T.C.
Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü

ENTOMOPATOJENİK FUNGUSLARIN İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE ESANSİYEL YAĞLA KOMBİNASYONUNUN DEPO ZARARLISI *Tenebrio molitor* ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Cevdet Barış BEYAZGÜL

Yüksek Lisans Tezi

ENTOMOPATOJENİK FUNGUSLARIN İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE ESANSİYEL YAĞLA KOMBİNASYONUNUN DEPO ZARARLISI *Tenebrio molitor* ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Cevdet Barış BEYAZGÜL

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENTOMOPATOJENİK FUNGUSLARIN İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE ESANSİYEL YAĞLA KOMBİNASYONUNUN DEPO ZARARLISI *Tenebrio molitor* ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Cevdet Barış BEYAZGÜL
0009-0006-5164-0552

Prof. Dr. Aydın TÜRKEÇ
0000-0002-4191-0671
(Danışman)

Doç. Dr. Ardahan ESKİ
0000-0002-9621-2854
(2. Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BURSA – 2025
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Cevdet Barış BEYAZGÜL tarafından hazırlanan "YENİ ENTOMOPATOJENİK FUNGUSLARIN İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE ESANSİYEL YAĞLA KOMBİNASYONUNUN DEPO ZARARLISI *Tenebrio molitor* ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Aydın TÜRKEÇ

Başkan	**:**	Prof. Dr. Aydın TÜRKEÇ 0000-0002-4191-0671 Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	İmza
Üye	**:**	Doç. Dr. Dilek PİRİM 0000-0002-0522-9432 Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	İmza
Üye	**:**	Prof. Dr. Mete YILMAZ 0000-0002-0982-727X Bursa Teknik Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Biyomühendislik	İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali KARA
Enstitü Müdürü
../../….

B.U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

26/06/2025

Cevdet Barış BEYAZGÜL

TEZ YAYINLANMA
FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezin/raporun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma izni Bursa Uludağ Üniversitesi'ne aittir. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet hakları ile tezin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları tarafımıza ait olacaktır. Tezde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığını ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederiz.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**" kapsamında, yönerge tarafından belirtilen kısıtlamalar olmadığı takdirde tezin YÖK Ulusal Tez Merkezi / B.U.Ü. Kütüphanesi Açık Erişim Sistemi ve üye olunan diğer veri tabanlarının (Proquest veri tabanı gibi) erişimine açılması uygundur.

Danışman Adı-Soyadı Tarih	Öğrencinin Adı-Soyadı Tarih
Prof. Dr. Aydın TÜRKEÇ	**Cevdet Barış BEYAZGÜL**

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ TEZ TANITIMI
ÖĞRENCİ VE DANIŞMAN FORMU

FR 3.4.6_27

ÖĞRENCİ
Adı SOYADI : Cevdet Barış BEYAZGÜL
ÜNVANI : Lisansüstü Öğrenci
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ABD
E-POSTA: 502228008@ogr.uludag.edu.tr
PROGRAMI: YÜKSEK LİSANS
ORCID : 0009-0006-5164-0552
TÜBİTAK ID : TBTK-0098-0026
WOS RESEARCHER ID : NQF-4553-2025
SCOPUS AUTHOR ID :-
Google Scholar ID : ayuXZnIAAAAJ

DANIŞMAN
Adı SOYADI : Aydın TÜRKEÇ
ÜNVANI : Prof. Dr.
FEN EDEBİYAT FAKÜLTESİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ABD
E-POSTA: aturkec@uludag.edu.tr
YÖKSİS ARAŞTIRMACI ID : 58473
ORCID: 0000-0002-4191-0671
TÜBİTAK ID : TBTK-0011-8695
WOS RESEARCHER ID : AAH-6969-2021
SCOPUS AUTHOR ID :6507612732
Google Scholar ID : CNtcplAAAAAJ

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ YÜKSEK LİSANS EĞİTİMİ BOYUNCA BİLİMSEL ÇALIŞMALARI VE FAALİYETLERİ

1. **122Z317** numaralı ve "**Bal Arısından (*Apis Mellifera L.*) Biyoaktivite Rehberli Biyomolekül İzolasyonu ve Sirtuin Enzimleri Üzerindeki Düzenleyici Mekanizmalarının RNA Seq Yöntemi ile Araştırılması**" başlıklı TÜBİTAK-ARDEB 1001 projesi yüksek lisans bursiyeri

