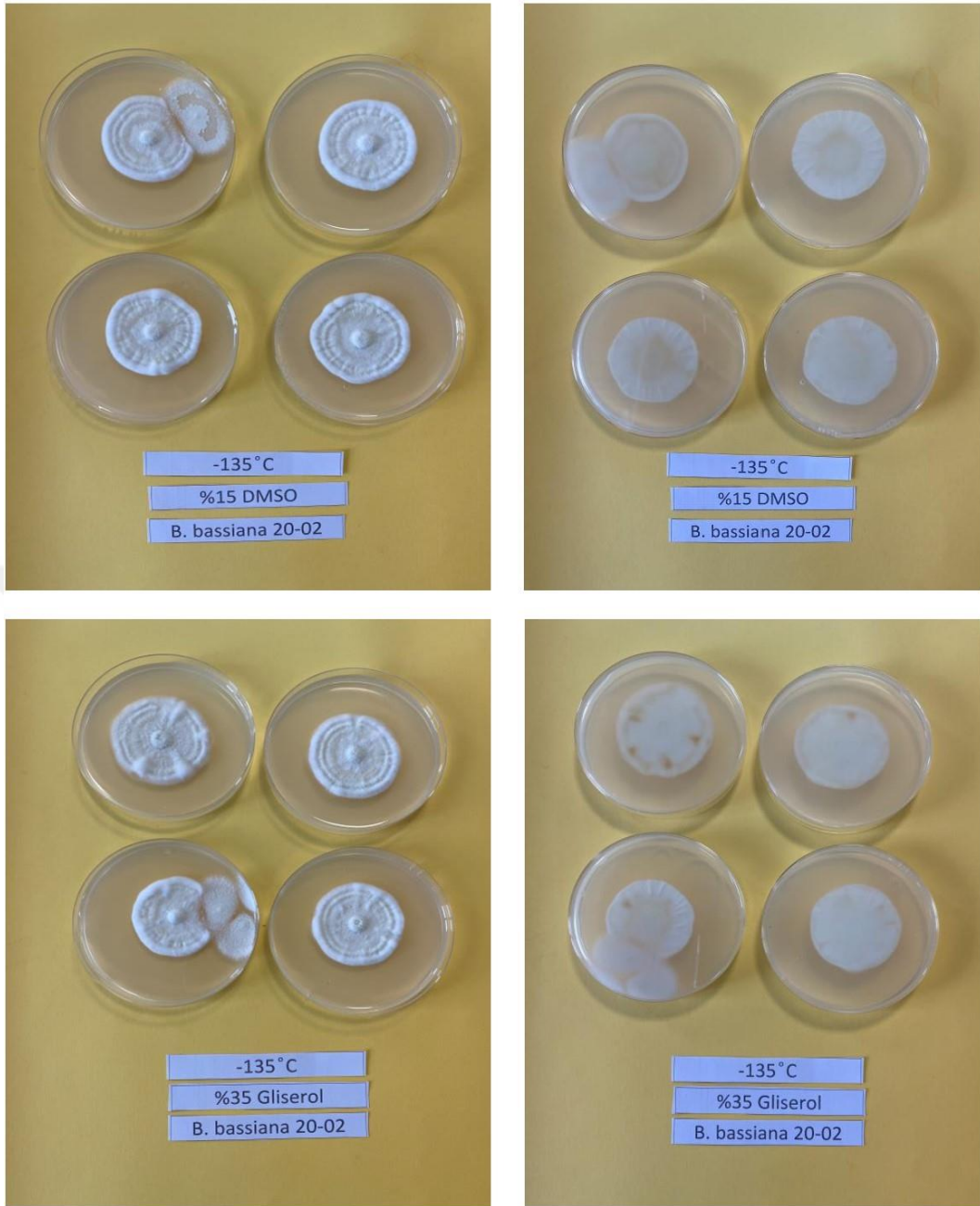
Makroskopik gözlem sonuçlarına bakıldığında bir yıl boyunca farklı saklama koşullarında geliştirilen izolatlar arasında 9. ve 18. günlerde gerçekleştirilen gözlemlerde; genel olarak besiyerlerinde kenar kısımlarında havai gelişim, miselyal dokusu sıkı, petri üzerinde koloniyal renk kreme yakın, sınır görünümü net, petri arka yüzeyinde renk pigmentasyonu yok, ekzudat üretimi görülmediği gözlenmiştir. Ancak bu genel gözlemden farklı olarak *B. bassiana* 20-01 izolatları -86°C %35 gliserol ve %15 DMSO ve -20°C %35 gliserol ve %15 DMSO petri kaplarında, petri arka yüzeyinde hafif renk pigmentasyonu vermiştir.



