

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2014-YL-036

***POLYPHYLLA FULLO* (COLEOPTERA:
SCARABAEİDAE) VE *CURCULİO ELEPHAS*
(COLEOPTERA: CURCULİONİDAE) LARVALARI İLE
MÜCADELEDE ENTOMOPATOJEN NEMATOD VE
FUNGUSLARIN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Cem ASAN

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Selçuk HAZIR

AYDIN

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

25/07/2014

Cem ASAN

ÖZET

***POLYPHYLLA FULLO* (COLEOPTERA: SCARABAEİDAE) VE *CURCULİO ELEPHAS* (COLEOPTERA: CURCULİONİDAE) LARVALARI İLE MÜCADELEDE ENTOMOPATOJEN NEMATOD VE FUNGUSLARIN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Cem ASAN

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Selçuk HAZIR

2014, 53 sayfa

Yapılan bu çalışma kapsamında daha önce Entomopatojen nematod denemelerinde dirençli olduğu tespit edilen kestane meyve iç kurdu, *Curculio elephas* ve Haziran böceği, *Polyphylla fullo* larvalarına karşı Entomopatojen nematod, entomopatojen fungus ve bunların kombinasyonlarının etkinliği test edilmiştir. *Curculio elephas* larvaları ile yapılan çalışmalar kavanoz ve saksı denemeleri şeklinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada entomopatojen nematod *Heterorhabditis bacteriophora*, entomopatojen fungus olarakta *Metarhizium anisoplia* 4556 ve V275 suşları kullanılmıştır. Hem kavanoz hem de saksı denemeleri sonucunda *M. anisoplia* suşlarının *C. elephas* larvalarına karşı oldukça patojen oldukları belirlenmiştir. Her iki izolat da tek başına kullanıldığında %90'ın üzerinde larval ölüm meydana getirmiştir. Nematod-fungus kombinasyon uygulamalarıyla oluşan etkileşim ise aditif olarak belirlenmiştir. *Polyphylla fullo* larvarı ile yapılan çalışma sonucunda ise *Beauveria brogniartii* türüne ait entomopatojen fungusların özellikle 1.dönem larvalara karşı son derece etkili olduğu, tek başlarına kullanıldıklarında %90, nematodlarla kombine edildiklerinde ise %100 ölüm meydana getirdikleri tespit edilmiştir. *Polyphylla fullo* larvalarına karşı kombinasyon uygulamalarında görülen bu etkileşimin aditif olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak gelecekte yapılacak biyolojik mücadele uygulamalarında *C. elephas* larvalarına karşı kestanelilerdeki gömü yerinde entomopatojen fungus *M. anisoplia* 4556 veya V275 suşlarının, *P. fullo* larvalarına karşı ise özellikle

1.dönem larvaların hedef alınarak entomopatojen fungus *B. brogniartii*'nin kullanılmasının doğru olacağını belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Entomopatojen fungus, entomopatojen nematod, *Curculio elephas*, *Polyphylla fullo*, Biyolojik mücadele

ABSTRACT

THE EFFICACY OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE AND FUNGI IN CONTROLLING OF *POLYPHYLLA FULLO* (COLEOPTERA: SCARABAEIDAE) AND *CURCULIO ELEPHAS* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) LARVAE

Cem ASAN

M.S. Thesis, Biology Department

Advisor: Prof. Dr. Selçuk HAZIR

2014, 53 pp.

The efficacy of entomopathogenic nematodes and entomopathogenic fungi alone and their combinations were evaluated against chestnut fruit pest *Curculio elephas* and white grub *Polyphylla fullo* larvae which are known to be resistant to nematode infection. Experiments were conducted in two different experimental arenas, plastic containers and flower pots for *C. elephas*. Entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* and two isolates of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisoplia* (4556 and V275) were used. The results showed that the both isolates of *M. anisoplia* were highly virulent against *C. elephas* larvae at plastic container and pot experiments with more than 90% mortality. There was an additive interaction at fungi and nematode combine application. Entomopathogenic fungus *Beauveria brogniartii* showed a very high pathogenicity against 1. instar *P. fullo* larvae with 90% mortality. The combine application of *B. brogniartii* and *H. bacteriophora* presented 100% mortality against first stage of *P. fullo* and the interaction between nematode and fungi was additive. As conclusion, *M. anisoplia* isolates 4556 or V275 for *C. elephas* in gomu places in chestnut field and *B. brogniartii* against first instar *P. fullo* larvae are recommended to use in biological control studies.

Key words: Entomopathogenic fungi, entomopathogenic nematodes, *Curculio elephas*, *Polyphylla fullo*, biological control

ÖNSÖZ

Lisans döneminden bu yana insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli danışman hocam Prof. Dr. Selçuk HAZIR'a,

Tüm destek ve tecrübelerini benimle paylaşan Doç. Dr. Mehmet Karagöz ve Prof. Dr. İbrahim Çakmak hocalarıma,

Gerek lisans, gerek yüksek lisansımda benden yardım ve tecrübelerini esirgemeyen manevi abim Yrd. Doç. Dr. Barış Gülcü'ye,

Çalışmalarda kullanılan fungusları temin eden, yardım ve tecrübelerini esirgemeyen Prof. Dr. Tariq Butt'a,

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen, birlikte çalışmaktan zevk aldığım dostlarım Dr. Karthik RAJA, Arş. Gör. Derya ULUĞ, Dok. Öğr. Harun ÇİMEN'e,

Tez çalışmamı FEF-14012 no'lu proje ile destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimine,

Bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, haklarını ödeyemeyeceğim sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Cem ASAN

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1.GİRİŞ	1
1.1. Biyolojik Mücadele Nedir.....	1
1.2. Entomopatojen Nematodlar ve Funguslar.....	2
1.2.1. Nematodlar	2
1.3. Entomopatojen Funguslar	4
1.4. Entomopatojen Nematodları ve Fungusları Etkileyen Biyotik ve Abiyotik Faktörler.....	8
1.4.1. Biyotik Faktörler	8
1.4.2. Abiyotik Faktörler	9
1.5. Polyphylla fullo (Coleoptera: Scarabaeidae)’ nun Hayat Döngüsü	12
1.6. Curculio elephas (Coleoptera: Curculionidae)’ın Hayat Döngüsü.....	13
2. KAYNAK ÖZETLERİ	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1. Deneylerde Kullanılan Organizmalar.....	17
3.1.1. Galleria mellonella (Lepidoptera: Pyralidae).....	17
3.1.2. Curculio elephas (Coleoptera: Curculionidae).....	17
3.1.3. Polyphylla fullo (Coleoptera: Scarabaeidae).....	17
3.1.4. Entomopatojen Nematod Kültürleri	18

3.1.5. Entomopatojen Funguslar	18
3.2. Entomopatojen fungus ve nematodların etkinlik denemeleri.....	19
3.2.1. Curculio elephas İle Yapılan Denemeler	19
3.2.1.1. Kavanoz Denemeleri	19
3.2.1.2. Saksı Denemeleri (Kestane Gömü Yeri Similasyonu).....	22
3.2.2. Polyphylla fullo Larva İle Yapılan Denemeler	24
3.2.2.1. İnfektivite Testi	24
3.2.2.2. Saksı Denemeleri	26
3.2.2.3. Birinci Evre Polyphylla fullo Larvalarıyla Yapılan İnfektivite Denemeleri	28
3.3. İstatistik Analizler	29
4. BULGULAR	31
4.1. Curculio elephas İle Yapılan Denemeler	31
4.1.1. Kavanoz Denemeleri	31
4.1.2. Saksı Denemeleri (Kestane Gömü Yeri Similasyonu)	32
4.2. Polyphylla fullo Larva İle Yapılan Denemeler	36
4.2.1. İnfektivite Testi	36
4.2.2. Saksı Denemeleri	36
4.2.3. Birinci Evre Polyphylla fullo Larvalarıyla Yapılan İnfektivite Denemeleri.....	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	39
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	53

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
cm ²	Santimetre kare
dk	Dakika
EPF	Entomopatojenik Fungus
EPN	Entomopatojenik Nematod
Gr	Gram
IJ	İnfektif juvenil
l	Litre
Kg	Kilo Gram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MÖ	Milattan Önce
PDA	Potato Dextrose Agar
pH	Power of Hydrogen
sn	Saniye
UV	Ultraviolet
vd.	ve diğerleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Entomopatojen Nematodların Genel Hayat Döngüsü.....	4
Şekil 1.2. Entomopatojen Fungusların Genel Sistematiği.....	6
Şekil 1.3. Entomopatojen Fungusların Enfeksiyon.....	7
Şekil 3.1. Thoma Lamında Fungus Sporu Sayımı.	20
Şekil 3.2. <i>Curculio elephas</i> 'ın Kavanoz Denemelerinin Kuruluşu	21
Şekil 3.3. <i>Curculio elephas</i> Saksı.	23
Şekil 3.4. Deney Düzeneklerinin Şematik Gösterimi.	24
Şekil 3.5. <i>Polyphylla fullo</i> Larvalarına Entomopatojen Fungus Sporlarının Enjekte Edilmesi	26
Şekil 3.6. <i>Polyphylla fullo</i> Saksı Denemesi	28
Şekil 4.1. Kavanoz Denemeleri Sonucunda <i>Curculio elephas</i> Larvalarında Görülen Ölüm Oranları	32
Şekil 4.2. Tabaka Şeklinde Toprak Yüzeyine Fungus Uygulamasının Ardından Laboratuvar Ortamında Tutulan Saksılardaki <i>Curculio elephas</i> Larva Ölüm Oranları	33
Şekil 4.3. Tabaka Şeklinde Toprak Yüzeyine Fungus Uygulamasının Ardından Dış Ortamda Tutulan Saksılardaki <i>Curculio elephas</i> Larva Ölüm Oranları ...	34
Şekil 4.4. Toprak İçerisine Karıştırarak Uygulamasının Ardından Laboratuvar Ortamında Tutulan Saksılardaki <i>Curculio elephas</i> Larva Ölüm Oranları ..	35
Şekil 4.5. Toprak İçerisine Karıştırarak Uygulamasının Ardından Dış Ortamda Tutulan Saksılardaki <i>Curculio elephas</i> Larva Ölüm Oranları	35
Şekil 4.6. Saksı Denemeleri Sonucunda Elde Edilen <i>Polyphylla fullo</i> Larva Ölüm Oranları	37

Şekil 4.7. Birinci Evre <i>Polyphylla fullo</i> Larvalarına Karşı <i>Beauveria brogniartii</i> , <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> Ve Bunların Kombinasyonlarının Denenmesi	38
--	----

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. <i>Curculio elephas</i> İle Yapılan Kavanoz Denemelerinde Test Edilen Deney Grupları	21
Çizelge 3.2. <i>Polyphylla fullo</i> İle Yapılan Kavanoz Denemelerinde Test Edilen Deney Grupları	29

1.GİRİŞ

1.1. Biyolojik Mücadele Nedir?

Dünyada tarım zararlılarına karşı yapılan kimyasal mücadelenin doğal yaşama yaptığı olumsuz etkiler bilimsel çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Kimyasal bileşiklerin hem çevre ve insan sağlığına verdiği zarar hem de zararlıların bunlara karşı zamanla direnç kazanmasının anlaşılması sonucu, araştırmacılar çevre ve insan sağlığını tehdit etmeyen, ayrıca ekolojik dengeyi bozmayan bir yöntem olan biyolojik mücadeleye yönelmişlerdir (Floate vd., 2002).

Biyolojik mücadele için bugüne kadar birçok farklı tanım yapılmıştır. Eilenberg vd. (2001) yaptığı tanıma göre biyolojik mücadele; “Canlı organizmalar kullanılarak zararlı türlerin sayılarının kontrol altında tutulması ve verdikleri zararın azaltılması” olarak ifade edilmiştir.

M.Ö. 324’ te Çin’ de insanlar *Oecophylla smaragdina* adlı karınca türünü turunçgil ağaçlarına bırakarak ağaçları böcek larvalarından korumuşlardır. Bu yöntem çağlar boyunca kullanılmış, hatta modern zamanda bile turunçgil yetiştiricileri bu yöntemi kullanmaya devam etmiştir (Van Den Bosch, 1973; Hajek, 2004).

Tanımdan da anlaşılacağı gibi biyolojik mücadelede canlı organizmalar kullanılmaktadır (Eilenberg, 2006). Bu canlılar predatörler, parazitoidler ve patojenler olmak üzere 3 kategoriye ayrılır. Predatörler genelde konukçularından daha büyüktürler ve avlarını doğrudan yiyerek beslenirler. Patojenler ise genelde konukçularından daha küçüktürler ve onları enfekte ederek öldürürler. Parazitoid dediğimiz canlı grubunda ise yumurtalar konukçu olarak seçilen bir başka canlının vücudunun üzerine ya da içerisine bırakılır. Yumurtadan çıkan larvalar bulunduğu konukçu dokuları üzerinden beslenerek gelişir, bu esnada da konukçuyu öldürürler (Van Den Bosch vd., 1973).

Biyolojik mücadelede kullanılan parazitoit ve patojenler kategorisinde bulunan canlı grupları;

1- Viruslar, 2- Bakteriler, 3- Funguslar, 4- Nematodlar ve 5- Protozoalar'dır (Koppenhöfer, 2007).

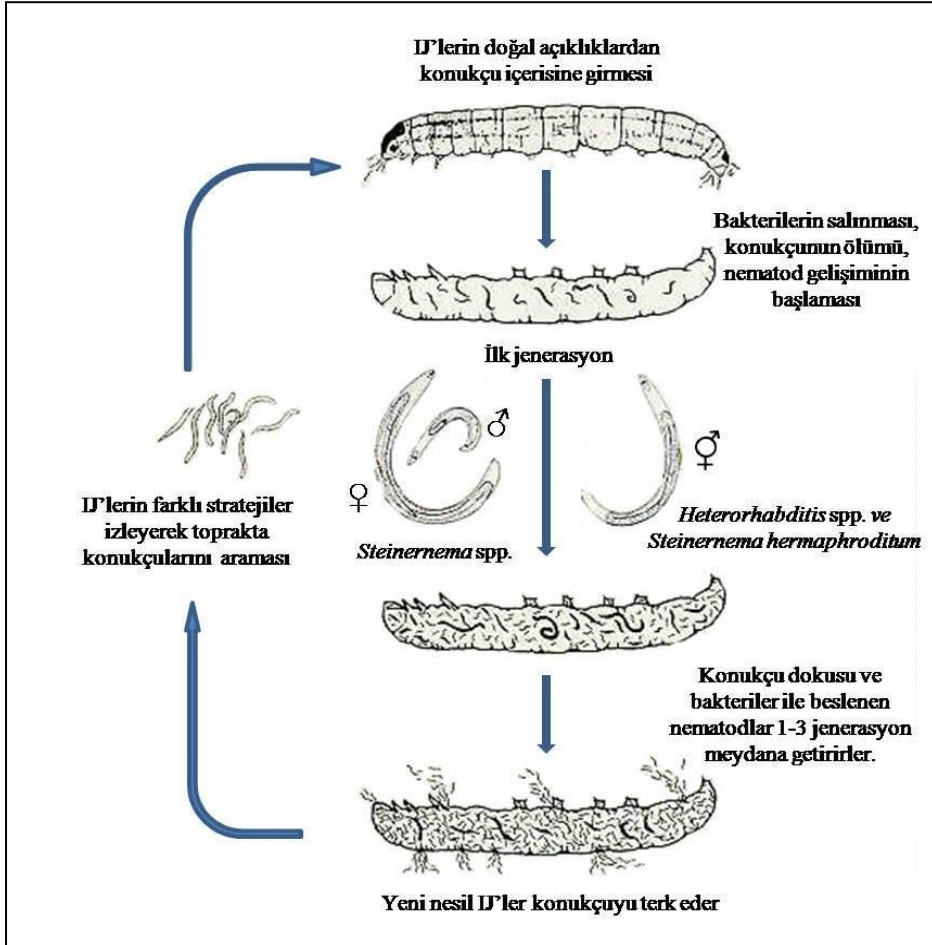
1.2. Entomopatojen Nematodlar ve Funguslar

1.2.1. Nematodlar

Pek çok nematod türü böceklerle foreziden, parazitizm ve patojeniteye kadar değişen farklı ilişkiler içerisindedir (Koppenhöfer, 2007). Yapılan çalışmalarda şimdiye kadar böcekler ve diğer omurgasızlarla parazitik ilişki içerisinde olduğu tespit edilen 30 nematod familyası tanımlanmıştır (Stock ve Hunt, 2005). Bunlar içerisinde böcekler ile biyolojik mücadelede kullanılabilecek 7 familya: Mermithidae ve Tetradenematidae (Ordo: Stichosomida); Allantonematidae, Phaenopsitylenchidae ve Sphaerulariidae (Ordo: Tylenchida); Heterorhabditidae ve Steinernematidae (Ordo: Rhabditida)'dır (Koppenhöfer, 2007). Bununla beraber Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarına ait türler kitlesel üretime uygun olup, günümüzde bu nematodların ticari ürün olarak satışı yapılmaktadır. Bu nematodlara “böcek patojeni”, “böcek paraziti” veya “entomopatojen nematodlar ” (EPN) ya da “ faydalı nematodlar” gibi farklı isimler verilmiştir (Crow, 2002).