2. **3230623** numaralı ve "***Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (H-14) strain BTI-TURK26 İzolatının Endüstriyel Ölçekte Yerli Olarak Üretimi**" başlıklı TÜBİTAK-TEYDEB 1501 proje personeli

3. **7230757** numaralı ve "***Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*Bt*k) Yerli İzolatının Domates Güvesi (*Tuta absoluta*) Kontrolünde Kullanımının İncelenmesi, Geliştirilmesi ve Ticari Biyopestisit Ürün Haline Getirilmesi**" başlıklı TÜBİTAK-TEYDEB 1507 proje personeli

BİRLEŞMİŞ MİLLETLER SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ

☐	1 YOKSULLUĞA SON	
☒	2 AÇLIĞA SON	3.32.1364 Entomo-pathogenic Fungi 3.97.556 Microbial Biocontrol 6.263.898 Sustainable Agriculture
☒	3 SAĞLIKLI BİREYLER	3.198.926 Endophytic Fungi 1.148.931 Fungal Pathogenesis
☐	4 NİTELİKLİ EĞİTİM	
☐	5 CİNSİYET EŞİTLİĞİ	
☐	6 TEMİZ SU, HİJYEN VE HALK SAĞLIĞI	
☐	7 ERİŞİLEBİLİR VE TEMİZ ENERJİ	
☐	8 İNSANA YAKIŞIR İŞ VE EKONOMİK BÜYÜME	
☐	9 SANAYİ, İNNOVASYON VE ALTYAPI	
☐	10 EŞİTSİZLİKLERİN AZALTILMASI	
☐	11 SÜRDÜRÜLEBİLİR ŞEHİR VE YAŞAM ALANLARI	
☐	12 SORUMLU TÜKETİM VE ÜRETİM	
☐	13 İKLİM EYLEMİ	
☐	14 SUDAKİ YAŞAM	
☐	15 KARASAL YAŞAM	
☐	16 BARIŞ VE ADALET	
☐	17 HEDEFLER İÇİN ORTAKLIKLAR	

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ENTOMOPATOJENİK FUNGUSLARIN İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE ESANSİYEL YAĞLA KOMBİNASYONUNUN DEPO ZARARLISI *Tenebrio molitor* ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Cevdet Barış BEYAZGÜL

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Aydın TÜRKEÇ
İkinci Danışman: Doç. Dr. Ardahan ESKİ

Depolanmış tahıllarda yaygın olarak görülen *Tenebrio molitor* (sarı un kurdu) zararlısı, ciddi ekonomik kayıplara neden olan polifag bir türdür. Kimyasal pestisitlerin çevresel zararları, insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri ve direnç gelişimi gibi faktörler, biyolojik mücadele yöntemlerinin önemini artırmaktadır. Bu çalışmada, Bilecik ilinden alınan toprak örneklerinden toplam sekiz entomopatojenik fungus izole edilmiştir. Gerçekleştirilen tarama biyotestleri sonucunda, larvalara karşı en yüksek öldürücülük etkisi gösteren iki izolat CBF-2 ve CBF-7 olarak belirlenmiştir. Seçilen bu izolatlar üzerinde spor morfolojisi, koloni karakteristikleri ve mikroskobik analizlere ek olarak ITS ve EF1-α gen bölgelerinin dizilenmesiyle moleküler düzeyde de karakterizasyon yapılmış; CBF-2 ve CBF-7 izolatları, sırasıyla *Beauveria bassiana* ve *Metarhizium robertsii* olarak tanımlanmıştır. CBF-2 suşunun LC_{50} değeri $1,8 \times 10^6$ spor/mL, CBF-7 suşunun ise $1,6 \times 10^6$ spor/mL olarak hesaplanmıştır. Mikrodalga ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen *C. serpyllifolium* esansiyel yağının fumigant uygulamasında ise LC_{50} değeri 12,3 µL olarak hesaplanmıştır. CBF-2, CBF-7 ve esansiyel yağın kombinasyon halinde uygulanması sonucunda, yüksek mortalite oranına ulaşılmış ve kombinasyonların istatistiksel olarak sinerjik etki oluşturduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, entomopatojenik fungusların ve bitkisel esansiyel yağların depo zararlısı *T. molitor* ile mücadelede alternatif biyokontrol ajanları olarak kullanılabileceğini ortaya koymuş, seçilen CBF-2 ve CBF-7 izolatlarının *C. serpyllifolium* yağı ile kombinasyonu yüksek biyolojik aktivite göstermiştir. Elde edilen bulgular, entomopatojenik fungusların ve esansiyel yağların bireysel ve kombine kullanımının, depo zararlılarının kontrolünde çevre dostu, güvenilir, sürdürülebilir ve etkili bir zararlı kontrol stratejisi sunabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Entomopatojen, Biyokontrol, Esansiyel Yağ, Sinerjik Etki
2025, viii + 75 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI AND THEIR COMBINED EFFECTS WITH ESSENTIAL OILS ON THE STORAGE PEST *Tenebrio molitor*