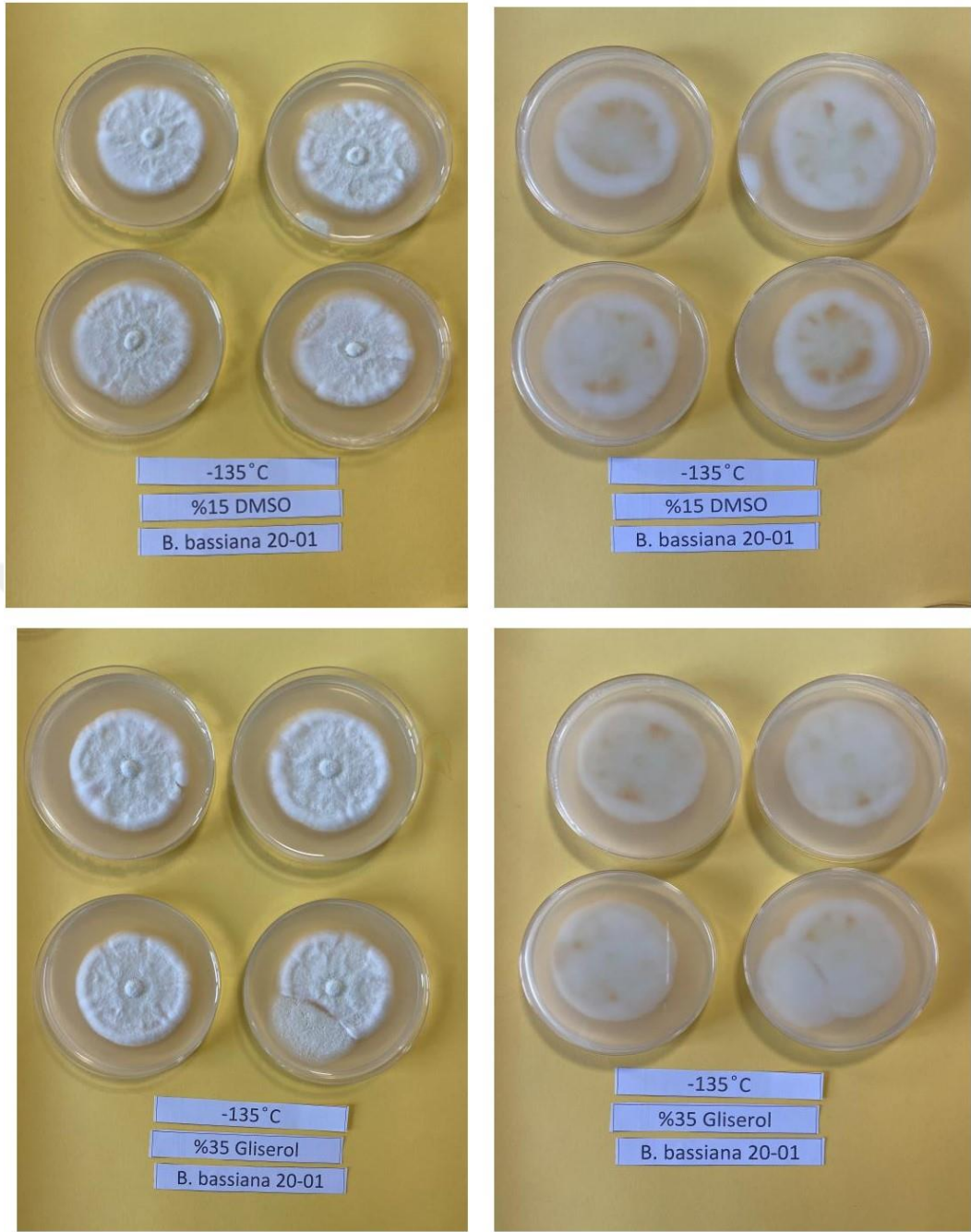
Şekil 4.4. Petri kaplarında -86°C’de *Beauveria bassiana* 20-02 izolatlarında makroskopik gözlemler



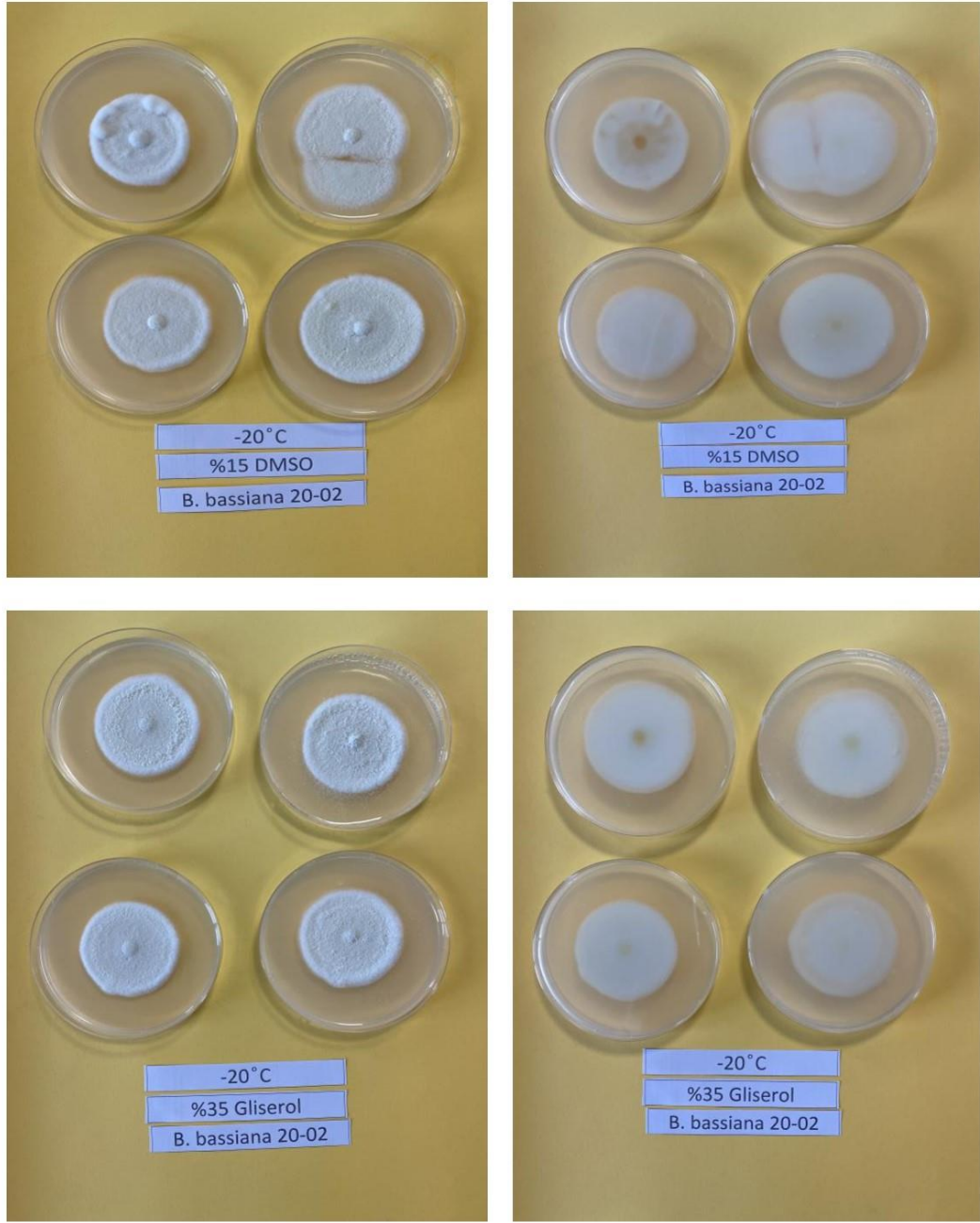
Şekil 4.5. Petri kaplarında -86°C’de *Beauveria bassiana* 20-01 izolatlarında makroskopik gözlemler