Her iki nematod familyasında enfektif form üçüncü juvenil evredir. Bu evreye infektif juvenil (IJ) evre de denir. Yalnızca toprakta bulunan IJ evre nematodlar böceğin doğal açıklıklarından (ağız, anüs ve spirakıl) ya da bazı durumlarda doğrudan kutikulayı delerek vücut içerisine girmektedir. Böceğin hemosolüne ulaşan IJ'ler taşıdıkları mutualistik bakterileri ortama bırakırlar. Bakterilerin nematod vücudunda taşıdıkları bölgeler nematod cinsleri arasında farklılık göstermektedir. *Heterorhabditis* cinsi nematodlarla mutualistik ilişkili *Photorhabdus* bakterileri bağırsağın özellikle ilk 1/3'lük kısmında yoğun olarak taşınırken, *Steinernema* ile ilişkili *Xenorhabdus* bakterileri nematod bağırsağının ön kısmındaki özel bir kesede bulunmaktadır (Martens ve Goodrich-Blair, 2005). Konukçu böceklerin ölümü, mutualistik bakterilerin çoğalması ve bu esnada salgıladıkları hücre dışı enzimler ve toksinler ile oluşan septicemia'dan ve ayrıca nematodların neden olduğu toxemia'dan dolayı 48 saat içerisinde gerçekleşir (Duchaud vd., 2003; Kaya ve Gaugler, 1993). Parçalanan böcek dokusu ve burada

üreyen mutualistik bakterileri üzerinden beslenmeye başlayan IJ'ler kadavradaki besin bitene kadar hayat döngülerini devam ettirirler (Şekil 1.1). Böceğin içerisine girdikten sonra sırasıyla 4. juvenil evre, ergin erkek-dişi ya da hermafrodit bireyler, yumurta, 1. juvenil, 2. juvenil ve 3. juvenil (infektif juvenil) şeklinde devam eden bir hayat döngüsüne sahiptirler. Heterorhabditler ile Steinernematidlerin hayat döngüleri oldukça benzer olmasına karşın aralarındaki en önemli fark *Heterorhabditis* erginlerinin konukçu içerisindeki ilk jenerasyonda hermafrodit bireylerden oluşması, *Steinernema* erginlerinin ise bütün jenerasyonlarda ayrı eşeyli olmasıdır. Tek istisna, ilk jenerasyonda hermafrodit bireylere de rastlanmış olan *Steinernema hermaphroditum* türüdür (Stock vd., 2004). *Heterorhabditis* cinsinde birinci nesilden sonraki nesillerde hermafroditlerle birlikte ayrı eşeyli bireyler de görülmektedir (Kaya, 1990). Biten besinle beraber kadavrayı terk eden IJ'ler toprakta kendilerine yeni konukçular aramaya başlarlar (Hazır vd., 2003).



Şekil 1.1. Entomopatojen nematodların genel hayat döngüsü (Gülcü, 2010).

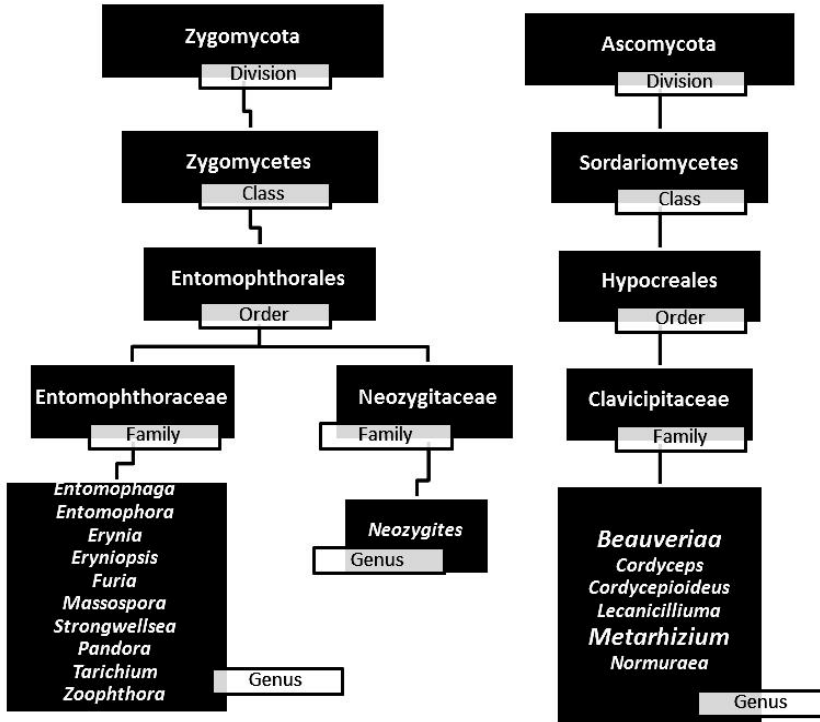
1.3. Entomopatojen Funguslar

Dünyada 1,5-5,1 milyon fungus türü bulunduğu tahmin edilmektedir (Hibbett vd., 2011). Şimdiye kadar bu türlerin 100,000 kadarı tanımlanmıştır ve bunların 750-1000 tanesinin entomopatojen fungus (EPF) olduğu tahmin edilmektedir. Günümüzde EPF türlerinin yaklaşık 100 kadarı tanımlanmıştır (St. Leger ve Wang, 2010). Pek çok EPF türü Ascomycota ve Zygomycota divisiolarında bulunmaktadır (Roy vd., 2006) (Şekil 1.2).

Entomopatojen funguslar ekonomik olarak önemli pek çok zararlı böceğin kontrolünde biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılan zorunlu böcek paraziti

organizmalardır. Bunlar hedef zararlıyı mekanik olarak etkiledikleri için önemlidirler. Böylelikle zararlı, daha önceden kimyasal veya mikrobiyal kaynaklı insektisitlere karşı geliştirmiş olduğu bağışıklık mekanizmalarıyla kendini koruyamaz (Charnley ve Collins, 2007).

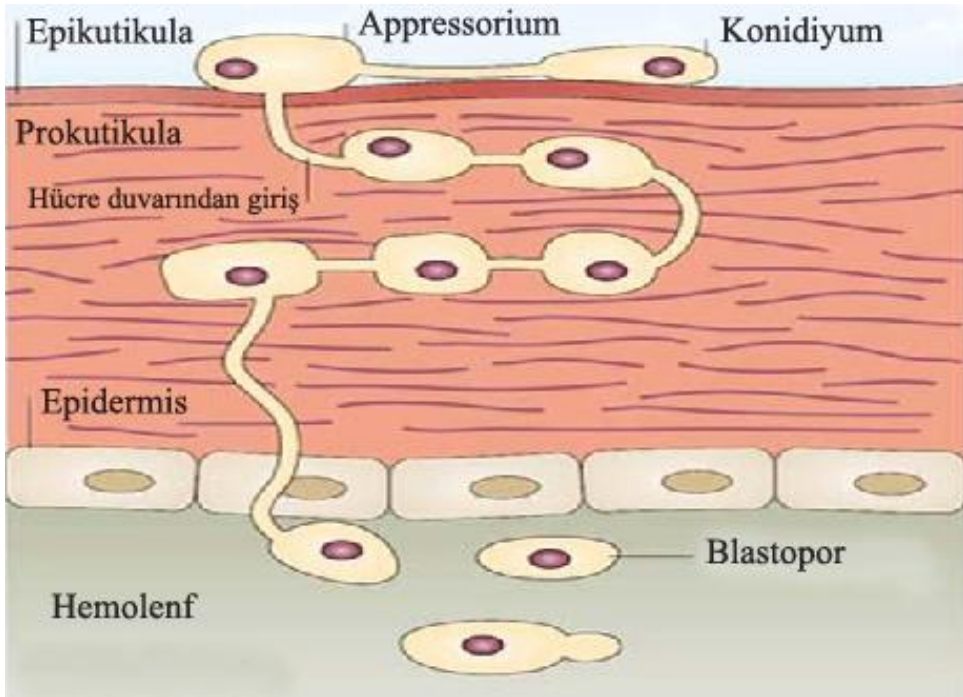
Funguslar, diğeri entomopatojen gruplardan böcek kütikulasından doğrudan giriş yapabilme yeteneği ile ayrılırlar. Besin yolu ile alınma zorunluluğunun olmayışı, böceğinin beslenmediği yumurta veya pupa gibi gelişim evrelerinin de enfekte edilebilmesini sağlar. Fungusların böcek üzerinde penetre olduğu yerler genelde lokal olarak yüksek nem bulunduran solunum boşlukları, segmentler arası boşluklar ve ağız parçaları gibi bölgelerdir (Charnley ve Collins, 2007).



Şekil 1.2. Entomopatojen fungusların genel sistematığı (Demir, 2008) (Bu şema entomopatojen fungusların tümünü içermemektedir).

Böcek üzerinde çimlenen spor, oluşturduğu hifler sayesinde kütikulayı ve epidermisi delip geçtikten sonra vücut boşluğunda çoğalır. Konukçu kütikulasına yapılan bu giriş, hem litik enzimlerle hem de apresorium oluşumu vasıtası ile mekanik olarak gerçekleşir (Leger vd., 1988; Charnley ve Leger, 1989). Böcekte meydana gelen fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler genellikle böceğin ölümü ile sonuçlanır. Fungus hifleri hayat döngüsünü tamamlamak için tekrar kavadradan dışarı doğru büyüme gösterir ve hifler hava ile karşılaştığında sporulasyona başlar (Inglis vd., 2001; Deacon, 2005) (Şekil 1.3).

Entomopatojen funguslar ile yapılan mücadele, kimyasal insektisidlere göre daha geç cevap verir. Zararlıya maruz kalmış tarımsal ürünlerin yüksek ekonomik değeri olduğunda bu istenmeyen bir durumdur. Bu nedenle fungal patojenlerin daha hızlı sonuç vermesi için EPF'leri öldürecek dozun altında kimyasal insektisidlerle karıştırılması (Irigaray vd., 2003) ya da diğer entomopatojen bir ajan ile birlikte kullanılması (Kryukov vd., 2009) gibi bazı stratejiler geliştirilmiştir.



Şekil 1.3. Entomopatojen fungusların enfeksiyon evreleri (Thomas ve Read, 2007).

1.4. Entomopatojen Nematodları ve Fungusları Etkileyen Biyotik ve Abiyotik Faktörler

1.4.1. Biyotik faktörler

Entomopatojen canlıların etkinlik derecesini etkileyen birçok biyolojik faktör bulunmaktadır. Bunlardan konukçu yoğunluğu, dağılımı, konukçunun sağlığı, yaşı, deri değiştirme dönemi ve konukçu davranışları sayılabilir (Van Driesche ve Bellows, 1996; Inglis vd., 2001; Klingen ve Haukeland, 2006). Konukçu yoğunluğunun fazla olması patojenin konukçusuyla karşılaşma şansını artırır. Konukçu organizmanın sağlık durumu biyolojik mücadele ajanının bulaşma oranını etkileyebilmektedir. Çünkü başka patojenler tarafından enfekte olmuş konukçular, kötü beslenme ve fiziksel zayıflık gibi durumundan dolayı diğer patojen saldırılarına karşı daha dirençsiz kalır. Bunun yanında böceğin yaşam evresi ve deri değiştirme dönemlerinde de hedef canlılar patojenlere karşı duyarlıdır. Örneğin yeni deri değiştirmiş böcekler derilerinin ince olması nedeniyle o dönemde fungal patojenlere karşı oldukça duyarlıdır (Van Driesche ve Bellows, 1996; Inglis vd., 2001; Klingen ve Haukeland, 2006).

Konukçu popülasyonu içerisinde ölüm oranını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bunlar bulaşıcılık, virulans, toksinlerin üretimi, patojenin yaşam döngüsü, patojen yoğunluğu, dağılımı ve kalıcılığıdır (Van Driesche ve Bellows, 1996; Inglis vd., 2001). Belirli bir patojen türünün genotipi o patojenin belirli bir konukçuya karşı bulaşıcılığını ve virulanslığını etkiler. Bulaşıcılık bir patojenin konukçuya giriş yeteneği, virulans ise patojen konukçusundayken hastalığa neden olma yeteneğidir. Funguslarda penetrasyon hifi bulaşıcılığını konukçuya göre değiştirerek üreteceği enzimlerin düzeyini değiştirebilir.

Entomopatojen nematodların etkinlik derecesi, nematod türü ya da izolatına, böcek türüne ve böcek türünün gelişim evresi gibi pek çok biyolojik faktöre bağlıdır (Eidt ve Thurston, 1995; Simoes ve Rosa, 1996). Nematodları etkileyen biyotik faktörler ise ortamdaki konukçu, doğal düşman veya bitki varlığıdır. Bunlar ortamın fiziksel koşullarını (toprağın nemi, sıcaklığı, gözenekliliği vb.) iyileştirerek nematodların hayatta kalmasına uygun bir çevre yaratmaktadırlar (Kaya, 2002).

Zararlıının kütikulası savunma sisteminde sadece ilk değil aynı zamanda en büyük bariyerdir (Pekrul ve Gula, 1979). Kütikulanın yapısal özellikleri ve yüzeyinde bulunan enzim inhibitörleri ve antimikrobiyal bileşikler, zayıf patojenlerin kolayca elimine edilmesini sağlar. Kandan kaynaklanan savunma sistemi ise fungal virülentlikte az bir etkiye sahiptir (Charnley ve Collins, 2007).

Biyotik faktörler ve etkileriyle ilgili detaylı pek çok araştırma yapılmıştır. Bazı durumlarda topraktaki bitki köklerinden salgılanan birtakım kimyasallar IJ'lerin konukçu aramasını olumsuz etkilemiştir. Bu durum antibiyozis olarak adlandırılmaktadır. Bazen ise enfekte konukçu içerisinde bulunan kimyasallar nematod enfeksiyonunu ve üremesini etkilemektedir. Bir konukçu içinde fazla sayıda IJ'nin bulunması durumunda tür içi rekabet oluşmakta ve ortamın uygunluğu nematodlar için azalabilmektedir. Türler arası rekabet olduğu durumlarda ise yerel türlerden birisinin ortadan kalkmasına sebebiyet verebilmektedir. Türler arası rekabet aynı bölgede bulunan diğer böcek patojenleri arasında da yaşanabilmektedir. Bu rekabetin sonucu, rekabetçilerin türüne (entomopatojen fungus, bakteri veya virüs), enfeksiyon zamanına veya sıcaklık ve nem gibi çevresel faktörlere bağlıdır (Koppenhöfer, 2007).