Cevdet Barış BEYAZGÜL

Bursa Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Aydın TÜRKEÇ
Second Supervisor: Assoc. Prof. Ardahan ESKİ

Tenebrio molitor, commonly known as the yellow mealworm, is a polyphagous pest frequently found in stored grains and is responsible for significant economic losses. The environmental hazards of chemical pesticides, their adverse effects on human health, and the development of resistance have increased the importance of biological control strategies. In this study, a total of eight entomopathogenic fungal isolates were obtained from soil samples collected in the province of Bilecik. Based on preliminary screening bioassays, two isolates CBF-2 and CBF-7 exhibited the highest larvicidal activity. These selected isolates were further characterized by spore morphology, colony characteristics, and microscopic examinations. Molecular identification was performed through sequencing of the ITS and EF1-α gene regions. As a result, isolates CBF-2 and CBF-7 were identified as *Beauveria bassiana* and *Metarhizium robertsii*, respectively. The LC_{50} values were calculated as 1.8×10^6 spor/mL for CBF-2 and 1.6×10^6 spor/mL for CBF-7. In fumigant applications using the essential oil of *Clinopodium serpyllifolium* extracted via the microwave-assisted extraction method, the LC_{50} value was determined to be 12.3 µL. The combined application of CBF-2, CBF-7, and the essential oil resulted in high mortality rates, and statistical analyses confirmed that the combinations exerted a synergistic effect. The findings of this study demonstrate that entomopathogenic fungi and plant-derived essential oils can serve as alternative biocontrol agents against the storage pest *T. molitor*. Notably, the combination of the selected CBF-2 and CBF-7 isolates with *C. serpyllifolium* oil exhibited strong biological activity. These results suggest that the individual and combined use of entomopathogenic fungi and essential oils offers an environmentally friendly, safe, sustainable, and effective pest management strategy for controlling storage pests.

Key words: Entomopathogen, Biocontrol, Essential Oil, Synergistic Effect
2025, viii + 75 pages.

TEŞEKKÜR

Lisans ve lisansüstü eğitimlerim süresince desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesi ile akademik hayatıma ışık tutan ve akademik gelişimimde büyük katkıları olan hocam Sayın; Prof. Dr. Aydın TÜRKEÇ'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında beni yönlendiren, laboratuvar çalışmalarımla yakından ilgilenen, her türlü desteği ve imkanı sağlayarak çalışmalarımın tamamlanmasını sağlayan hocam Sayın; Doç. Dr. Ardahan ESKİ'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte çalışmalarıma destek sağlayan, kurulan iletişimlerde bana referans olarak karşılıklı ilişkilerde güven ortamının oluşmasını sağlayan ve bu çalışmanın gerçekleşmesine önemli katkıları olan Sayın; Prof. Dr. Nabi Alper KUMRAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Beni bir bilim insanı olarak yetiştiren, bulunduğum konuma ulaşmamdaki en büyük desteği sağlayan, en zor günlerimde dahi en büyük destekçim olan canım aileme teşekkürlerimi sunarım.