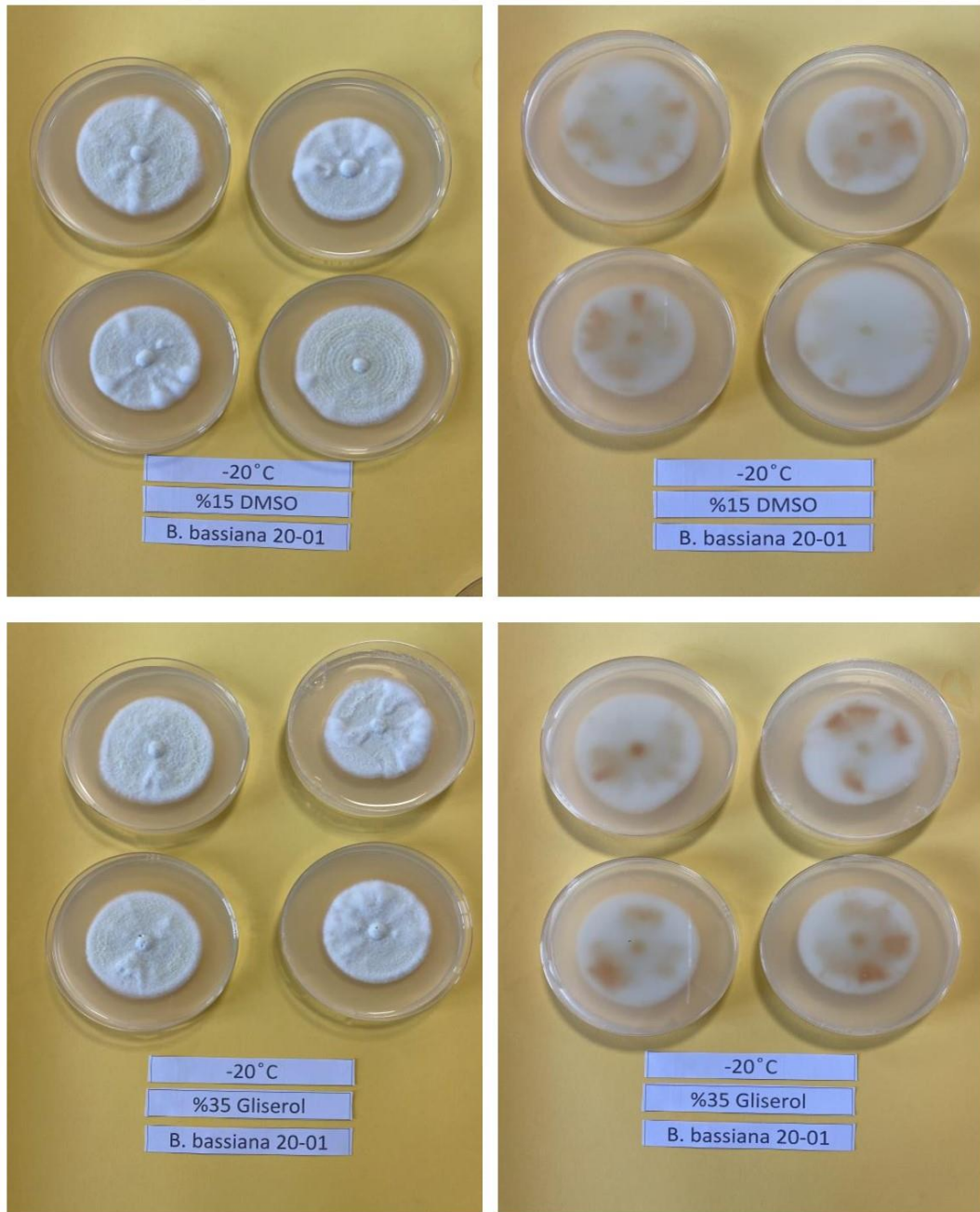
Şekil 4.6. Petri kaplarında -135°C’de *Beauveria bassiana* 20-02 izolatlarında makroskopik gözlemler