Üzerinde birçok araştırma yapılmış nematofag funguslar dışında nematodların diğer doğal düşmanları collembola, tardigrad, akar ve predatör nematodlar gibi omurgasız canlılardır. Laboratuvar ortamında yapılan toprak denemelerinde bu doğal düşmanların nematod populasyonlarında düşüşlere neden oldukları tespit edilmiştir. Fakat tarla şartlarında etkileri ile ilgili çok şey bilinmemektedir (Kaya, 2002, Karagöz vd., 2007).

1.4.2. Abiyotik faktörler

Entomopatojen nematod ve fungusların patojenitesini etkileyen abiyotik faktörler sıcaklık, nem, kuraklık, ışık, UV, pH ve toprak tipi sayılabilir (Inglis vd., 2001; Deacon, 2005; Klingen ve Haukeland, 2006; Zimmermann, 2007).

Pek çok nematod türü için optimum sıcaklık aralığı 5-15°C arasındadır. Daha yüksek sıcaklıklar metabolik aktiviteyi artırarak enerji rezervlerinin tükenmesine ve yaşam süresinin kısalmasına sebep olmaktadır (Georgis, 1990). Sıcaklık farkı hem patojen organizmayı hem de konukçuyu etkileyebilmektedir. Patojenite

oranına etki eden diğer faktörler (örneğin davranış, gelişim, hareket gibi) göz önüne alındığında sıcaklığın konukçu-patojen üzerindeki etkisi anlaşılabilir. Örneğin EPF'ler konukçularının içerisine kutikula yüzeyinden girmektedir. Ancak vücut içerisine giriş için uygun sıcaklıkta sporların çimlenmesi ve hif gelişiminin başlaması gerçekleşmektedir (Van Driesche ve Bellows, 1996; Griffin vd., 2005; Klingen ve Haukeland, 2006; Zimmermann, 2007). Birçok EPF türü, 15 ile 30°C arasındaki sıcaklıklarda büyüme göstermektedirler (Osborne vd., 1990).

Sıcaklığın nematodlar üzerine etkisi türden türe değişiklik gösterebilmektedir (Grewal vd., 1994). Genel olarak IJ'ler düşük sıcaklık derecelerinde (<10-15°C) durgunlaşmaktadır. Daha yüksek derecelerde ise (>30-40°C) inaktive olmaktadır. 0°C'nin altında ve 40°C üzerindeki sıcaklıklar nematodlar için genellikle öldürücüdür (Glazer, 2002).

Nem ve kuraklık patojenite açısından önemlidir. Yüksek nem hem fungus sporlarının çimlenmesini hem de enfekte olmuş kadavrada spor oluşumunu tetiklemektedir. Yaklaşık %92-93 bağıl nem fungus sporlarının çimlenmesi için alt sınır teşkil etmektedir (Hall ve Papierok, 1982). Nematod epizootiğinde toprağın nem oranı ve yüksek nem miktarı önemlidir (Zimmermann, 2007). Doğal ortamı toprak olan IJ'ler etkili biçimde ilerleyebilmek için bir su filmine ihtiyaç duymaktadırlar ve partiküller arasında bulunan su filmlerini kullanarak hareket etmektedirler. Partiküller arasındaki su filminin çok ince olduğu kurumuş topraklarda veya partiküller arasındaki boşlukların tamamen suyla dolu olduğu durumlarda nematodların hareketi kısıtlanabilmektedir (Kung vd., 1991; Brown ve Gaugler, 1997).

Toprak tipi nematodların hareketini, canlılığını ve infektivitesini etkileyen abiyotik bir faktördür (Kung vd., 1990). Kumlu ve kumlu-tınlı topraklar nematodların kolayca hareket etmelerine imkân verirken, küçük partiküllü topraklar hareket etmeyi zorlaştırır (Lewis, 2002).

UV ışınları nematodları inaktive eden ve dakikalar içerisinde ölmelerine neden olan önemli bir abiyotik faktördür (Gaugler ve Bousch, 1978).

Topraktaki pH değerleri IJ'ler için çok önemli bir faktör gibi gözükmesine de, pH=4 ile 8 arasındaki değerlerde IJ etkinliği değişiklik göstermemektedir. Ancak pH

10'da IJ'lerde canlılık oranı hızla düşmektedir (Kung vd., 1990). Bununla beraber ilave araştırmalara göre çeşitli toprak parametrelerinde farklı nematod türleri farklı şekilde etkilenmektedir (Koppenhöfer ve Fuzy, 2006).

Toprak ortamı böcek-nematod ve böcek-fungus interaksyonu için mükemmel bir imkan sağlar. Zararlı böceklerin %90'dan fazlası yaşam döngülerinin bir bölümünü toprakta geçirirler ve toprak EPN ve EPF'ler için doğal bir kaynaktır (Klein, 1990 ; Eilinberg vd., 2001).

Bazı EPN'ler ve EPF'ler polioksenik'tirler. Bu tür özelliğe sahip olan entomopatojen türleri farklı takımlardan pek çok böcek türünü enfekte edebilmektedir.

Ancak bazı entomopatojen nematod ve fungus türleri belirli grupta yer alan böcekleri enfekte edebilmektedirler. Örneğin *S. scapterisci* türüne ait nematodlar Orthoptera takımına özellikle de *Gryllotalpidae* üyelerine adapte olmuştur ve diğer böcek gruplarına karşı düşük patojenite gösterirler (Grewal vd., 1993; Parkman ve Smart, 1996). *Steinernema scarabei* türü ise *Scarabaeidae* larvalarına adapte olmuştur ve diğer böcekleri infekte edememektedir (Koppenhöfer ve Fuzi, 2003). *Beauveria brongniartii* türüne ait entomopatojen funguslar genellikle Scarabeid'lere adapte olmuştur ve diğer gruptaki böcekleri enfekte etmeleri oldukça zordur (Dolci vd. 2006; Townsend vd., 2010).

Bazı böcek grupları nematod ve fungus enfeksiyonlarına karşı oldukça hassastırlar (örneğin Lepidopter larvaları). Ancak bazı gruplarda yer alan böcek türleri hem mekanik hem de humoral ve hücrel savunma sistemleri sayesinde patojenlere karşı koyabilmektedir. Böyle durumlarda zararlıyla mücadele etmenin yollarından birisi farklı patojenleri (Shapiro vd. 2004; Ansari vd. 2008) veya bir patojenle bir kimyasalı (Sabah vd. 2009; Paula vd. 2011; Sabbour, 2011) bir arada kullanarak konukçunun savunma sistemini aşmaktır.

Yapılan bu tez çalışması kapsamında daha önce EPN denemelerinde dirençli olduğu tespit edilen kestane meyve iç kurdu, *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae) ve Haziran Böceği, *Polyphylla fullo* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvalarına karşı EPN, EPF ve bunların kombinasyonlarının etkinliği test edilmiştir.

1.5. *Polyphylla fullo* (Coleoptera: Scarabaeidae)' nun Hayat Döngüsü

Polyphylla fullo diğer adıyla Haziran Böceği çoğunlukla kumsal bölgelerde, ince kumlu ve alüvyal topraklarda yetiştirilen çeşitli kültür bitkilerinin köklerinde ekonomik düzeyde zarar meydana getiren bir böcek türüdür. Ülkemizde yukarıda belirtilen toprak özelliğine sahip bağ alanlarında yayılış göstermektedir. Polifag bir zararlılardır. Asmadan başka tek ve çok yıllık diğer bitkilerde de zarar yapmaktadır (Anonim, 2008a).

Dişileri oldukça büyük olup 40 mm'ye ulaşabilmektedir. Antenlerinin ucu topuzlu ve küçüktür. Erkeğin vücut uzunluğu 28-30 mm, antenleri ise dişilerin antenine göre büyük, yelpaze şeklinde ve 7 parçalıdır. Vücut rengi, kırmızımsı kahverengi zemin üzerine, küçük adacıklar halinde ve çok sık beyaz pulcuklarla kaplıdır (Anonim, 2008a).

Erginler Haziran'ın üçüncü haftasından Temmuz ayının ilk yarısına kadar güneş batmadan hemen önce ve sonrasında uçmaya başlar, çiftleşir ve tekrar toprağa girmektedirler. Çiftleşen dişiler yumurtalarını toprağın 18-20 cm derinliğine gruplar halinde bırakırlar. Temmuz sonuna doğru açılan yumurtalardan çıkan larvalar ilk önce toprak humusu ile beslenmektedir. Ağustos ve eylül'e doğru ikinci evreye ulaşan larvalar, bitki köklerine saldırmaya başlar. Kışı geçiren larvalar, mart ayıyla beraber beslenme aktivitelerinin artmasıyla mayıs sonu ve haziranda üçüncü evreye ulaşırlar. Yaz mevsimi boyunca beslenmeye devam ederler. Takip eden kış mevsimini istirahat halinde geçirerek ilkbaharda bir süre daha zarar yapmaya devam ederler. Beslenmeyi bitiren larvalar sırasıyla prepupa ve pupa dönemlerini geçirerek ergin hale gelmektedirler. Genellikle 2-2,5 yıl süren bu hayat döngüsünde bir döl verirler (Anonim, 2008a).

Larvalar etli, sarımsı renkte olup, "C" şeklindedir. Üzeri ince ve seyrek kıllarla örtülüdür. Baş büyük, bal renginde ve öne doğru meyillidir. Toraks kısmında iyi gelişmiş üç çift bacak bulunur. Bunları yürümekten ziyade toprağı kazmak için kullanır. Abdomenin son halkası diğerlerinden daha büyüktür. Olgun larva 70-80 mm büyüklüğe ulaşır, topraktan ördüğü muntazam bir yuva içinde prepupa ve pupa evrelerini tamamlamaktadır. Pupalar 40-50 mm boyunda ve koyu kahverengi renktedir (Anonim, 2008a).

1.6. *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae)'ın Hayat Döngüsü

Kestane hortumlu böceği, *Curculio elephas*, erginleri, gri-sarı ve kırmızımsı gri renkli olan 6,0-10,5 mm boyunda bir meyve zararlısıdır. Başın ön tarafında bulunan ağız uzayarak hortum şeklini almıştır. Hortumun uzunluğu dişilerde hemen hemen vücut uzunluğu kadar, erkeklerde ise bunun yarısı kadardır. Yumurtaları 0.5x0.3mm boyutlarında; ovalimsi beyaz renklidir. Larvalar, krem beyaz renkli bacaksız larva tipinde olup, 7-12 mm uzunluktadır. Toplam 4 larva dönemi geçirirler. Pupalar serbest pupa tipindedir (Anonim, 2008b).

C. elephas, kış mevsimini toprakta 3-15 cm derinlikte larva olarak geçirmektedir. Larva dönemi genellikle 8-10 aydır. Larvaların büyük çoğunluğu, ertesi yıl pupa olduğu halde; bir kısmı toprakta 2-3 ve hatta 4 kış daha geçirebilmektedir. Toprakta kışlayan larva, çoğunlukla kendi salgıları ile çeperi sıvanmış; dış etkilere karşı çabuk bozulan bir yuvada bulunur. Larvalar haziran ayından itibaren pupa olmaya başlar ve Ağustos ayının ilk haftasından itibaren de erginler çıkar (Anonim, 2008b).

Ergin uçuşları Ağustos sonundan Ekim ayının ilk haftasına kadar devam edebilir. Ergin çıkışlarından hemen sonra çiftleşme gerçekleşir. Çiftleşen erginler 8-10 gün sonra yumurtlamaya başlamaktadır. Bir dişi 20-50 yumurta bırakabilir. Ergin dişiler yumurtalarını genellikle kirpilerin içerisindeki kestane meyvelerine bırakmaktadırlar. Yumurtaların kuluçka süresi sıcaklığa bağlı olarak 5-8 veya 15-20 gündür. Yumurtadan çıkan larva, meyve içinde beslenip gelişmesini tamamlar. Bir meyve içinde birden fazla, *C. elephas* larvası gelişebilir. Larva gelişme süresi 30-40 gün kadar olup, larvalar olgunlaşınca meyveyi terk ederek toprağa inerek yeni bir döngü başlatmaktadırlar. *C. elephas* türü yılda bir döl vermektedir (Anonim, 2008b).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Önuçar ve Ulu (1989), Kestane ağaç altları ve gömü yerlerinde yaptıkları incelemeler sonucunda *C. elephas* larvalarının gömü yerlerinde toprağa geçtiklerini saptanmıştır. Bu zararlının İzmir ili kestaneliklerinde yaptıkları zararın ise %15.70 olduğunu bildirmişlerdir.

Tuncer ve Serdar (1996), Sinop ilinin kestane yetiştirilen alanlarında meyve kurtlanmalarına *C. splendana* ve *C. elephas*'ın neden olduğunu tespit etmiş ve Sinop genelinde kurtlanma oranını *C. splendana* için % 13.3, *C. elephas* için % 2.9 ve toplam da % 16.2 olarak tespit etmişlerdir.

Choo vd. (2002), Kore Cumhuriyeti'ndeki golf sahalarını tehdit eden *Ectinohoplia rufipes* (Coleoptera: Scarabaeidae) ve *Exomala orientalis*'e (Coleoptera: Scarabaeidae) karşı EPN ve EPF kombinasyonunun etkilerini test etmiştir. Alan denemeleri iki farklı golf sahasında yapılmıştır. Uygulamalarda entomopatojen nematod olarak *S. carpocapsae* ve *S. glaseri*, entomopatojen fungus olarak *B. brogniartii* ve kimyasal insektisit olarak ta Fenitrothion kullanılmıştır. *S. glaseri*, *H. bacteriophora*, *B. brogniartii*, Fenitrothion tek tek ve *S. carpocapsae*-*H. bacteriophora*, *S. carpocapsae*- *B. brogniartii*'nin kombine uygulamaları denenmiştir. Elde edilen sonuçlar iki nematod türünün kombinasyonu ile larva ölüm oranlarında azalma olmadığını ancak *S. carpocapsae* + *B. brogniartii* kombinasyonunun aditif etki gösterdiğini ortaya koymuştur.

Shapiro vd. (2004), Ceviz zararlısı olan *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae) larvalarına karşı farklı biyokontrol ajanlarını kombine ederek sinerjistik, aditif veya antagonistik etki oluşturup oluşturmadığını incelemiştir. Sonuçta *H. indica* + *B. bassiana* uygulaması antagonistik, *H. indica* + *M. anisopliae* ise aditif etki göstermiştir. *Steinernema carpocapsae* türü nematodlar *B. bassiana* ile 0,5x oranında antagonistik etki gösterirken 1x oranında ise aditif etki göstermiştir.

Kuske vd. (2005), İsviçre'de yaptıkları çalışmada *C. elephas* larvalarına karşı entomopatojen nematod *S. carpocapsae*'yi uygulamışlar, kontrol denemeleri ile

nematod uygulanan denemeler arasında, ölüm oranı açısından önemli bir fark bulamamışlardır.

Vinciguerra ve Clausi (2006), İtalya'daki kestaneliklerde, kestane zararlıları *Pammene fasciana* (Lepidoptera: Tortricidae), *C. elephas* ve *C. glandium*'a karşı *Steinernema* ve *Heterorhabditis* türlerine ait entomopatojen nematodları denemişler, en etkili türün *H. bacteriophora* olduğunu bildirmişlerdir.

Ansari vd. (2006), yaptığı çalışmada Belçika'da çim sahalara ve otlak alanlara önemli zarar veren *Hoplia philanthus*'a (Coleoptera: Scarabaeidae) karşı *H. bacteriophora*, *M. anisopliae* ve bir kimyasal insektisit olan Dursban'ı tek başlarına ve birlikte kombinasyonlar halinde kullanarak bunların etkilerini test etmiştir. Çalışmalar alan denemesi şeklinde yürütülmüştür. Sonuçta *H. bacteriophora* ve *M. anisopliae*'nin birlikte kullanımı sinerjistik etki göstermiştir.