26/06/2025

Cevdet Barış BEYAZGÜL

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....i
ABSTRACT.....ii
TEŞEKKÜR.....iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....viii
1. GİRİŞ…..... 1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI.....6
2.1. Tenebrio molitor.....6
2.2. Zararlılarla Mücadele.....8
2.3. Entomopatojenik Funguslar.....11
2.3.1. Entomopatojenik Fungusların Etki Mekanizması.....15
2.4. Esansiyel Yağlar.....18
2.4.1. Bitki Kaynaklı Esansiyel Yağların Etki Mekanizmaları.....20
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....23
3.1. Entomopatojenik Fungusların Topraktan İzolasyonu ve Saflaştırılması.....23
3.1.1.Toprak Örneklerinin Toplanması.....23
3.1.2. Toprak Örneklerinden Entomopatojenik Fungus İzolasyonu.....23
3.2. Entomopatojenik Fungusların Makroskobik ve Mikroskobik Düzeyde Morfoloji Analizleri….....24
3.3. Entomopatojenik Fungusların Moleküler Karakterizasyonu ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması.....25
3.3.1. DNA İzolasyonu.....25
3.3.2. İlgili Gen Bölgelerin PCR ile Çoğaltılması.....26
3.3.3. Klonlama ve Sekanslama.....28
3.3.4. Dizi Analizleri.....29
3.4. *Clinopodium serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* Bitkisinden Mikrodalga Ekstraksiyonu Yöntemi ile Esansiyel Yağın Elde Edilmesi.....30
3.5. *Tenebrio molitor* Üzerinde Entomopatojenik Fungusların Biyotestleri.....30
3.5.1. *Tenebrio molitor*'un Laboratuvar Koşulları Altında Üretimi.....30
3.5.2. Spor Süspansiyonlarının Hazırlanması.....30
3.5.3. Patojenite Testleri.....31
3.5.4. Konsantrasyon Denemeleri.....31
3.6. Nişoş Esansiyel Yağının *Tenebrio molitor* Üzerindeki Fümigant Etkisinin Analizi…….....32
3.7. Entomopatojenik Fungusların ve *Clinopodium serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* Esansiyel Yağının Birlikte Biyolojik Etkinlikleri.....32
4. BULGULAR.....34
4.1. Entomopatojenik Fungusların Topraktan İzolasyonu ve Saflaştırılması.....34
4.2. Patojenite Tarama Testleri.....35
4.3. Seçilen İzolatların Mikroskobik ve Moleküler Karakterizasyonu.....36
4.4. Konsantrasyon-Etki Denemeleri.....42
4.5. *Clinopodium serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* Esansiyel Yağının Etkisi.....44
4.6. Kombine Uygulamaların Etkinliği.....45
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....48
KAYNAKLAR.....58

EKLER……71
EK 1 – DİZİLENEN GEN BÖLGELERİ 72
ÖZGEÇMİŞ. 75

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
g	Gram
µm	Mikrometre
ppm	Milyonda bir
CFU	Koloni Oluşturan Birim
LC_{50}	%50 Lethal Concentration (Öldürücü Konsantrasyon)
PDA	Patates Dekstroz Agar
rpm	Dakikadaki devir sayısı (revolutions per minute)
pH	Asidik/bazik seviye
min	Dakika
h	Saat
d	Gün
v/v	Hacim/hacim oranı
w/v	Ağırlık/hacim oranı

Kısaltmalar	Açıklama
EPF	Entomopatojenik Fungus
ITS	Internal Transcribed Spacer (iç bölge transkriptörü – genetik belirteç)
EF1-α	Elongation Factor 1-alpha (uzama faktörü 1-alfa geni)
LC_{50}	Lethal Concentration 50 (yarı ölümcül konsantrasyon)
PDA	Patates Dekstroz Agar
UV	Ultraviyole
DNA	Deoksiribonükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
bp	Base Pair (baz çifti)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
FAO	Food and Agriculture Organization
WHO	World Health Organization