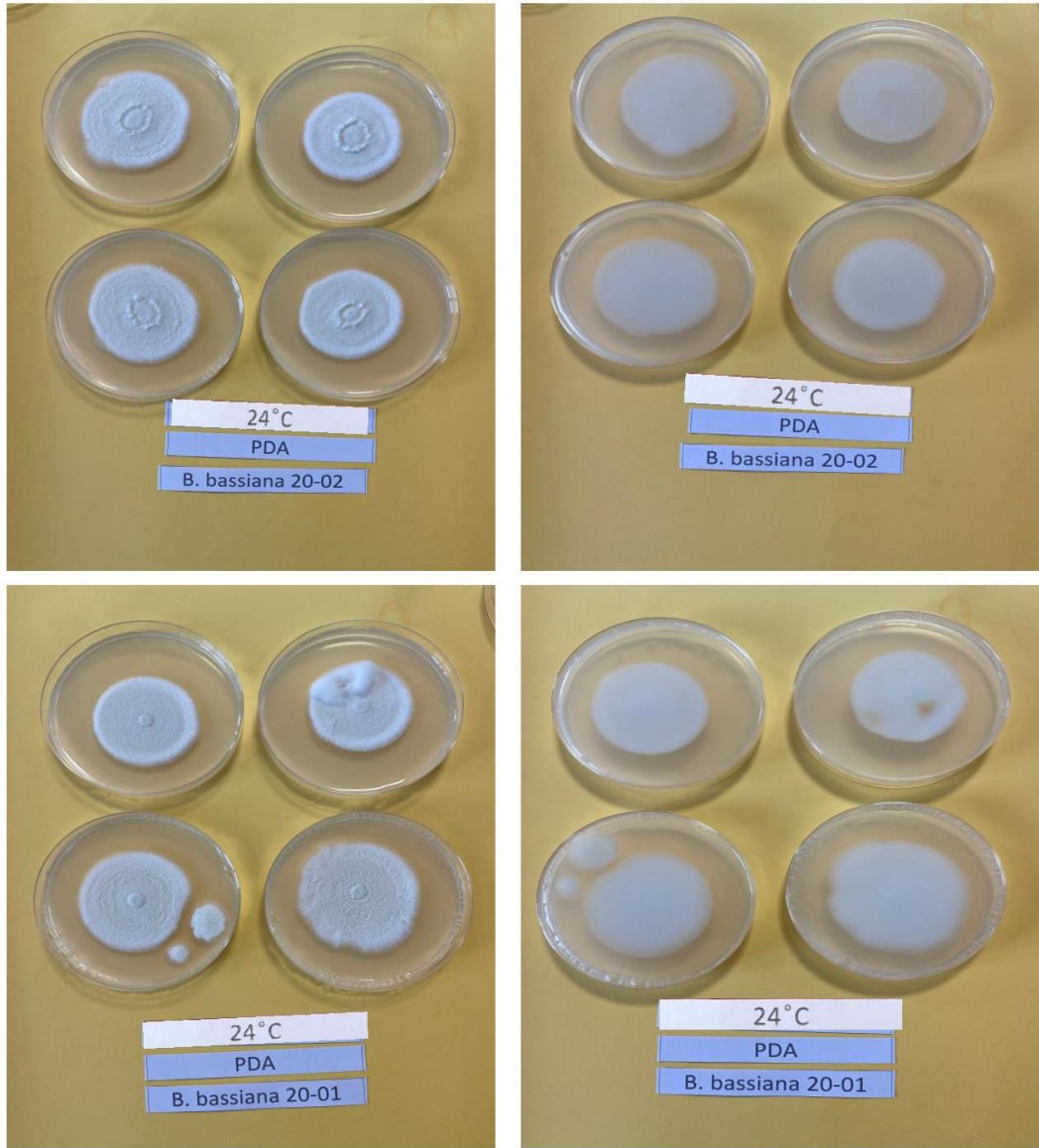
Şekil 4.7. Petri kaplarında -135°C’de *Beauveria bassiana* 20-01 izolatlarında makroskopik gözlemler



Şekil 4.8. Petri kaplarında -20°C’de *Beauveria bassiana* 20-02 izolatlarında makroskopik gözlemler