Acevedo vd. (2007), şeker kamışı zararlısı olan *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvalarına karşı EPF olan *M. anisopliae*'nin iki suşunu (LPP39 ve LPP45) ve bir EPN olan *H. bacteriophora*'yı ayrı ayrı ve kombine kullanım şeklinde test etmişlerdir. Bu çalışmada 3 farklı uygulama yapılmıştır. İlk olarak larva önce fungus süspansiyonuna batırılıp içerisinde steril kum bulunan petriye aktarılmış ve hemen ardından nematod uygulanmıştır. İkinci olarak fungus süspansiyonuna batırılan larva 48 saat bekletildikten sonra önceden nematod eklenmiş petriye aktarılmıştır. Son olarak ise nematod eklenmiş kuma larva aktarılıp 48 saat sonra petriye fungus süspansiyonu verilmiştir. Tüm denemeler oda sıcaklığında ve 14 gün süreyle gözlemlenmiştir. *M. anisopliae*'nin LPP45 suşu 7 günde %100 ölüm oranına sebep olurken, LPP39 suşu 9 günde sadece %60 ölüm oranına sebep olmuştur. *H. bacteriophora* ise 5 günde %100 ölüm oranı göstermiştir. Kombinasyon uygulamalarında nematod ile fungusun LPP39 suşu 4 günde, LPP45 suşu ile ise uygulamanın 6. gününde %100 ölüm oranı elde edilmiştir.

Karagöz vd. (2009) yaptıkları çalışmada kestane meyve iç kurtları *Cydia splendana* (Lepidoptera) ve *C. elephas*'a karşı 3 farklı nematod (*S. feltiae*, *S. weiseri* ve *H. bacteriophora*) türünün etkinliğini farklı sıcaklıklar kullanarak test etmişlerdir. Düşük sıcaklıklara (10 ve 15°C) *S. feltiae* ve *S. weiseri* türlerinin daha

iyi adapte olduğunu, *H. bacteriophora*'nın ise 20 ve 25 °C gibi daha yüksek sıcaklıklarda yüksek öldürme oranına sahip olduğunu belirtmişlerdir. Elde ettikleri larva ölüm oranları *C. splendana* türünün nematod enfeksiyonuna karşı oldukça duyarlı olduğunu ancak *C. elephas* larvalarının ise dirençli olduğunu göstermiştir.

Demir vd. (2014) *C. elephas* ve *P. fullo* larvalarına karşı *Steinernema glaseri*, *S. weiseri* ve *H. bacteriophora* türü nematodları 50 ve 100 infektif juvenil/larva olacak şekilde tek başlarına ve ikili kombinasyonlar halinde kullanmışlardır. *Curculio elephas* larvalarına karşı en fazla ölüm oranını (%81) *S. weiseri* + *H. bacteriophora* kombinasyon uygulamasından; en az ölüm oranını (%21) ise *S. glaseri* türü nematodları tek başına kullandıkları uygulamalardan elde etmişlerdir. *Polyphylla fullo* larvalarına karşı yapılan çalışmalar sonucunda ise nematodlar hem tek başlarına hem de kombinasyonlar halinde kullanıldığında ölüm oranının oldukça düşük (%20'nin altında) olduğu tespit edilmiştir. Kombinasyon uygulamalarının hiçbirisinde sinerjistik bir etki ortaya çıkmamış olup antagonistik veya arttırıcı (aditif) ilişkiler tespit edilmiştir. Bu sonuçların ardından yazarlar özellikle *P. fullo* larvalarına karşı entomopatojen fungus gibi başka patojen organizmaların test edilmesini önermişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Deneylerde Kullanılan Organizmalar

3.1.1. *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae)

Büyük mum güvesi olarak adlandırılan ve petek zararlısı olan bu tür laboratuvar ortamında ve yapay besi yerinde üretilmiştir. *G. mellonella* için kullanılan besi ortamında %11 bal, %11 gliserol, %22 buğday unu, %22 mısır unu, %11 süt tozu, %5,5 kuru maya ve %17,5 bal mumu bulunmakta olup kültürler 28-32°C’de inkübe edilmiştir (Han ve Ehlers, 2000). Bu hayvanların son dönem larvaları deneylerde kullanılan entomopatojen nematodların üretimi için kullanılmıştır (Kaya ve Stock, 1997).

3.1.2. *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae)

Kestane meyve zararlısı olan *C. elephas* larvaları Aydın’ın Umurlu Organize Sanayi Bölgesindeki kestane işletmesinden temin edilmiştir. Ekim, Kasım aylarında kestaneliklerden toplanan meyveler çuvalar içerisinde işletmeye getirilmektedir. Kestanelerin depolanması ve işlenmesi esnasında meyveyi terk eden larvalar kestane çuvalarının etrafında bulunmaktadır. Toplanan larvalar ince kestane talaşı içerisinde muhafaza edilerek laboratuvara getirilmiş ve deneylerde kullanılıncaya kadar 15°C’de saklanmıştır (Karagoz vd., 2009; Demir vd., 2014).

3.1.3. *Polyphylla fullo* (Coleoptera: Scarabaeidae)

Haziran Böceği olarak bilinen *P. fullo*’nun 2-3 yıl süren hayat döngüsünden dolayı laboratuvarda kültürünün yapılması oldukça zordur. Bu yüzden deneylerde kullanılan tüm larvalar araziden toplanmıştır. *Polyphylla fullo* larvaları özellikle zararlının yoğun olarak görüldüğü Aydın ilinin Köşk, Dalama, Sultanhisar ve Yenipazar ilçelerindeki çilek ekim alanlarından toplanmıştır. Araziden larvaların toplanması çileklerin fide döneminde olduğu Eylül-Kasım aylarında yapılmıştır. Bu dönemde henüz güçlenmemiş olan fide kökleri larvalar tarafından yendiğinde yapraklar solmakta ve kurumaktadır. Bu tip fidelerin bulunduğu alandaki topraklar kazılarak *P. fullo* larvaları elde edilmiştir. Alandan toplanan larvalar plastik kaplar

içerisinde üzerleri bir miktar toprak örtülerek laboratuvara getirilmiştir. Larvaların strese girmelerini ve birbirlerine zarar vermelerini engellemek için 11 l'lik plastik saksılar içerisinde en fazla 3 adet olacak şekilde muhafaza edilen larvalar patates ve havuçu ile düzenli olarak beslenmiştir (Demir vd., 2014).

3.1.4. Entomopatojen Nematod Kültürleri

Çalışmada Aydın ilinden izole edilmiş olan *H. bacteriophora* (09-43) izolatu kullanılmıştır. İçerisinde filtre kağıdı bulunan 9 cm'lik plastik petrilere larva başına 100 IJ konsantrasyona sahip nematod süspansiyonu eklenmiştir. Petrilere 10 adet son dönem *G. mellonella* larvası bırakılarak oda sıcaklığında (23 ± 1 °C) muhafaza edilmişlerdir. Kırksekiz saat sonra yapılan kontrollerde ölen larvalar petrilere alınarak White Trap (White, 1927) sistemine aktarılmıştır. Birkaç hafta beklemenin ardından White Trap'lerdeki kadavralardan çıkış yapan yeni nesil IJ'ler toplanıp yıkanarak tetrapak kutularda ve 10-15°C'de muhafaza edilmiştir (Gulcu ve Hazır, 2012). Tüm deneylerde en fazla 3 haftalık IJ kültürleri kullanılmıştır (Gungor vd., 2006).

3.1.5. Entomopatojen Funguslar

Çalışmalarda *Metarhizium anisopliae*'nin 4556 ve V275 adlı iki suşu toz ve granül formülasyon halinde kullanılmıştır. Üretilen bu funguslar İngiltere'nin Swansea Üniversitesinden Prof. Dr. Tariq M. Butt ve ekibi tarafından temin edilmiştir. Diğer bir fungus türü olan ve çalışmada kullanılan *Beauveria brogniartii* ise Avusturya Innsbruck Üniversitesinden Dr. Hermann Strasser tarafından temin edilmiştir. *Beauveria brogniartii* konidia'ları Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck)'da üretilmiştir (André, 2007).

Fungus spor sayımları Thoma lamı kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Thoma lamında fungus sporu sayımı.

3.2. Entomopatojen Fungus Ve Nematodların Etkinlik Denemeleri

3.2.1. *Curculio elephas* İle Yapılan Denemeler

3.2.1.1. Kavanoz denemeleri

Bu çalışmada yüzey alanı 33cm^2 olan 350 ml'lik plastik kavanozlar kullanılmıştır. Denemelerde 6 farklı deney grubu oluşturulmuştur (Çizelge 3.1). Her bir kavanoza kestanelikten getirilen ve nem oranı %89 olduğu tespit edilmiş topraktan 150'şer g doldurulmuştur. Deneyde kullanılan toprakların içerisindeki büyük taşlar ayıklanmış ve steril edilmeden kullanılmıştır. Her bir kavanoza $25 \text{ IJ}/\text{cm}^2$ olacak şekilde toplam 825 nematod eklenmiştir. Kontrol grubundaki kaplara ise nematod yerine sadece aynı miktarda distile su verilmiştir. Deneylerde kullanılan

toprakların içerisinde doğal EPN veya EPF bulunup bulunmadığını anlamak için “insect-bait”, “tuzak böcek” yöntemi kullanılmıştır (Akhurst ve Bedding, 1975). Bu amaçla kavanozlara doldurulan toprak karışımlarının içerisine 5'er adet *G. mellonella* larvası konmuş ve bu larvaların enfekte olup olmadıkları 15 gün süreyle takip edilmiştir. Herhangi bir doğal böcek patojeni nematod veya fungus içermediği anlaşılan topraklar denemelerde steril edilmeden kullanılmıştır.

Kavanozlara uygulanan fungus konsantrasyonları 1×10^7 olarak ayarlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan funguslar toz haldeki ticari formülasyonlardır. Söz konusu konsantrasyonu hazırlamak için *M. anisopliae* 4556 izolatu için 0,1546 g ve *M. anisopliae* V275 için 0,2150 g fungus sporu tartılarak %0,03'lük Tween 80 solüsyonu ile karıştırılmıştır. Böylece her iki izolata ait sulu süspansiyonlar elde edilmiştir (Ansari ve Butt, 2012). Fungus denemelerinde hazırlanan süspansiyondan otomatik pipet yardımı ile 1ml alınarak larvaların bulunduğu 50 ml'lik küçük plastik kaba aktarılmış ve larvalar 30sn süresince bu süspansiyona maruz bırakıldıktan sonra pens yardımı ile kavanozlara aktarılmıştır. Kontrol grubunda larvalar sadece %0,03'lük Tween 80 solüsyonuna 30 sn maruz bırakılmış ve daha sonra kavanozlara aktarılmıştır (Şekil 3.2).

Nematod ile funguslar'ın birlikte uygulandığı deney grubunda ise cm^2 'ye 25 II uygulandıktan 1 saat sonra 1 ml fungus süspansiyonuna 30 sn maruz bırakılmış larvalar kavanozlara aktarılmıştır. Kontrol grubunda ise larvalar %0,03'lük Tween 80 solüsyonuna 30 sn maruz bırakılmış ve kavanozlara aktarılmıştır. Bütün deney gruplarında *C. elephas* larvaları nematod uygulamalarından 1 saat sonra ve her bir kavanoza 5 adet bırakılmıştır. Her deney grubu için 10 kavanoz hazırlanmış ve karanlık bir yerde oda sıcaklığında ($23-24 \pm 1^\circ\text{C}$) bekletilmiştir. Deneyler farklı tarihlerde 3 kez tekrarlanmıştır.

Çizelge 3.1. *Curculio elephas* ile yapılan kavanoz denemelerinde test edilen deney grupları.

Deney grupları	Kullanılan izolatlar
Nematod	<i>H. bacteriophora</i> 09-43
Fungus	<i>M. anisopliae</i> V275
Fungus	<i>M. anisopliae</i> 4556
Fungus + Nematod	<i>M. anisopliae</i> 4556 + <i>H. bacteriophora</i> 09-43
Fungus + Nematod	<i>M. anisopliae</i> V275 + <i>H. bacteriophora</i> 09-43
Kontrol	Distile su veya %0,03'lük tween 80'li distile su



Şekil 3.2. *Curculio elephas*'ın kavanoz denemelerinin kuruluşu. a) Plastik kavanozlara toprak eklenmesi, b) Larvaların seçilmesi, c) Fungus süspansiyonunun hazırlanması, d) Larvaların fungusla süspanse edilmesi, e) Larvaların kavanozlara aktarılması, f) Nematod uygulanması, g) Deney kavanozlarının saklanması.

3.2.1.2. Saksı denemeleri (Kestane gömü yeri similasyonu)

Çalışmanın bu kısmında 11 kg'lık plastik saksılarda kestane gömü yerlerindeki benzer koşullar oluşturularak *C. elephas* larvalarına fungus uygulaması yapılmıştır. Denemeler laboratuvar ve açık hava olmak üzere iki farklı ortamda yürütülmüştür.

Her bir saksıya kestaneliklerden getirilmiş, içerisindeki olası büyük partiküller uzaklaştırılmış ve nemlendirilmiş 3'er kg toprak doldurulmuştur. Deneyde *M. anisoplia*'nın iki farklı suşu (4556 ve V275) ve iki farklı yöntem uygulanmıştır.

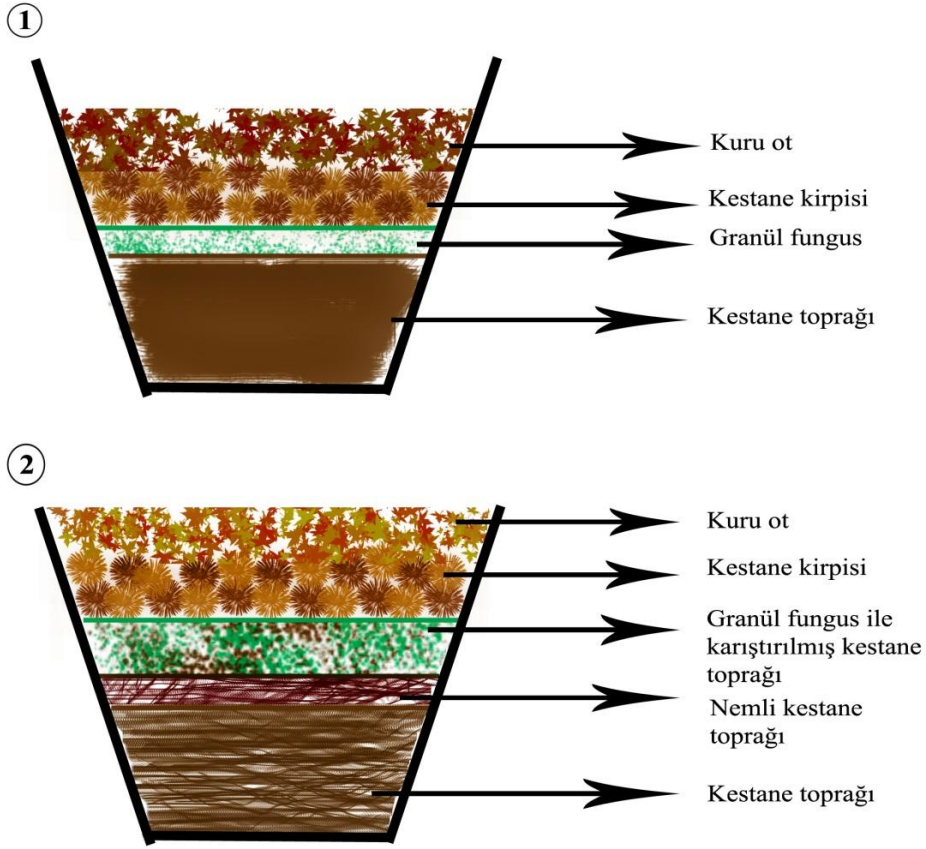
A- Fungusların tabaka şeklinde toprak yüzeyine uygulanması: Bu yöntemde 50 g granül fungus formülasyonu saksı içerisindeki toprağın en üst kısmına ince bir tabaka şeklinde yayılmış ve üzeri kestane meyvelerinin kirpi olarak adlandırılan dikenleri ile örtülmüştür. Bu işlemin ardından her bir saksıya 20'şer larva bırakılmış ve saksıların üzerleri kuru otlar ile kapatılmıştır (Şekil 3.3 ve 3.4 (1)).