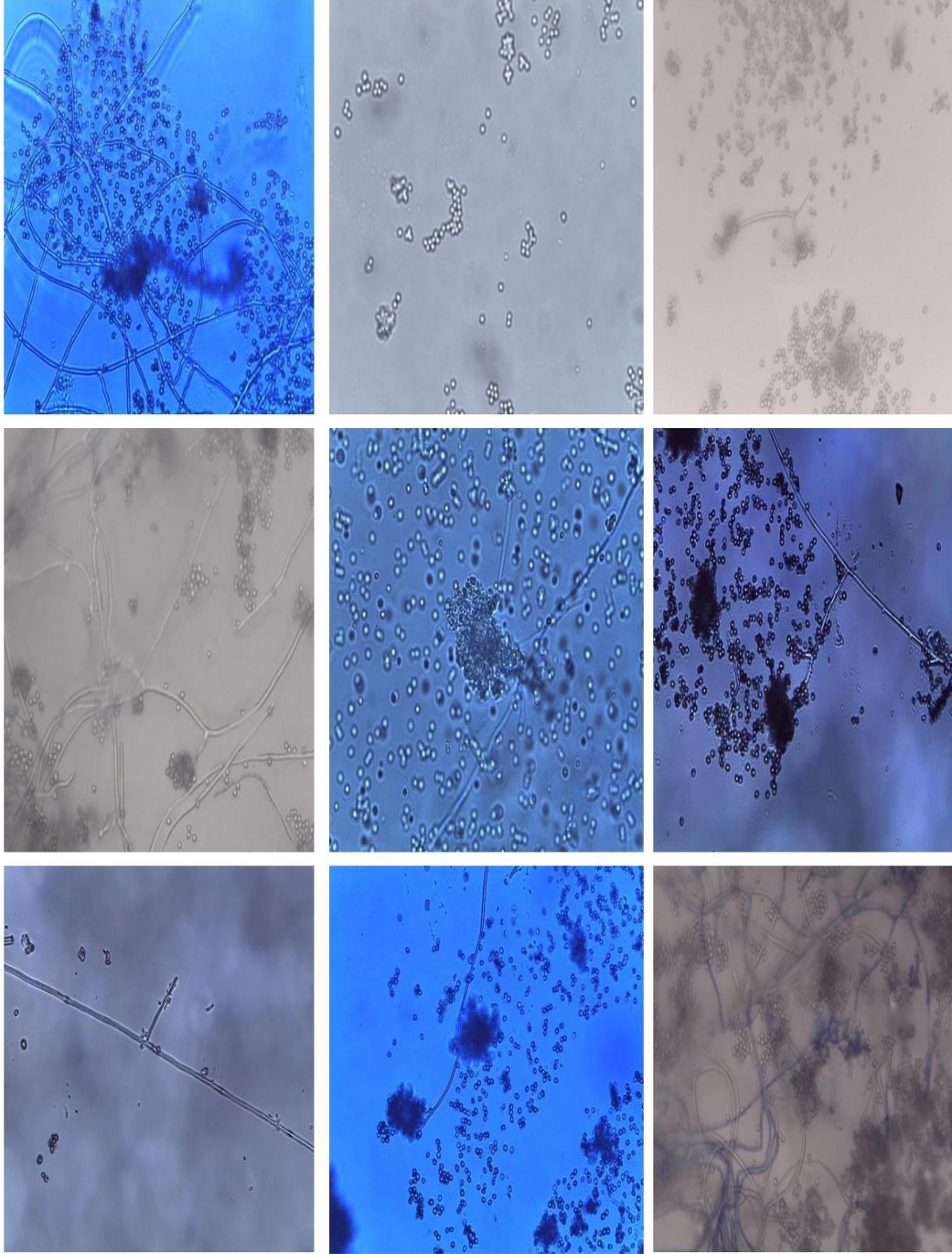


Şekil 4.9. Petri kaplarında -20°C’de *Beauveria bassiana* 20-01 izolatlarında makroskopik gözlemler



Şekil 4.10. Petri kaplarında 24°C’de *Beauveria bassiana* 20-01 ve 20-02 izolatlarında makroskopik gözlemler

Mikroskopik gözlem sonuçlarına bakıldığında ise, birbirine benzer sonuçlar verdiği ve normalden farklı bir görünüm sergilemediği tespit edilmiştir. Tüm besiyerlerine bakıldığında, hifler hiyalin görünümlü, ince duvarlı, bölmeli bir yapı görünmüştür.



Şekil 4.11. Petri kaplarında bulunan *Beauveria bassiana* izolatlarının mikroskopik görüntüsü

5. TARTIŞMA

Entomopatojen funguslar zararlı böceklerin kontrolünde uzun sürelerden beri kullanılmaktadır. *Beauveria bassiana* yaklaşık 170 yıl önce ilk kez tanımlanmış ve günümüze kadar da biyokontrol çalışmalarında en çok kullanılan entomopatojen olarak kayıtlara geçmiştir. Dünya çapında geniş yayılım alanı göstermesinden dolayı birçok araştırmacının araştırmasında sık sık yer bulmuştur.

Çalışmamızın sonuç değerlendirmesine bakıldığında Homolka vd., (2003) yapmış olduğu çalışmada rutin alt kültürleme çalışmasının çok sayıda fungus kültürünü saklamada pratik bir yöntem olmadığını, zaman alıcı ve kontaminasyon riskinin yüksek olduğunu, genetik ve fizyolojik değişikliklerin önlenemeyeceğini bildirmiştir. Çalışmasında ayrıca gliserol ve DMSO nun en başarılı kriyoprotektan olduğunu belirtmiştir. Gliserolün hemen hemen tüm izolatlar için en uygun kriyoprotektan olduğunu kanıtlamaktadır. Oliveira vd., (2011) gliserol ile -20°C'de derin dondurucuda yüksek spor verimleri ve %100'e varan canlılık elde edilmiştir. Yürütülen bu tez çalışmasında da Gliserol ve DMSO izolatların korunması bakımından kullanılmış ancak -20°C'de değil, -135 ve -80°C'de izolatların saklanması daha sağlıklı sonuçlar verdiği bulunmuştur.

Ayala-Zermeño vd., (2017) *Beauveria bassiana*' nında aralarında bulunduğu bir dizi fungusla yaptıkları çalışmada -70°C'de kültürlerin sağlıklı bir şekilde depolanabildiğini belirlemiştir. Bulunan sonuçlar çalışmamız ile genel olarak uyumludur, ancak daha düşük sıcaklıkların bu korumayı daha üstün kıldığı yürütülen bu tez çalışmasından sonucudur.