B- Fungusların toprak katmanı içerisine karıştırılarak uygulanması: Bu yöntemde ise içerisinde 3 kg toprak bulunan saksılara 50 g granül fungus formülasyonu ile daha önceden iyice karıştırılmış 1 kg toprak yayılmış ve üzerleri kestane kirpisi ile kaplanmıştır (Şekil 3.3 ve 3.4 (2)).

Daha sonra her saksıya 20'şer larva konulmuş ve saksıların üzerleri kuru otlar ile kaplanmıştır (Şekil 3.3 ve 3.4). Kontrol grubundaki saksılar deney grupları gibi hazırlanmış ancak bu saksılara fungus eklenmemiştir. Hazırlanan saksılar 5-6 günde bir distile su ile nemlendirilmiştir. Her grup için 6 saksı hazırlanmış bunlardan 3 tanesi laboratuvar, 3 tanesi ise açık havada tutulmuştur. Deneyler farklı zamanlarda 2 defa tekrar edilmiştir.



Şekil 3.3. *Curculio elephas* saksı denemesi (Kestane gömü yeri simülasyonu). a) Saksılara toprağın doldurulması, b) Granül haldeki fungusun tartımı, c) Toprağa fungus uygulanması, d) Kestane kirpilerinin saksılara yerleştirilmesi, e) Larvaların saksılara aktarılması f) Saksıların üzerinin kuru ot ile kapatılması.



Şekil 3.4. Deney düzeneklerinin şematik gösterimi. 1) toprak yüzeyine granül fungus uygulaması, 2) granül fungus ile karıştırılmış toprak uygulaması.

3.2.2. *Polyphylla fullo* Larva İle Yapılan Denemeler

3.2.2.1. İnfektivite testi

Bu çalışmayı yürütmek için 10 adet 2. ve 3. dönem larva seçilmiştir. Larvalardan 5 tanesi deney grubu, diğer 5'i ise kontrol grubu olarak kullanılmıştır. *M. anisopliae* 4556 suşundan 0,0197 g spor tartılmış ve 10 ml %0,03'lük Tween 80 solüsyonuna aktarılarak vortexlenmiştir. Fungus süspansiyonundan 0,7 ml alınarak larvaların 3. çift bacağının koksa'sının hemen altından insülin iğnesi ile hemosöl içerisine

enjekte edilmiştir. Büyük larvalar (3. dönem) için 1×10^8 , küçük larvalar (2. dönem) içinse 1×10^7 spor konsantrasyonuna sahip fungus süspansiyonu kullanılmıştır. Kontrol grubundaki larvalara ise sadece 0,7 ml %0,03'lük Tween 80 çözeltisi enjekte edilmiştir (Şekil 3.5).

Fungus sporu veya distile su enjekte edilen larvalar içerisinde steril çilek toprağı bulunan saksılara ayrı ayrı yerleştirilerek oda sıcaklığında 4 gün süreyle tutulmuş ve beslenmeleri için ortama havuç eklenmiştir. Deneyler kurulduktan 48 saat sonra ilk kontroller yapılmıştır.



Şekil 3.5. *Polyphylla fullo* larvalarına entomopatojen fungus sporlarının enjekte edilmesi.

3.2.2.2. Sakı denemeleri

Deneyler içerisinde çilek toprağı bulunan 6 x 5,5 cm boyutlarındaki 1 l'lik plastik saksılarda gerçekleştirilmiştir. Her saksıya 800 g %12 nemli, steril olmayan kumlu-tınlı toprak doldurulmuştur. Çalışmada fungus, nematod, fungus + nematod ve kontrol olmak üzere 4 farklı deney grubu oluşturulmuştur.

A) Fungus uygulaması: *Beauveria brogniartii* sporları PDA besi yerinden bistüri yardımı ile kazınarak elde edilmiştir. Elde edilen toz haldeki fungus sporundan 0,1500 g ($7,3 \times 10^3$ konidia) tartılmış % 0,03'lük Tween 80 solüsyonuyla karıştırılarak süspansiyon hazırlanmıştır. Larvalar steril cam petriler içerisinde 1 ml fungus süspansiyonuna batırılmış ve hazırlanan saksılara aktarılmıştır.

B) Nematod uygulaması: Larvalar saksılara aktarıldıktan 30 dk sonra cm^2 'ye 25 IJ (toplam 825 IJ/ml) gelecek şekilde mikropipet yardımı ile toprak yüzeyine uygulanmıştır.

C) Fungus-nematod kombinasyon uygulaması: Larvalar önce steril cam petrilerde 1 ml fungus süspansiyonu ile süspanse edilmiş ve saksılara aktarıldıktan 30 dk sonra toprak yüzeyine cm^2 'ye 25 IJ gelecek şekilde nematod uygulanmıştır. Kontrol grubundaki larvalar sadece 1ml %0,03'lük Tween 80 çözeltisiyle süspanse edilip saksılara aktarılmıştır. Her saksıya larvaların beslenmesi için 1 adet havuç yerleştirilmiştir (Şekil 3.6).

Bu çalışmalarda da infektivite testlerinde olduğu gibi 2. veya 3. evre *P. fullo* larvaları kullanılmıştır. Her deney grubu için 10 saksı hazırlanmış ve deneyler farklı zamanlarda 3 defa tekrar edilmiştir.

Ayrıca saksı denemelerinde uygulanan aynı yöntem kullanılarak *P. fullo*'nun 1. dönem larvalarına karşı *B. brongniartii* ve *H. bacteriophora*'nın etkinlikleri tek tek ve kombinasyon halinde test edilmiştir. Bu çalışmada her deney grubu için toplam 10 saksı kullanılmıştır.



Şekil 3.6. *Polyphylla fullo* saksı denemesi. a) Fungus süspansiyonu, b) Larvaların fungus süspansiyonuna batırılması, c) Tween 80 solüsyonuna larvaların bulaştırılması (kontrol), d) Larvaların saksılara aktarılması, e) Nematod uygulaması, f) Deneyde kullanılan tüm saksılar.

3.2.2.3. Birinci evre *Polyphylla fullo* larvalarıyla yapılan infektivite denemeleri.

Deneyler de yüzey alanı 33cm² olan 350 ml'lik plastik kavanozlar kullanılmıştır. Denemelerde 4 farklı deney grubu oluşturulmuştur (Çizelge 3.2.). Her bir kavanoza nem oranı %20 olduğu tespit edilmiş çilek toprağından 120'şer g doldurulmuştur. Deneylerde kullanılan toprakların içerisinde doğal EPN veya EPF bulunup bulunmadığını anlamak için "insect-bait", "tuzak böcek" yöntemi kullanılmıştır (Akhurst ve Bedding, 1975). Bu amaçla kavanozlara doldurulan toprak karışımlarının içerisine 5'er adet *G. mellonella* larvası konmuş ve bu larvaların enfekte olup olmadıkları 15 gün süreyle takip edilmiştir. Herhangi bir doğal böcek patojeni nematod veya fungus içermediği anlaşılan topraklar denemelerde steril edilmeden kullanılmıştır.

Her bir kavanoza 25 IJ/cm² olacak şekilde toplam 825 nematod eklenmiştir. Kontrol grubundaki kaplara ise nematod yerine sadece aynı miktarda distile su verilmiştir. *Beauveria brogniartii* sporları PDA besi yerinden bistüri yardımı ile kazınarak elde edilmiştir. Elde edilen toz haldeki fungus sporundan 0,1500 g ($7,3 \times 10^3$ konidia) tartılmış % 0,03'lük Tween 80 solüsyonuyla karıştırılarak süspansiyon hazırlanmıştır. Larvalar steril cam petriler içerisinde 1 ml fungus süspansiyonuna 30 sn süresince batırılmış ve daha sonra pens yardımı ile kavanozlara aktarılmıştır (Ansari ve Butt, 2012). Kontrol grubundaki larvalar sadece %0,03'lük Tween 80 solüsyonuna 30 sn maruz bırakılmış ve daha sonra kavanozlara aktarılmıştır. Nematod ile funguslar'ın birlikte kombinasyon halinde uygulandığı deney grubunda ise cm²'ye 25 IJ uygulandıktan yaklaşık 30 dk sonra 1 ml fungus süspansiyonuna 30 sn maruz bırakılmış larvalar kavanozlara aktarılmıştır. Her deney grubu için 10 kavanoz hazırlanmış ve karanlık bir yerde, oda sıcaklığında (23-24±1°C) bekletilmiştir. Deneyler farklı tarihlerde 3 kez tekrarlanmıştır.

Çizelge 3.2. *Polyphylla fullo* ile yapılan kavanoz denemelerinde test edilen deney grupları.

Deney grupları	Kullanılan izolatlar
Nematod	<i>H. bacteriophora</i> (izolat 09-43)
Fungus	<i>B. brogniartii</i>
Fungus + Nematod	<i>B. brogniartii</i> + <i>H. bacteriophora</i>
Kontrol	Distile su veya %0,03'lük tween 80'li distile su

3.3. İstatistik Analizler

Larva ölüm oranlarına tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) uygulanmış ve gruplar arasındaki farklılıklar Tukey çoklu testi ile belirlenmiştir (P= 0.05) (SPSS, 1999). Ölüm oranlarına Abbott uygulandıktan sonra (Abbott, 1925) verilere arcsin transformasyonu yapılmıştır. Nematod ve fungus türleri (veya izolatları) arasındaki ilişkilerin antagonistic mi, aditif mi ya da sinerjistik mi olduğu beklenen ve gözlenen yüzde larva ölümlerinin karşılaştırılmasıyla

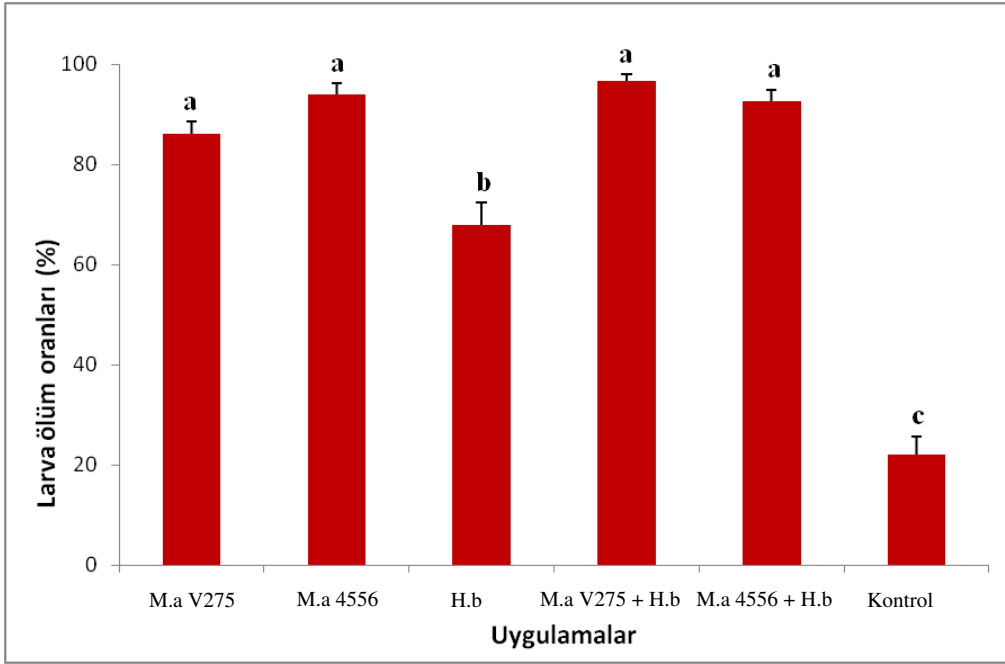
belirlenmiştir (Shapiro-Ilan vd., 2004). Beklenen ölüm oranı $P_E = P_0 + (1 - P_0)(P_1) + (1 - P_0)(1 - P_1)(P_2)$ formülüne göre hesaplanmıştır. (P_E : beklenen ölüm oranı, P_0 : kontrolde gözlenen ölüm oranı, P_1 : tek bir biyolojik kontrol ajanı tek başına kullanıldığında elde edilen ölüm oranı, P_2 : ikinci biyolojik kontrol ajanı tek başına kullanıldığında elde edilen ölüm oranı). Gözlenen ve beklenen ölüm oranı değerlerine (X^2) testi uygulanmıştır. $\chi^2 = (L_0 - L_E)^2 / L_E + (D_0 - D_E)^2 / D_E$ (L_0 : gözlenen canlı larva sayısı, L_E : beklenen canlı larva sayısı, D_0 : gözlenen ölü larva sayısı, D_E : beklenen ölü larva sayısı). Eğer $\chi^2 < 3.84$ = aditif, $\chi^2 > 3.84$ ve $P_C - P_E$ pozitif = sinerjistik, $\chi^2 > 3.84$ ve $P_C - P_E$ negatif = antagonistik (P_C : gözlenen ölüm oranı, P_E : beklenen ölüm oranı) (Shapiro-Ilan vd., 2004).

4. BULGULAR

4.1. *Curculio elephas* İle Yapılan Denemeler

4.1.1. Kavanoz Denemeleri

Entomopatojen fungus *M. anisoplia*'nın iki farklı suşu, entomopatojen nematod *H. bacteriophora* ve bunların kombinasyonları şeklinde yapılan uygulamalar sonucunda kullanılan entomopatojen fungusların hem tek başlarına hem de nematodla kombinasyonlarında oldukça yüksek larva ölümü meydana getirdikleri belirlenmiştir. En fazla larval ölüm M.a V275 + H.b kombinasyonundan (%96,6) elde edilmiş olup bunu sırasıyla M.a 4556 (%94), M.a 4556 + H.b kombinasyonu (%92,6) ve M.a V275 (%86) izlemiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda bu gruplar arasında önemli bir farkın olmadığı tespit edilmiştir ($P>0.05$). Ancak *H. bacteriophora* tek başına kullanıldığında görülen larva ölüm oranı %68 olarak tespit edilmiş olup, yapılan analizler *H. bacteriophora* ile diğer uygulama grupları arasındaki farkın istatistiki açıdan önemli olduğunu göstermiştir. Tüm deney grupları ile kontrol grubunda görülen ölüm oranları arasında da istatistiksel fark olduğu tespit edilmiştir ($F=96,02$; $df=5,174$; $P<0.001$) (Şekil 4.1). Kombinasyon şeklinde yapılan uygulamalardan M.a 275 + H.b için $\chi^2 = 0,002$, M.a 4556 + H.b için ise $\chi^2 = 0,306$ olarak hesaplanmıştır. Her iki değerde 3.84'den küçük olduğu için kombinasyon uygulamalarından ortaya çıkan etkilerin aditif olduğu belirlenmiştir.



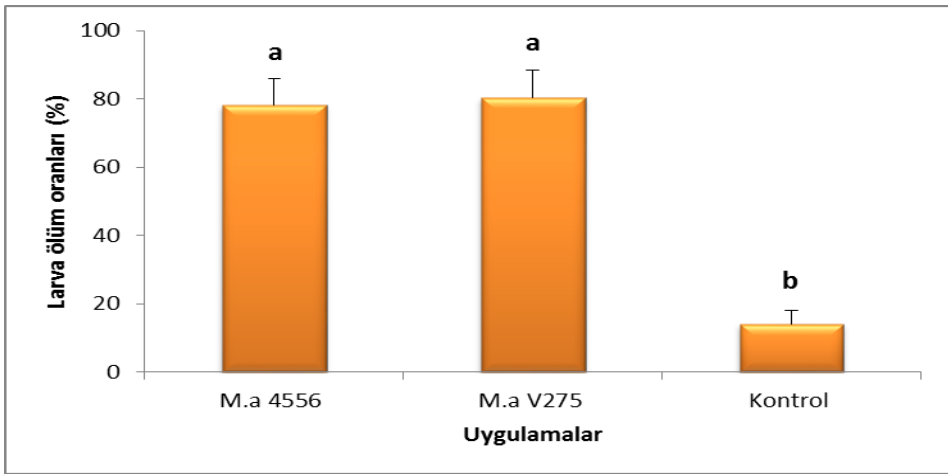
Şekil 4.1. Kavanoz denemeleri sonucunda *Curculio elephas* larvalarında görülen ölüm oranları (%).

4.1.2. Saksı Denemeleri (Kestane Gömü Yeri Similasyonu)

Fungus sporlarının tabaka şeklinde toprağın en üst kısmına uygulanması veya toprak katmanı içerisine karıştırılarak uygulanması şeklinde yapılan denemeler sonucunda kullanılan *M. anisoplia* 4556 ve V275 fungus izolatlarının *C. elephas* larvalarına karşı etkili oldukları belirlenmiştir.

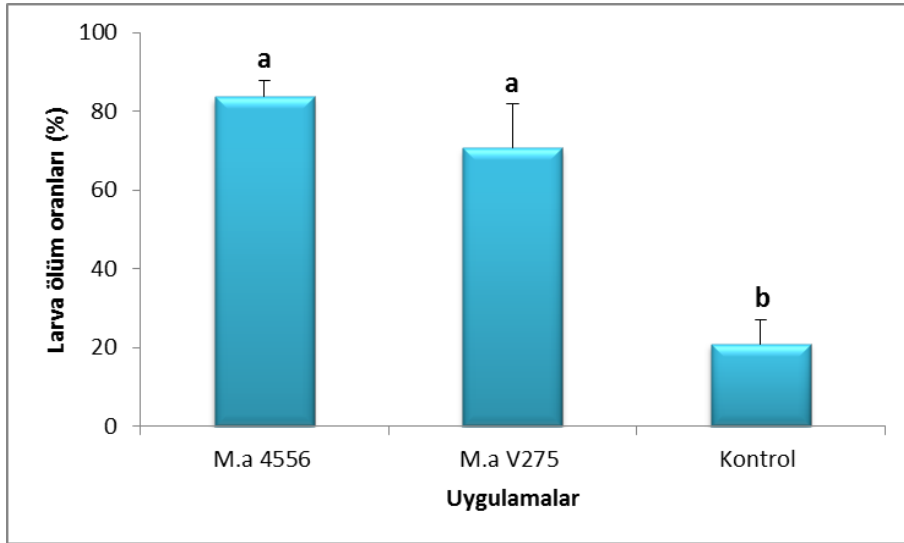
A- Fungusların tabaka şeklinde toprak yüzeyine uygulanması

1. Laboratuvar ortamı: *Metarhizium anisoplia* 4556 izolatu %78, V275 izolatu ise %80 oranında larva ölümü meydana getirmiştir. Kontrol grubundaki ölüm oranı ise %14 olarak tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda iki fungus izolatinin etkinliği arasında istatistiksel açıdan fark olmadığı ancak kontrol grubu ile fungus uygulamaları arasında önemli derece farkın olduğu belirlenmiştir ($F= 15,52$; $df= 2,15$; $P<0.05$) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Tabaka şeklinde toprak yüzeyine fungus uygulamasının ardından laboratuvar ortamında tutulan saksılardaki *Curculio elephas* larva ölüm oranları.

2. Dış ortam: Hazırlanan saksıların dış ortamda tutulması sonucunda larva ölüm oranları *M. anisoplia* 4556 izolatu için %83, V275 izolatu için %70, kontrol grubu içinse %21 olarak tespit edilmiştir. İstatiksel olarak kontrol grubu ile fungus uygulamaları arasında önemli oranda fark olmasına rağmen, iki fungus izolatinin etkinliği arasında istatistiksel açıdan farkın olmadığı belirlenmiştir ($F= 10,25$; $df= 2,15$; $P<0.05$) (Şekil 4.3).

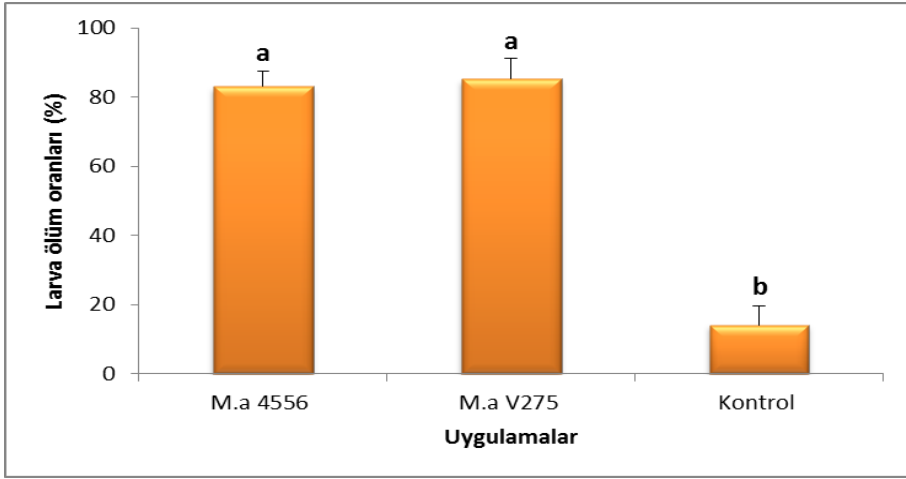


Şekil 4.3. Tabaka şeklinde toprak yüzeyine fungus uygulamasının ardından dış ortamda tutulan saksılardaki *Curculio elephas* larva ölüm oranları.

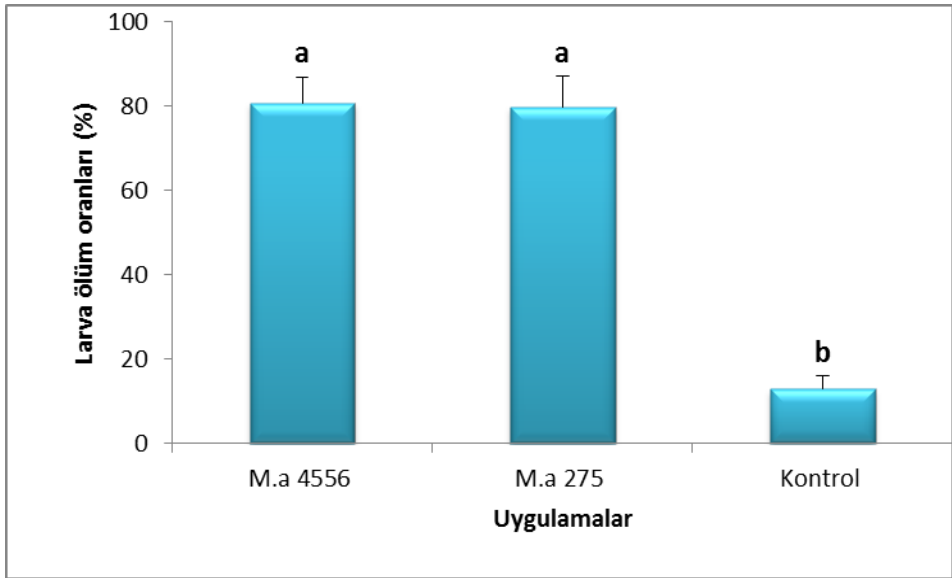
Fungus sporlarının tabaka şeklinde uygulamaları ile hazırlanan deney düzeneklerinin iç ortam veya dış ortamda tutulması arasında hem *M. anisoplia* 4556 ($t= 0,21$; $df= 10$; $P= 0,29$) hem de V 275 izolatu ($t= 0,33$; $df= 10$; $P= 0,25$) bakımından istatistiksel açıdan önemli olmadığı anlaşılmıştır.

B- Fungusların toprak içerisine karıştırılarak uygulanması

1. Laboratuvar ortamı: Fungus sporlarının toprak içerisine karıştırılarak uygulanması ve hazırlanan saksıların laboratuvar ortamında tutulması sonucunda tespit edilen larva ölüm oranları *M. anisoplia* 4556 izolatında %83, V275 izolatında %85, kontrol grubunda ise %14 olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak fungus uygulamaları arasında fark yokken, kontrol grubu ile fungus grupları arasında önemli oranda farkın olduğu belirlenmiştir ($F= 26,15$; $df= 2,15$; $P<0.05$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Toprak içerisine karıştırarak uygulamasının ardından laboratuvar ortamında tutulan saksılardaki *Curculio elephas* larva ölüm oranları.



Şekil 4.5. Toprak içerisine karıştırarak uygulamasının ardından dış ortamda tutulan saksılardaki *Curculio elephas* larva ölüm oranları.

2. Dış ortam: Denemeler için hazırlanan saksıların dış ortamda tutulması sonucunda *C. elephas* larva ölüm oranları *M. anisoplia* 4556 ve V275 izolatları için sırasıyla %80 ve %79 olarak tespit edilmiştir. Yapılan analizler bu iki fungus izolatının ortaya koyduğu ölüm oranları arasında önemli bir farkın olmadığını ancak kontrol grubu ile aralarında istatistiksel açıdan önemli fark olduğu göstermiştir ($F= 18,49$; $df= 2,15$; $P<0.05$) (Şekil 4.5).

Fungusların toprak içerisine karıştırılarak uygulanması ile hazırlanan deney düzenekleri iki ayrı grup olarak laboratuvar ve dış ortamda tutulmuştur. Yapılan t testi sonucunda saksıların iç veya dış ortamda tutulmaları arasında larva ölüm oranları bakımından istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Elde edilen değerler 4556 izolatı için ($t= 0,03$; $df= 10$; $P= 0,39$), V275 izolatı içinse ($t= 0,57$; $df= 10$; $P= 0,94$) olarak tespit edilmiştir.

4.2. *Polyphylla fullo* Larva İle Yapılan Denemeler

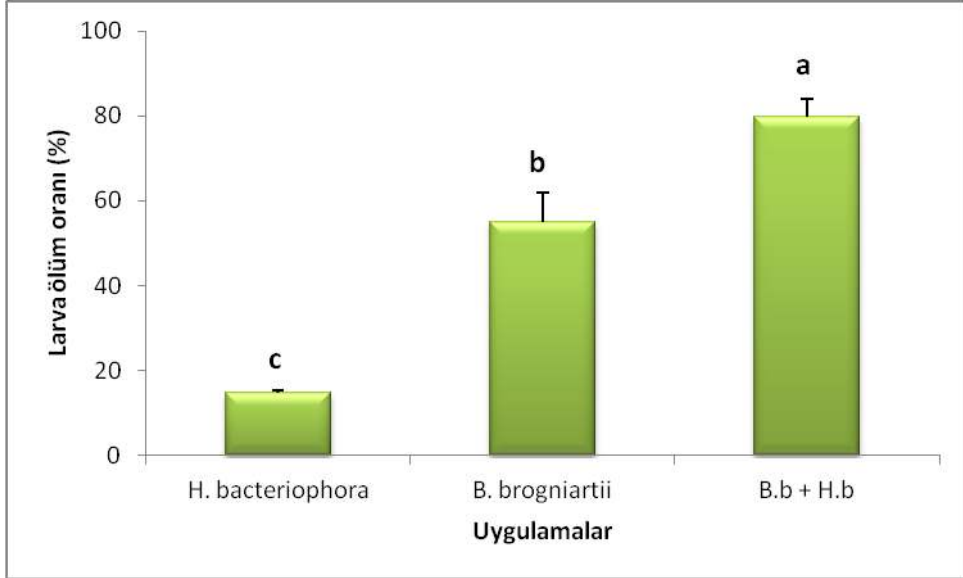
4.2.1. İnfektivite Testi

İnsülin iğnesi aracılığıyla hemosöl içerisine hem *M. anisoplia* fungus sporları hem de sadece %0,03'lük Tween 80 solüsyonu verilen kontrol grubundaki *P. fullo* larvalarının tamamı ölmüştür. Ölen larvalar White-tap sistemine alınmış ancak kadavralarda entomopatojen fungus üremesinin olmadığı görülmüştür.

4.2.2. Saksı Denemeleri

Yürütülen saksı denemeleri sonucunda en fazla ölüm oranı (%79) *H. bacteriophora* ve *B. brogniartii* kombinasyon uygulamasından elde edilmiştir. Bunu ise %55'lik ölüm oranıyla *B. brogniartii* ve %14 ile *H. bacteriophora* takip etmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda patojen uygulamaları arasında önemli bir farkın olmadığı ancak kontrol grubuyla patojenler arasındaki farkın önemli olduğu belirlenmiştir ($F= 47,11$; $df= 2,6$; $P<0.05$) (Şekil 4.6). Yapılan χ^2 analizi sonucunda $\chi^2 = 4,81$ olarak hesaplanmıştır.

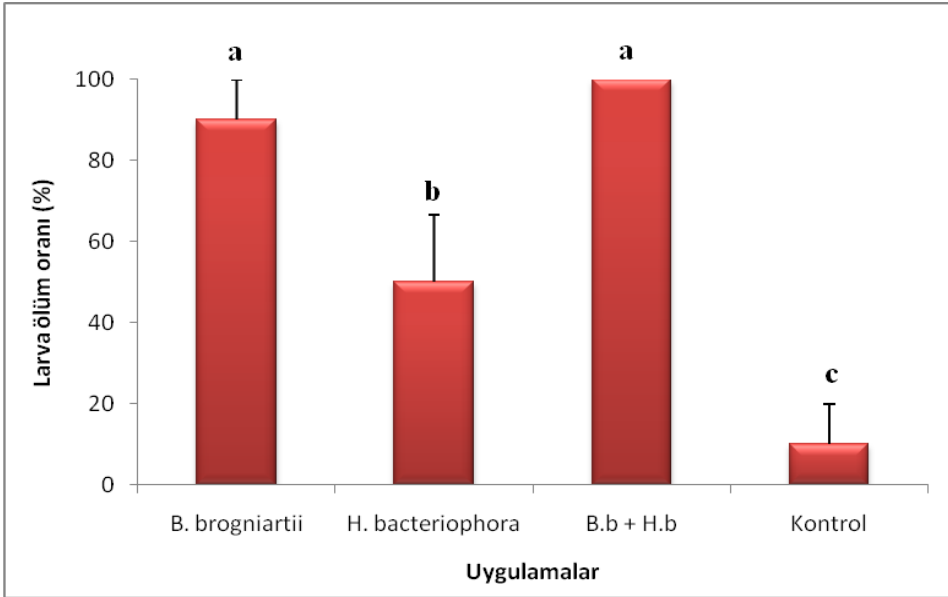
Bu değer 3,84'den büyük olduğu ve gözlenen ölüm oranı - beklenen ölüm oranı farkı pozitif olduğu için kombinasyon uygulamalarında ortaya çıkan interaksiyonun sinerjistik olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.6. Saksı denemeleri sonucunda elde edilen *Polyphylla fullo* larva ölüm oranları.

4.2.3. Birinci Evre *Polyphylla fullo* Larvalarıyla Yapılan İnfektivite Denemeleri

İlk evre *P. fullo* larvalarıyla yürütülen çalışma sonucunda entomopatojen fungus *B. brogniartii* tek başına uygulandığında %90 larval ölüm meydana getirirken, entomopatojen nematod *H. bacteriophora*'da bu oran %50 olmuştur. Her iki patojenin bir arada kullanılması sonucu larvaların tamamı ölmüştür (%100). Yapılan istatistiksel analizler sonucunda kombinasyon uygulaması ile entomopatojen fungus'un tek başına uygulanması arasında istatistiksel farkın olmadığı ancak bu iki grupla *H. bacteriophora* uygulaması arasındaki farkın önemli olduğu belirlenmiştir ($F= 14,16$; $df= 3,36$; $P<0.05$) (Şekil 4.7). Yapılan tüm uygulamalar ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (Şekil 4.7). Kombinasyon uygulaması sonucu elde edilen etki tipinin ise aditif olduğu belirlenmiştir ($X^2= 0,26$).