Kore'de Kim vd., (2019) *Beauveria bassiana*'nın uzun süreli koruma için en uygun şartları belirlemek için yaptığı çalışmada, 4 ile 30 °C'de saklanması konidi canlılığını ve virülensini koruduğu sonucuna varılmıştır. Yürütülen bu tez çalışmasında da 24°C'de alt kültürleme konidi üretimi ve spor canlılığı bakımından en yüksek değerleri vermiştir.

Sánchez-Peña vd., (1995) yapılan çalışmada, 2 farklı *Beauveria bassiana* izolatlarının sıvı nitrojen ve laboratuvar koşullarında saklamasının ardından, sıvı nitrojende (-196°C) saklama fungusun virülensini, 4-25°C'lik bir termal ortamda saklanan diğer fungusa kıyasla önemli ölçüde değişmediği gözlenmiştir. Bu

sonuçlara bakıldığında da -135°C de %35 gliserol ile saklama canlılık üretiminde en yüksek değerleri verirken, spor canlılığında kontrol grubundan sonra en iyi değerleri verdiği gözlenmiştir.

Beauveria bassiana'nın morfolojik özelliklerine bakıldığında Zimmerman, (2007) tanımladığı, fungusun üst yüzeyini beyaz daha sonra sarı kolonilerle karakterize etmektedir. Ters yüzeyi renksiz, sarımsı yada pembemsi bir renktedir. Bizim çalışmamızda yapmış olduğumuz makroskopik gözlem sonuçları ile uyum sağlamaktadır. Fernandes vd., (2006), Varela ve Morales, (1996) çalışmalarında koloni rengini beyaz ve sarı aralığında bulması ile de çalışmamızın sonuçları ile paralellik göstermiştir.

Beauveria bassiana'nın mikroskopik özellikleri, daha önce bu fungus için tanımlanmış olan hif veya konidia özelliklerine benzerdir. Hifler, hiyalin görünüşlü ve ince duvarlı bölmeli ve konidia, yine hiyalen görünüşlü ve yuvarlak veya oval bir şekil göstermiştir (Liu vd., 2003). Hifler hiyalindir, konidiler kar topları yada pamuk topları gibi kümeler halinde oluşturulmaktadır (Zimmerman, 2007).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yürütülen bu tez çalışmasında elde edilen veriler, *B. bassiana*'nın 20-01 ve 20-02 nolu izolatlarının PDA içeren bir besiyerinde sürekli alt kültürü yapılarak saklanabileceğini göstermiştir. Yüksek canlılık ölçümü, konidi üretimi ve spor canlılığı sağlanmıştır. Bu yöntemin iyi sonuçlar vermesine rağmen, laboratuvar koşullarında uzun süreler boyunca uygulanabilirliğinin az olması, uzun süreler iş gücü gerektirmesi, zaman alıcı olması, her an kontaminasyon oluşabilmesi gibi olumsuz özellikleri nedeniyle izolatların daha uzun süreler boyunca daha az iş gücü ve zaman kaybına neden olan ultra derin dondurucuda -135 veya -86°C'de sağlıklı bir şekilde saklanabileceği saptanmıştır.

Çalışmamızın sonucunda, ultra derin dondurucuda (-86, -135°C) gliserol ve DMSO ile depolama özellikle *Beauveria bassiana*'nın uzun dönemler saklanması durumunda çok pratiktir. Özellikle gliserol ile depolamada DMSO'a kıyasla daha iyi sonuçlar alınmıştır. -135°C'de %35 gliserol ile saklama çalışmamızda en iyi canlılık ölçümü ve spor canlılığı değerlerini vererek, *Beauveria bassiana*'nın her iki izolatının uzun süreler saklanmasında en uygun yöntem olarak belirlenmiştir. Bu yöntem en yüksek canlılık ölçümü ve spor canlılığı değerlerini vermiştir. Alt kültürlemeye kıyasla farklı sonuçlar vermesine rağmen, kültürleri uzun süre saklamak için hızlı ve kolay bir yöntemdir, pahalı laboratuvar ekipmanı gerektirse de çalışma konforu, iş verimliliği ve ihtiyaç duyulan kültür stoklarına hızlı erişim açısından kolaylıklar sunmaktadır.

Bu çalışmanın sonucu olarak, farklı saklama yöntemlerinin *Beauveria bassiana* izolatlarında herhangi bir makroskopik veya mikroskopik morfolojik farklılaşmalara neden olmadığını göstermiştir.

7. KAYNAKLAR

(Bu tez çalışmasında APA atıf sistemi kullanılmıştır.)