Şekil 4.7. Birinci evre *Polyphylla fullo* larvalarına karşı *B. brogniartii*, *H. bacteriophora* ve bunların kombinasyonlarının denenmesi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Daha önce yapılan çalışmalarda kestane meyve içkürdü *Curculio elephas* ve manas larvası *Polyphylla fullo* larvalarının entomopatojen nematod enfeksiyonlarına karşı dirençli oldukları rapor edilmiştir. Karagöz vd. (2009) yaptıkları çalışmada kestane meyve iç kurtları *Cydia splendana* (Lepidoptera) ve *C. elephas*'a karşı 3 farklı nematod (*Steinernema feltiae*, *S. weiseri* ve *H. bacteriophora*) türünün etkinliğini farklı sıcaklıklar kullanarak test etmişlerdir. Düşük sıcaklıklara (10 ve 15°C) *S. feltiae* ve *S. weiseri* türlerinin daha iyi adapte olduğunu, *H. bacteriophora*'nın ise 20 ve 25 °C gibi daha yüksek sıcaklıklarda daha fazla öldürme oranına sahip olduğunu belirtmişlerdir. Elde ettikleri en yüksek larva ölüm oranları *C. splendana* için %80 iken, *C. elephas* larvalarında bu oran yine en fazla *H. bacteriophora* uygulamalarında %48 olarak tespit edilmiştir. Farklı konukçu böceğe karşı iki farklı nematod türünün kombinasyon şeklinde uygulanması sonucunda sinerjistik ya da aditif interaksiyonlar olduğu rapor edilmiştir. Choo vd. (1996) *Diabrotica undecimpunctata* (Coleoptera: Chrysomelidae) larvalarına karşı 4 farklı EPN tür veya izolatını tek başlarına ve kombinasyonlar halinde test etmişlerdir. Laboratuvar denemelerinde elde ettikleri beklenen ve gözlenen ölüm oranları arasında önemli bir farkın olmadığı ve etkileşimin aditif olduğu sonucuna varmışlardır. Ancak sera denemelerinden elde ettikleri sonuçlar nematodların kombinasyon şeklinde uygulanmalarının herhangi bir avantaj sağlamadığını göstermiştir. Benzer şekilde Demir vd. (2014) daha önceden nematod enfeksiyonuna dirençli oldukları bildirilen *C. elephas* ve *P. fullo* larvalarına karşı *S. glaseri*, *S. weiseri* ve *H. bacteriophora* türü nematodları 50 ve 100 infektif juvenil/larva olacak şekilde tek başlarına ve ikili kombinasyonlar halinde kullanmışlardır. *Curculio elephas* larvalarına karşı en fazla ölüm oranını (%81) *S. weiseri* + *H. bacteriophora* kombinasyon uygulamasından; en az ölüm oranını (%21) ise *S. glaseri* türü nematodları tek başına kullandıkları uygulamalardan elde etmişlerdir. *Polyphylla fullo* larvalarına karşı yapılan çalışmalar sonucunda ise nematodlar hem tek başlarına hem de kombinasyonlar halinde kullanıldığında ölüm oranının oldukça düşük (%20'nin altında) olduğu tespit edilmiştir. Kombinasyon uygulamalarının hiçbirisinde sinerjistik bir etki ortaya çıkmamış olup antagonistik veya arttırıcı (aditif) ilişkiler tespit edilmiştir. Bu sonuçların ardından yazarlar aditif bir etkileşim gözlemlemiş olmalarına rağmen bu zararlılara karşı (özellikle *P. fullo* larvalarına karşı) entomopatojen

fungus gibi başka patojen organizmaların test edilmesini önermişlerdir. Çünkü Koppenhöfer ve Grewal (2005) iki farklı ajanın kombinasyon şeklinde uygulanması için ortada sinerjistik bir etkileşimin olması gerektiğini belirtmişlerdir. Bugüne kadar *B. thuringiensis* ssp. *japonensis* ile *H. bacteriophora* ya da *S. glaseri* arasındaki interaksyonun sinerjistik olduğunu ve bunların belirli manas türlerine karşı bir arada kullanılmasının önerilebileceğini belirtmişlerdir. Ancak *B. thuringiensis* ssp. *japonensis* günümüzde ticari olarak üretilmemektedir. Üretilse bile her kontrol ajanının tek başına ve birlikte uygulanması halinde maliyetlerinin belirlenmesi, kullanılacak yöntemin ekonomik yönden de uygun olması gerekmektedir.

Bu çalışma kapsamında *C. elephas* larvalarına karşı plastik kavanozlar içerisinde test ettiğimiz nematod *H. bacteriophora* tek başına kullanıldığında %68 ölüm oranı meydana getirmiş ancak entomopatojen fungus *Metarhizium anisoplia* V275 + *H. bacteriophora* kombinasyonundan %96.6, *M. anisoplia* 4556 + *H. bacteriophora* kombinasyonundan ise %92.6 gibi oldukça yüksek ölüm oranları elde edilmiştir. Kombinasyon uygulamalarından elde edilen bu yüksek ölüm oranlarına rağmen nematod + fungus interaksyonu sinerjistik yerine aditif olmuştur ($\chi^2 < 3.84$). Çünkü entomopatojen funguslar *M. anisoplia* 4556 ve *M. anisoplia* V275 tek başlarına kullanıldığında sırasıyla %94 ve %86 gibi oldukça yüksek ölüm meydana getirmişlerdir. Çalışmada kullanılan fungus izolatları büyük saksılar içerisinde gömü yeri koşullarının benzeri oluşturularak yürütülen denemelerde de *C. elephas* larvalarına karşı %70 ila %83 arasında patojenite göstermişlerdir. Fungus uygulamalarında test edilen toprak üst katmanına fungus sporlarının tabaka şeklinde uygulanması (top dress) ile toprak içerisine fungusların karıştırılması (premix) şeklinde yapılan uygulamalar arasında istatistiki bir fark olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca denemelerin laboratuvar veya dış ortamda yürütülmesinin fungus aktivitelerini etkilemediği belirlenmiştir.

Curculio elephas larvalarına karşı oldukça yüksek patojenite gösteren *M. anisoplia* suşları test edilen diğer zararlı olan *Polyphylla fullo* larvalarına karşı hiçbir infektivite gösterememişlerdir. Manas larvalarına karşı etkili olduğu bilinen entomopatojen fungus *Beauveria brogniartii* ile yürütülen saksı denemelerinde ise *P. fullo* larvalarının özellikle nematod + fungus kombinasyon uygulamasında canlılık oranının düştüğü görülmüştür. *Beauveria brogniartii* + *H. bacteriophora* kombinasyonu sonucunda %79 larva ölümü ortaya çıkmıştır. Yapılan analizler

kombinasyon uygulaması sonucu ortaya çıkan etkileşimin sinerjistik olduğunu göstermiştir. Öte yandan *P. fullo*'nun 1. dönem larvalarının *B. brogniartii* enfeksiyonuna çok daha duyarlı oldukları, *B. brogniartii* tek başına kullanıldığında %90, *H. bacteriophora* ile kombine edildiğinde ise %100 larval ölümü meydana geldiği tespit edilmiştir. Kombinasyon uygulamasındaki etkileşim aditif olarak hesaplanmıştır.

Entomopatojen nematodlar ile fungusların birlikte kullanımı sonucunda sinerjistik etkileşimlerin elde edildiği rapor edilmiştir (Barbercheck ve Kaya, 1990; Choo vd., 2002). Kore'de yürütülen bir alan çalışmasında *Exomala orientalis* (Coleoptera: Scarabeidae) larvalarına karşı entomopatojen fungus *B. brogniartii*, entomopatojen nematodlar *H. bacteriophora* ve *S. carpocapsae* tek başlarına ve kombinasyonlar halinde kullanılmıştır. Kullanılan nematod türlerinin kombinasyon uygulamalarıyla tek başlarına kullanımları arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. Ancak nematod + fungus kombinasyonundan (*S. carpocapsae* + *B. brogniartii*) elde edilen larva ölüm oranının fungusun tek başına kullanımından önemli derecede daha fazla olduğu ve etkileşimin sinerjistik olduğu tespit edilmiştir (Choo vd., 2002). Bunun aksine yürütülen bir başka çalışmada ise *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae) larvalarına karşı entomopatojen fungus *B. bassiana* ile *S. carpocapsae* ve *Heterorhabditis indica* türüne ait nematodların kombinasyonları test edilmiş ve fungus-nematod etkileşiminin antagonistik olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada entomopatojen fungus *Paecilomyces fumosoroseus* ile *S. carpocapsae* ve *H. indica* arasındaki interaksiyonun da antagonistik olduğu belirtilmiştir (Shapiro-Ilan vd., 2004).

Entomopatojen nematod ve bakteri kombinasyonları sinerjikten antagonistiğe kadar değişebilen sonuçlar vermiştir. Bazı çalışmalarda sinerjistik etkileşimler gözlemlenirken (Thurston vd., 1993, 1994; Koppenhöfer ve Kaya, 1997; Koppenhöfer vd., 1999), bazı nematod + bakteri kombinasyonlarında ise antagonistik etkileşim gözlenmiştir (Shapiro-Ilan vd., 2004). Belçika'daki çim sahalarda ve otlak alanlarda zararlı olan *Hoplia philanthus*'a (Coleoptera: Scarabaeidae) karşı *H. bacteriophora*, *M. anisopliae* ve bir kimyasal insektisit olan Dursban tek başına ve kombinasyonlar halinde kullanılmıştır. Alan denemeleri sonucunda *H. bacteriophora* ve *M. anisopliae*'nin birlikte kullanımının sinerjistik etki gösterdiği bildirilmiştir (Ansari vd., 2006). Choo vd. (2002), Kore

Cumhuriyeti'ndeki golf sahalarını tehdit eden *Ectinohoplia rufipes* (Coleoptera: Scarabaeidae) ve *Exomala orientalis*'e (Coleoptera: Scarabaeidae) karşı EPN ve EPF kombinasyonunun etkilerini test etmiştir. Alan denemeleri iki farklı golf sahasında yapılmıştır. Uygulamalarda entomopatojen nematod olarak *S. carpocapsae* ve *S. glaseri*, entomopatojen fungus olarak *B. brogniartii* ve kimyasal insektisit olarak ta Fenitrothion kullanılmıştır. *S. glaseri*, *H. bacteriophora*, *B. brogniartii*, Fenitrothion tek tek ve *S. carpocapsae* + *H. bacteriophora*, *S. carpocapsae* + *B. brogniartii*'nin kombine uygulamaları denenmiştir. Elde edilen sonuçlar iki nematod türünün kombinasyonu ile larva ölüm oranlarında azalma olmadığını ancak *S. carpocapsae* + *B. brogniartii* kombinasyonunun aditif etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Yürütülen bir başka çalışmada ise 2. ve 3. dönem *Cyclocephala hirta* ile *C. pasadenae* ve 3. evre *Exomala orientalis* larvalarına karşı kombinasyon şeklinde kullanılan entomopatojen bakteri *Bacillus thuringiensis* subsp. *japonensis* ile *H. bacteriophora* ve *S. glaseri* nematodlarının sinerjistik veya aditif etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Koppenhöfer ve Kaya, 1997; Koppenhöfer vd., 1999).

Kombinasyon uygulamalarında görülen sinerjistikten antagonistğe kadar değişebilen bu farklı sonuçları açıklamak için birçok hipotez öne sürülmüştür. Ortaya çıkan farklı sonuçların nematod ile kombine edilen diğer patojenin türüyle (Koppenhöfer ve Kaya, 1997; Choo vd., 2002; Shapiro-Ilan vd., 2004), konukçunun türü ve evresiyle (Koppenhöfer vd., 1999), uygulama zamanıyla (Koppenhöfer ve Kaya, 1997), veya sıcaklık ve nem gibi çevresel faktörlerle nematodların mutualistik bakterileri arasındaki etkileşimlerden (Sankar vd., 2009) kaynaklanabileceği öne sürülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışmadan elde edilen veriler *C. elephas* larvalarıyla mücadelede kestane gömü yerlerine entomopatojen fungus *M. anisoplia* 4556 veya V275 suşlarının uygulanabileceğini ve bu mücadele yöntemiyle zararlı popülasyonunda %70 civarında bir azalma meydana gelebileceğini göstermiştir. *Polyphylla fullo* larvalarına karşı yapılacak mücadelede ise özellikle 1. dönem larvaların hedef alınmasını, bunlarla mücadelede ise entomopatojen fungus *B. brogniartii*'nin kullanılmasının doğru bir yaklaşım olacağını ortaya koymuştur.

6. KAYNAKLAR

- Abbott, W.S. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economical Entomology**, 18: 265-267.
- Acevedo, J.P.M., Samules, R.I., Machado, I.R., Dolinski, C. 2007. Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, 96: 187-192.
- Akhurst, R.J., Beddingr, A. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematode in soil. **Nematologica**, 21: 109-110.
- André, M.M., Raul A.L., Angela M., Eliane F.N., Octávio L.F. 2007. Screening and secretomic analysis of entomopathogenic *Beauveria bassiana* isolates in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 145: 333-338.
- Anonim, 2008a. Zirai Mücadele Teknik Talimatları, Cilt 4, Ankara.
- Anonim, 2008b. Zirai Mücadele Teknik Talimatları Cilt 5, Ankara.
- Ansari, M.A., Shah, F.A., Tirry, L., Moensa, M. 2006. Field trials against *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae) with a combination of an entomopathogenic nematode and the fungus *Metarhizium anisopliae* CLO 53. **Biological Control**, 39: 453-459.
- Ansari, M.A., Shah, F.A., Butt, T.M. 2008. Combined use of entomopathogenic nematodes and *Metarhizium anisopliae* as a new approach for black vine weevil, *Otiorynchus sulcatus*, control. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 129: 340-347.
- Ansari, M.A., Butt, T. M. 2012. Susceptibility of different developmental stages of large pine weevil *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae) to entomopathogenic fungi and effect of fungal infection to adult weevils by formulation and application methods. **Journal of Invertebrate Pathology**, 111: 33-40.
- Barberchek, M.E., Kaya, H.K. 1990. Interactions between *Beauveria bassiana* and the entomogenous nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis heliothidis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 55: 225-234.

- Brown, I.M., Gaugler, R. 1997. Temperature and humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematodes. **Nematologica**, 43: 363-375.
- Charnley, A.K., Leger, R.J. 1989. The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals, (Cole, G.T. and Kock, H.C., Eds) Plenum Press, pp. 267-286, New York.
- Charnley, A.K., Collins, S.A. 2007. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: Environmental and Microbial Relationships. The Mycota IV, 2nd ed., (Kubicek, C.P. and Druzhinina, I.S., Eds) Springer-Verlag, pp. 159-187, Berlin.
- Choo, H.Y., Koppenhöfer, A.M., Kaya, H.K. 1996. Combination of two entomopathogenic nematode species for suppression of an insect pest. **Journal of Economic Entomology**, 89: 97-103.
- Choo, H.Y., Kaya, H.K., Huh, J., Lee, D.W., Kim, H.H., Lee, S.M., Choo, Y.M. 2002. Entomopathogenic nematodes (*Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora*) and a fungus *Beauveria brongniartii* for biological control of the white grubs, *Ectinohoplia rufipes* and *Exomala orientalis*, in Korean golf courses. **BioControl**, 47: 177-192
- Crow, W.T. 2002. Using Nematodes to Control Insects: Overview and Frequently Asked Questions. University of Florida. Extension on Institute of Food and Agricultural Sciences, 1-6.
- Deacon, J.W. 2005. Fungal Biology, Blackwell Publishing, Oxford Uk, 4th edition, 371 pp.
- Demir, İ. 2008. Funguslar ve biyolojik mücadele. In: Entomopatojenler Ve Biyolojik Mücadele (Demirbağ, Z., Ed.), Esen Ofset Matbaacılık, pp. 175-244, Trabzon.
- Demir, S., Karagoz, M., Hazir, S., Kaya, H.K. 2014. Evaluation of entomopathogenic nematodes and their combined application against *Curculio elephas* and *Polyphylla fullo* larvae. **Journal of Pest Science**, s 10340-014-0571-9.
- Dolci, P., Guglielmo, F., Secchi, F., Ozino, O.I., 2006. Persistence and efficacy of *Beauveria brongniartii* strains applied as biocontrol agents against *Melolontha melolontha* in the Valley of Aosta (northwest Italy). **Journal of Applied Microbiology**, 100: 1063-1072.

- Duchaud, E., Rusniok, C., Franqeul, L., Buchrieser, C., Givaudan, A., Taourit, S., Bocs, S., Boursaux-Eude, C., Chandler, M., Charles, J. F., Dassa, E., Derosé, R., Derzelle, S., Freyssinet, G., Gaudriault, S., Medique, C., Lanois, A., Powell, K., Siquier, P., Vincent, R., Wingate, V., Zouine, M., Glaser, P., Boemare, N., Danchin, A., Kunst, F. 2003. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Nature Biotechnology**, 21(11): 1307-1313.
- Eidt, D.C., Thurston, G.S. 1995. Physical deterrents to infection by entomopathogenic nematodes in wireworm (Coleoptera: Elateridae) and other soil insects. **The Canadian Entomologist**, 127: 423-429.
- Eilenberg, J., Hajek, A., Lomer, C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **BioControl**, 46: 387-400.
- Eilenberg, J. 2006. Concepts and visions of biological control. In: An Ecological and Societal Approach to Biological Control, Eilenberg, J. and Hokkanen, H.M.T.. (Eds.), Springer, pp. 1-11, The Netherlands.
- Floate, K.D., Bérubé, J., Boiteau, G., Dosdall, L.M., van Frankenhuyzen, K., Gillespie, D.R., Moyer, Philip, H.G., Shamoun, S. 2002. Pesticides and biological control. In: Biological Control Programmes in Canada. (Mason, P.G. and Huber, J.T., Eds), CABI, pp. 4-14, Oxford.
- Gaugler, R., Boush, M.G. 1978. Effects of ultraviolet radiation and sunlight on the Entomogenous Nematode, *Neoplectana carpocapsae*. **Journal of invertebrate pathology**, 32: 291-296.
- Georgis, R. 1990. Formulation and application technology. In: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control (Gaugler R. and Kaya H. K. eds.), CRC Press, pp. 173-194, Boca Raton.
- Glaser, I. 2002. Survival biology. In: Entomopathogenic Nematology (Gaugler, R., Ed.). CABI Publishing, pp. 169-187, Wallingford, UK.
- Grewal, P.S., Richardson, P.N. 1993. Effects of application rates of *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) on control of the mushroom scarid fly *Lycoriella auripilla*. **Biocontrol, Science and Technology**, 3:29-40.
- Grewal, P.S., Selvan, S., Gaugler, R. 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment, and reproduction. **Journal of Thermal Biology**, 19: 245-253.

- Griffin, C.T., Boemare, N.E., Lewis, E.E. 2005. Biology and behaviour. In: Nematodes as Biocontrol Agents (Grewal P. S., Ehlers R-U. and Shapiro-Ian D. I., Eds.) CABI International, pp 47-64. Wallingford, UK.
- Gülcü, B. 2010. Biyolojik Mücadele Ajanı Entomopatojenik Nematodlar Üzerine Araştırmalar. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi (Basılmamış), Aydın.
- Gulcu, B., Hazir, S. 2012. An alternative storage method for entomopathogenic nematodes .**Turkish Journal of Zoology**, 36 (4): 562-565.
- Gungor, S.D., Keskin, N., Hazir, S. 2006. Ecological characterization of *Steinernema anatoliense* (Rhabditida: Steinernematidae). **Journal of Invertebrate Pathology**. 92: 39-44.
- Hajek, Ann E. 2004, Natural Enemies: An Introduction to Biological Contro. New York, 338p.
- Hall, R.A., Papierok, B. 1982. Fungi as biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance. **Parasitology**, 84: 205-240.
- Han, R.C., Ehlers, R.U. 2000. Pathogenicity, development, and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic *in vivo* conditions. **Journal of Invertebrate Pathology**, 75: 55-58.
- Hazir, S., Kaya, H., Stock, P. ,Keskin, N. 2003. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biocontrol of soil pests. **Turkish Journal of Biology**, 27:(4) 181-202.
- Hibbett, D.S., Ohman, A., Glotzer, D., Nuhn, M., Kirk, P., Nilsson, R.H. 2011 Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. **Fungal Biology Reviews**, 25: 38–47.
- Inglis, G.D., Goettel, M.S., Butt, T.M., Strasser, H. 2001. Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pests.In: Fungi as Biocontrol Agents, (Butt, M.T., Jackson, C., and Magan, N., Eds.), CABI, pp. 23-70, New York.
- Irigaray, F.J.S.C., Marco-Mancebon, V., Perez-Moreno, I. 2003. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and its compatibility with triflumuron: everts on the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. **Biol Control**, 26: 168-173.

- Karagöz, M., Gülcü, B., Çakmak, İ., Kaya, H., Hazır S., 2007. Predation of entomopathogenic nematodes by *Sancassania* sp. (Acari: Acaridae). **Experimental and Applied Acarology**, 43 (2): 85-95.
- Karagöz, M., Gülcü, B., Hazır, S., Kaya H., 2009. Laboratory evaluation of Turkish entomopathogenic nematodes for suppression of the chestnut pests, *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae) and *Cydia splendana* (Lepidoptera: Tortricidae). **Biocontrol Science and Technology**, 19: 755-768.
- Kaya, H.K. 1990. Soil ecology. In: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control, (Gaugler, R. and Kaya, H. K. Eds.), CRC Press pp. 93-115, Boca Raton.
- Kaya, H.K. 2002. Natural enemies and other antagonists. In: Entomopathogenic Nematology (Gaugler, R., Eds.), CABI Publishing, pp. 189-202, Wallingford, UK.
- Kaya, H.K., Gaugler, R. 1993. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, 38: 181–206.
- Kaya, H.K., Stock, S.P. 1997. Techniques in Insect Nematology. In: Manual of Techniques in Insect Pathology, (L. Lacey, Ed.), CA: Academic Press. pp. 281-324, San Diego.
- Klein, M. G. 1990. Efficacy against soil-inhabiting insect pests. In: Entomopathogenic nematodes in biological control, (Gaugler, R. and Kaya, H.K., Eds.), CRC Press, pp. 195–214, Boca Raton.
- Klingen, I., Haukeland, S. 2006. The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. In: An Ecological and Societal Approach to Biological Control, (Eilenberg, J. and Hokkanen, H.M.T., Eds.). Springer, pp. 145-212, The Netherlands.
- Koppenhöfer, A.M., Kaya, H.K. 1997. Additive and synergistic interaction between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* for Scarab grub control. **Biological Control**, 8(2): 131–137.
- Koppenhöfer, A.M., Choo, H.Y., Kaya, H.K., Lee, D.W., Gelernter, W.D. 1999. Increased field and greenhouse efficacy against scarab grubs with a combination of an entomopathogenic nematode and *Bacillus thuringiensis*. **Biological Control**, 14: 37–44.

- Koppenhöfer, A.M., Fuzy, E.M. 2003. Ecological characterization of *Steinernema scarabaei*: a natural pathogen of scarab larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, 83: 139-148.
- Koppenhöfer, A.M., Grewal, P.S., 2005. Compatibility and interactions with agrochemicals and other biocontrol agents. In: Nematodes as Biological Control Agents, (Grewal, P.S., Ehlers, R.U. and Shapiro-Ilan, D.I., Eds.), CABI Publishing, pp. 363–381, Wallingford, UK.
- Koppenhöfer, A.M., Grewal, P.S., Fuzy, E.M. 2006. Virulence of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis zealandica*, and *Steinernema scarabaei* against five white grub species (Coleoptera: Scarabaeidae) of economic importance in turfgrass in North America. **Biological Control**, 38: 397–404.
- Koppenhöfer, A.M. 2007. Nematodes. In: Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Lacey, L. A. and Kaya, H. K., Eds). Springer, pp. 249-264, Germany.
- Kryukov, V.Y., Khodyrev, V.P., Yaroslavtseva, O.N., Kamenova, A.S., Duisembekov, B.A., Glupov, V.V. 2009. Synergistic action of entomopathogenic hyphomycetes and the bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* in the infection of Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 45(5): 511-516.
- Kung, S.P., Gaugler, R., Kaya, H. K. 1990. Influence of soil pH and oxygen on persistence of *Steinernema* spp. **Journal of Nematology**, 22: 440-445.
- Kung, S.P., Gaugler, R., Kaya, H.K. 1991. Effects of soil temperature, moisture and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. **Journal of Invertebrate Pathology**, 57: 242-249.
- Kuske, S., Daniel, C., Wyss, E., Sarraquigne, J.P., Jermini, M., Conedera, M., Grunder, J.M. 2005. Biocontrol potential of entomopathogenic nematodes against nut and orchard pests. Insect pathogens and insect parasitic nematodes: *Melolontha*. **OIBC/OILB, West Palaearctic Regional Section (WPRS/SROP) Bull**, 28: 163-167.
- Leger, R.J., Charmley, A.K., Cooper, R.M. 1988. Production of polyphenol pigments and phenoloxidase by the entomopathogen, *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 53: 211-215.
- Lewis, E. E. 2002. Behavioural ecology. In: Entomopathogenic Nematology (Gaugler, R., Eds.), CABI Publishing, pp. 205-223, Wallingford, UK.

- Martens, E. C., Goodrich-Blair, H. 2005. The *Steinernema carpocapsae* intestinal vesicle contains a subcellular structure with which *Xenorhabdus nematophila* associates during colonization initiation. **Cellular Microbiology**, 7: 1723–1735.
- Osborne, L. S., Hoemler, K., Gerling, D. 1990. Prospects for biological control of *Bemisia tabaci*. **Bulletin WBCwprs**, 13:(5), 153-160.
- Önuçar, A., Ulu, O., 1989. İzmir ili çevresindeki kestane yetistirme alanlarında fauna tespiti ve meyvelerde kurtlanmaya neden olan zararlılar ile savasım olanakları üzerinde araştırmalar. [Faunistic survey studies in chestnut plantations and establishment of control measures against the infectious pest in nuts in İzmir]. **Doga Bilim Dergisi**, 13: 637-643.
- Parkman, J.P., Frank, J.H., Walker, T.J., Schuster, D.J. 1996. Classical biological of *Scapteriscus* spp. (Orthoptera: Gryllotalpidae) in Florida. **Biological Control**, 25:1415–1420.
- Paula, A.R., Carolino, A.T., Paula, C.O., Samuels, R.I. 2011. The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide Imidacloprid increases virulence against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasites & Vectors**, 4: 8.
- Pekrul, S., Gula, E.A. 1979. Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. **Journal of Invertebrates Pathology**, 34: 228-247.
- 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. **Annual Review of Entomology**, 51: 331–357.
- Sabah, A.F., Amani, S. K., Thoraia F.K., El-Nagar 2009. Combined effect of entomopathogenic nematodes and biopesticides to control the greasy cut worm, *Agrotis ipsilon* (Hufn.) in the strawberry fields. **Egyptian Academic Journal of biological Sciences**, 2 (1): 227- 236.
- Sabbour, M. 2011. Efficacy of entomopathogenic fungi alone or in combination with inorganic insecticides for protecting a broad bean against certain coleopteran stored products beetles in Egypt. **Global Journal Of Biodiversity Science And Management**, 3(2): 182-187.

- Sankar, M. 2009. Investigation of an indigenous entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis indica* Poinar, Karunakar and David (1992) as a potential biocontrol agent of insect pest in rice. PhD thesis, Osmania Univ., Hyderabad. pp: 168-79.
- Shapiro-Ilan, D. I., Mizell III, R. F., Cottrell, T. E., Horton, D. L. 2004. Measuring field efficacy of *Steinernema feltiae* and *Steinernema riobrave* for suppression of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*, larvae. **Biological Control**, 30: 496–503.
- Simoes, N., Rosa, J.S. 1996. Pathogenicity and host specificity of entomopathogenic nematodes. **Biocontrol Science and Technology**, 6: 403-411.
- SPSS, 1999. SPSS For Windows, Release 10.0.1, Chicago, IL: SPSS Inc.
- St. Leger, R.j., Wang, C. 2010. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 85: 901-907.
- Stock, S.P., Griffin, C. T., Chaerani, R. 2004. Morphological and molecular characterisation of *Steinernema hermaphroditum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Indonesia, and its phylogenetic relationships with other members of the genus. **Nematology**, 6: 401-412.
- Stock, S.P., Hunt, D.J. 2005. Morphology and systematics of nematodes used in biocontrol. In: Nematodes As Biocontrol Agents. (Grewal, P.S., Ehlers, R.-U., and Shapiro - Ilan, .I., Eds.), pp. 3-44, CABI, Cambridge.
- Townsend, C.R., Begon, M., Harper, J.L., 2010. Fundamentos em Ecologia. Editora Artmed, São Paulo.

- Thomas, M.B., Read, A.F. 2007. Can fungal biopesticides control malaria? **Nature Microbiology Reviews**, 5: 377-383.
- Thurston, G.S., Kaya, H.K., Burlando, T.M., Harrison, R. E. 1993. Milky disease bacterium as a stressor to increase susceptibility of scarabaeid larvae to an entomopathogenic nematode. **Journal of Invertebrate Pathology**, 61: 167-172.
- Thurston, G. S., Kaya, H. K., Gaugler, R. 1994. Characterizing the enhanced susceptibility of milky disease-infected scarabaeid grubs to entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, 4: 67-73.
- Tuncer, C., Serdar, U. (1996). Sinop ili kestane üretim alanlarındaki meyve kurtlanma oranları ve larvaların meyveyi terketme zamanının saptanması üzerinde araştırmalar. **O.M.U.Z.F Dergisi**, 11: 127-144.
- Van den Bosch, R., Messenger, P.S., Gutierrez, A. P. 1973. An Introduction To Biological Control. Plenum, New York.
- Van Driesche, R.G., Bellows Jr., T.S. 1996. Biological Control, An International Thomson Publishing, New York, 447p.
- Vinciguerra, M.T., Clausi, M. 2006. Biological control of chestnut insect pests by means of entomopathogenic nematodes. **Advances in Horticultural Science**, 20: 40-44.
- White, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from culture. **Science**, 66: 302-303.
- Zimmermann, G., 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*, **Biocontrol Science and Technology**, 17(5/6): 553-596.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Cem ASAN
Doğum Yeri ve Tarihi : Tekirdağ / 06,02,1989

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat
Fakültesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat
Fakültesi Biyoloji Bölümü
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

Katıldığı projeler

- Örtüaltı sebze yetiştiriciliğinde sorun olan kök-ur nematodları (*Meloidogyne* spp.)'na karşı alternatif mücadele olanaklarının araştırılması. Tübitak-1001 no.'lu proje (2013-2014)
- FEF-14012 no'lu Haziran Böceği, *Polyphylla fullo* (Coleoptera: Scarabaeidae) Larvaları İle Mücadelede Entomopatojen Nematodların (*Steinernematidae* ve *Heterorhabditidae*) ve Entomopatojen Fungusların Etkinliğinin Araştırılması adlı proje (2013-2014)
- Özel Çevre Koruma bölgesi olan Adana Akyatan kumsalındaki *Caretta caretta* ve *Chelonia mydas* deniz kaplumbağası populasyonlarının korunma ve araştırılma projesi (2010)

İLETİŞİM

E-posta Adresi : cemasan89@gmail.com