- Alves, S. B., Pereira, R. M., Stimac, J. L., & Vieira, S. A. (1996). Delayed germination of *Beauveria bassiana* conidia after prolonged storage at low, above-freezing temperatures. *Biocontrol Science and Technology*, 6(4), 575-582.
- Aroiee, H., Mosapoor, S., & Karimzadeh, H. (2005). Control of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) by thyme and peppermint. *CURRENT APPLIED SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 5(2), 511-514.
- Ayala-Zermeño, M. A., Gallou, A., Berlanga-Padilla, A. M., Andrade-Michel, G. Y., Rodríguez-Rodríguez, J. C., Arredondo-Bernal, H. C., & Montesinos-Matías, R. (2017). Viability, purity, and genetic stability of entomopathogenic fungi species using different preservation methods. *Fungal biology*, 121(11), 920-928.
- Borman, A. M., Szekely, A., Campbell, C. K., & Johnson, E. M. (2006). Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia*, 161(6), 361-368.
- Burdsall Jr, H. H., & Dorworth, E. B. (1994). Preserving cultures of wood-decaying Basidiomycotina using sterile distilled water in cryovials. *Mycologia*, 86(2), 275-280.
- C. Alexopoulos, C. Mims, M. Blackwell, Introductory Mycology (Wiley & Sons, New York: 1996)
- DANNON, H. F., DANNON, A. E., DOURO-KPINDOU, O. K., ZINSOU, A. V., HOUNDETE, A. T., TOFFA-MEHINTO, J., ... & TAMÔ, M. (2020). Toward the efficient use of *Beauveria bassiana* in integrated cotton insect pest management. *Journal of Cotton Research*, 3(1), 1-21.
- Deacon, J. W. (1983). Microbial control of plant pests and diseases Van Nostrand Reinhold (VK) Co.
- Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C., & Burçak, A. (2005). Türkiye’de Pestisit Kullanımı, Kalinti ve Organizmalarda Duyarlilik Azalışı Sorunlari. *Türkiye Ziraat Mühendisliği*, 6, 629-648.
- Dembilio, Ó., Quesada-Moraga, E., Santiago-Álvarez, C., & Jacas, J. A. (2010). Potential of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as a biological control agent against the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. *Journal of invertebrate pathology*, 104(3), 214-221.
- Demirci, F., Muştı, M., Bora Kaydan, M., & Ülgentürk, S. (2011). Laboratory evaluation of the effectiveness of the entomopathogen; *Isaria farinosa*, on citrus mealybug, *Planococcus citri*. *Journal of Pest Science*, 84, 337-342.
- Derya, B. A. K. İ., KIRIŞIK, M., & ERLER, F. (2020). Antalya İli topraklarından *Galleria mellonella* kullanılarak izole edilen potansiyel entomopatojen fungus izolatlarının *Myzus persicae*’e etkilerinin belirlenmesi. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 11(1), 43-54.
- F. J. Sáenz-de-Cabezón Irigaray, V. Marco-Mancebón, I. Pérez-Moreno.(2003) ‘The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and compatibility with triflumeron: effects on the twospotted spider mite *Tetranychus urticae*’, *Biological Control*, 26, pp. 168–173

- Fargues, J., Goettel, M. S., Smits, N., Ouedraogo, A., & Rougier, M. (1997). Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia*, 89(3), 383-392.
- Faria, M. R. D., Martins, I., Mello, R., & Tigano, M. S. (1999). Entomopathogenic fungal (Hyphomycetes) collection: assessment of conidial viability. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34, 1497-1503.
- Fernandes, E. K. K., Costa, G. L., Moraes, Á. M. L., Zahner, V., & Pinheiro Bittencourt, V. R. E. (2006). Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from Boophilus microplus tick. *Parasitology Research*, 98, 324-332.
- Friuli, M., Nitti, P., Aneke, C. I., Demitri, C., Cafarchia, C., & Otranto, D. (2021). Freeze-drying of *Beauveria bassiana* suspended in Hydroxyethyl cellulose based hydrogel as possible method for storage: Evaluation of survival, growth and stability of conidial concentration before and after processing. *Results in Engineering*, 12, 100283.
- Gallo, M. B., Guimarães, D. O., Momesso, L. D. S., & Pupo, M. T. (2008). Natural products from endophytic fungi. *Microbial biotechnology*, 4, 139-147.
- Hawksworth, D. L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological research*, 95(6), 641-655.
- Hawksworth, D. L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological research*, 95(6), 641-655.
- Homolka, L., Lisá, L., & Nerud, F. (2003). Viability of basidiomycete strains after cryopreservation: comparison of two different freezing protocols. *Folia microbiologica*, 48, 219-226.
- Homolka, L., Lisá, L., Kubátová, A., Váňová, M., Janderová, B., & Nerud, F. (2007). Cryopreservation of filamentous micromycetes and yeasts using perlite. *Folia Microbiologica*, 52(2), 153.
- Humber, R. A. (2012). Preservation of entomopathogenic fungal cultures. *Manual of techniques in invertebrate pathology*, 2, 317-328.
- Hwang, S. W. (1966). Long-term preservation of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration. *Applied microbiology*, 14(5), 784-788.
- Hwang, S. W., Kwolek, W. F., & Haynes, W. C. (1976). Investigation of ultralow temperature for fungal cultures III. Viability and growth rate of mycelial cultures following cryogenic storage. *Mycologia*, 68(2), 377-387.
- Jaronski, S. T. (2007). Soil ecology of the entomopathogenic ascomycetes: a critical examination of what we (think) we know. *Use of entomopathogenic fungi in biological pest management*, 91-144.
- KILIÇ, E., & YILDIRIM, E. (2008). Beyazsineklerin (Homoptera: Aleyrodidae) mücadelesinde entomopatojen fungusların kullanım imkânları. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 39(2), 249-254.
- KILINÇER, N., YİĞİT, A., KAZAK, C., ER, M. K., KURTULUŞ, A., & UYGUN, N. (2010). Teoriden pratiğe zararlılarla biyolojik mücadele. *Türkiye biyolojik mücadele dergisi*, 1(1), 15-60.
- Kim, J. C., Lee, M. R., Kim, S., Lee, S. J., Park, S. E., Baek, S., ... & Kim, J. S. (2019). Long-term storage stability of *Beauveria bassiana* ERL836 granules as fungal biopesticide. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 22(2), 537-542.
- Kırıışık, M. (2021). Batı çiçek tripsi *Frankliniella occidentalis* (Pergande)(Thysanoptera: Thripidae)'den entomopatojen fungus izolasyonu, tanılanması ve zararlıya karşı etkinliklerinin test edilmesi.

- Kitamoto, Y., Suzuki, A., Shimada, S., & Yamanaka, K. (2002). A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. *Mycoscience*, 43, 0143-0149.
- Lakshmana, D.K., Singh, V., and Camacho, M.E., 2018. Long-term cryopreservation of non-spore-forming fungi in Microbank™ beads for plant pathological investigations. *Journal of Microbiological Methods*, 148: 120–126.
- Liu, H., Skinner, M., Brownbridge, M., & Parker, B. L. (2003). Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 82(3), 139-147.
- Marques, E. J., Alves, S. B., & Marques, I. M. (2000). Virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. a *Diatraea saccharalis* (F.)(Lepidoptera: Crambidae) após armazenamento de conídios em baixa temperatura. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 29, 303-307.
- Mascarin, G. M., & Jaronski, S. T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 1-26.
- Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., & Vesey, G. (2006). Preservation of micro-organisms by drying; a review. *Journal of microbiological methods*, 66(2), 183-193.
- Nakasone, K. K., Peterson, S. W., & Jong, S. C. (2004). Preservation and distribution of fungal cultures. *Biodiversity of fungi*, 37-47.
- Ocak, İ., Doğan, S., HASENEKOĞLU, N. A., İjlal, O. C. A. K., DOĞAN, S., AYYILDIZ, N., & HASENEKOĞLU, İ. (2007). Akarlardan izole edilmiş entomopatogen bir fungus türü: *Beauveria bassiana* (Balsamo). *Cankaya University Journal of Arts and Sciences*, 1(7), 125-132.
- Oliveira, I., Pereira, J. A., Bento, A., & Baptista, P. (2011). Viability of *Beauveria bassiana* isolates after storage under several preservation methods. *Annals of Microbiology*, 61(2), 339-344.
- Pasarell, L. E. S. T. E. R., & McGINNIS, M. R. (1992). Viability of fungal cultures maintained at -70 degrees C. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(4), 1000-1004.
- Roy, H. E., Steinkraus, D. C., Eilenberg, J., Hajek, A. E., & Pell, J. K. (2006). Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annu. Rev. Entomol.*, 51, 331-357.
- Ryan, M. J., & Day, J. G. (2001). *The UK National Culture Collection (UKNCC) biological resource: properties, maintenance and management*. D. Smith (Ed.). United Kingdom national culture collection.
- Ryan, M. J., Smith, D., & Jeffries, P. (2000). A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 183-186.
- Sánchez-Peña, S. R., & Thorvilson, H. G. (1995). Effect of long-term cryogenic storage and conidial suspending agents on the virulence of *Beauveria bassiana* toward *Solenopsis invicta*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 65(3), 248-252.
- Sandhu, S. S., Rajak, R. C., & Agarwal, G. P. (1993). Studies on prolonged storage of *Beauveria bassiana* conidia: effects of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against chickpea borer, *Helicoverpa armigera*. *Biocontrol Science and Technology*, 3(1), 47-53.
- Sandhu, S. S., Sharma, A. K., Beniwal, V., Goel, G., Batra, P., Kumar, A., ... & Malhotra, S. (2012). Myco-biocontrol of insect pests: factors involved, mechanism, and regulation. *Journal of pathogens*, 2012.
- Šimková, J. (2009). Influence of different storage conditions on vitality and virulence of *Beauveria bassiana* spores. *Journal of Agrobiology*, 26(2), 75-81.

- Smith, D., & Onions, A. H. (1994). *The preservation and maintenance of living fungi* (No. Ed. 2). CAB international.
- Smith, D., & Ryan, M. J. (2004). Current status of fungal collections and their role in biotechnology. *Handbook of Fungal Biotechnology*. Marcel Dekker Published, 271.
- Toegel, S., Salar-Behzadi, S., Horaczek-Clausen, A., & Viernstein, H. (2010). Preservation of aerial conidia and biomasses from entomopathogenic fungi *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae* during lyophilization. *Journal of invertebrate pathology*, 105(1), 16-23.
- Varela, A., & Morales, E. (1996). Characterization of Some *Beauveria bassiana* Isolates and Their Virulence toward the Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67(2), 147-152.
- Webb, K. M., Holman, G., Duke, S., Greene, S., & McCluskey, K. (2018). Frozen fungi: cryogenic storage is an effective method to store *Fusarium* cultures for the long-term. *Annals of Applied Biology*, 173(2), 133-140.
- Ying, S. H., & Feng, M. G. (2004). Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* as fungal biocontrol agents. *Journal of Applied Microbiology*, 97(2), 323-331.
- YÜKSEL, E., AÇIKGÖZ, Ç., DEMİRCİ, F., & MUŞTU, M. (2017). Entomopatojen funguslar *Beauveria bassiana*, *Isaria farinosa* ve *Purpureocillium lilacinum*'un Domates Yaprak galeri Güvesi *Tuta absoluta*'nın yumurta dönemine etkileri. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 8(1), 39-48.
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(6), 553-596.