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	*Tenebrio molitor*'un yaşam döngüsü……..	7
Şekil 2.2.	Entomopatojenik funguslar tarafından konak böcekte enfeksiyon ve sporulasyon döngüsü ……...	13
Şekil 2.3.	Farklı entomopatojenik fungusların konak böcek üzerindeki etkileri. ……...…….	14
Şekil 2.4.	Entomopatojen fungusun enfeksiyon şeması ..……	15
Şekil 2.5.	Mannino vd. (2019) tarafından önerilen alternatif enfeksiyon yolları …….…….....	18
Şekil 2.6.	Bitkisel kaynaklı esansiyel yağların böcek üzerinde etki mekanizmaları…….	21
Şekil 3.1.	Fungal örneklerin agar blok yöntemi ile mikroskobik incelenmesi …….…….……...	25
Şekil 3.2.	ITS1-5.8S-ITS2 bölgesini çoğaltmak için kullanılan primerlerin pozisyonları…….	26
Şekil 4.1.	İzole edilen tüm suşlarının petri morfolojileri……	34
Şekil 4.2.	İzole edilen tüm suşların, enfeksiyon sonrası *T. molitor* larvalarında gözlemlenen morfolojik belirtiler. ……..…	35
Şekil 4.3.	10^7 spor/ml konsantrasyonunda entomopatojenik fungal izolatların *T. molitor* larvaları üzerindeki etkisi……..…….	36
Şekil 4.4.	Seçilen entomopatojenik fungusların mikroskobik yapıları ve sporları……...	37
Şekil 4.5.	rRNA ITS1-5.8S-ITS2 bölgesinin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen ürünlerin %1'lik agaroz jeldeki bant profilleri……...	38
Şekil 4.6.	EF1-α bölgesinin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen ürünlerin %1'lik agaroz jeldeki bant profilleri……	39
Şekil 4.7.	İzolatların ITS gen bölgesinin Neighbor-Joining analizi ile filogenetik ağacı……...	40
Şekil 4.8.	İzolatların EF1-α gen bölgesinin Neighbor-Joining analizi ile filogenetik ağacı……..	41
Şekil 4.9.	*T. molitor* larvalarının, CBF-2'nin beş farklı konsantrasyonuna 10 gün maruz bırakılmasının Kaplan-Meier sağkalım eğrileri….	42
Şekil 4.10.	*T. molitor* larvalarının, CBF-7'nin beş farklı konsantrasyonuna 10 gün maruz bırakılmasının Kaplan-Meier sağkalım eğrileri.…	43
Şekil 4.11.	*T. molitor* larvalarının, *C. serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* esansiyel yağının beş farklı konsantrasyonuna 96 saat maruz bırakılmasının Kaplan-Meier sağkalım eğrileri……...	44
Şekil 4.12.	CBF-2 izolatı ile *Clinopodium serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* esansiyel yağının farklı konsantrasyonlarda 10 gün birlikte uygulanmasının *T. molitor* larvalarında gözlemlenen Kaplan-Meier sağkalım eğrileri…….	45
Şekil 4.13.	CBF-7 izolatı ile *Clinopodium serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* esansiyel yağının farklı konsantrasyonlarda 10 gün birlikte uygulanmasının *T. molitor* larvalarında gözlemlenen Kaplan-Meier sağkalım eğrileri…….	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 2.1.	Yaygın olarak kullanılan biyokontrol ajan grupları…….....	10
Çizelge 3.1.	Kullanılan primerler ve özellikleri…….....	27
Çizelge 3.2.	Uygulanan PCR koşulları…….…….....	27
Çizelge 3.3.	Sinerjik etki denemelerinde kullanılan konsantrasyonlar ve uygulamalar.……...……..……	32
Çizelge 4.1.	CBF-2 ve CBF-7 izolatlarının (spor/ml) ve *C. serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* esansiyel yağının (µl) LC_{50} ve LC_{95} değerleri……..……	47

1. GİRİŞ

İnsan nüfusunun hızla artması, gıda güvenliği konusunu küresel ölçekte önemli bir mesele haline getirmektedir. Günümüzde dünya nüfusu yaklaşık 8,1 milyar olup, bu sayının 2030'da 8,6 milyara, 2050'de ise 9,8 milyara ulaşması öngörülmektedir (United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division [UN DESA], 2017). Bu bağlamda, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), küresel gıda üretiminin 2050 yılına kadar %70 oranında artırılmaması durumunda ciddi bir gıda kıtlığı yaşanabileceği konusunda uyarıda bulunmaktadır (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2009). Bu tahminler, tarımsal üretimin sürdürülebilirliğini sağlamak ve artan nüfusun besin ihtiyacını karşılamak için tarım sektöründe verimliliği artırmaya yönelik politikaların ve stratejilerin önemini vurgulamaktadır.

Tahıllar, dünya genelinde en fazla tüketilen besin gruplarından biri olup, insan beslenmesinde temel bir role sahiptir (Allai vd., 2022; Canay vd., 2022; Ferreira vd., 2022). Yüksek kalori içeriği nedeniyle gıda güvenliği açısından kritik bir konumda bulunan tahıllar, özellikle nüfus artışıyla birlikte daha da büyük bir öneme sahip olmaktadır (Mir vd., 2020). Türkiye'de de tahıl üretimi, bitkisel üretim içinde en yüksek paya sahiptir. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre, 2024 yılı itibarıyla toplam tahıl üretimi 39 milyon ton olarak kaydedilmiş olup, bunun 20,8 milyon tonu buğday, 8,1 milyon tonu arpa, 257 bin tonu çavdar, 390 bin tonu yulaf ve 8,1 milyon tonu mısırdan oluşmaktadır (Türkiye İstatistik Kurumu [TÜİK], 2024).

Tahıl üretiminin sürdürülebilirliği, yalnızca üretim miktarıyla sınırlı kalmayıp, uygun depolama koşullarının sağlanmasını da gerektirmektedir. Tahıllar, genellikle uzun süre saklandıktan sonra tüketilmekte (Mir vd., 2023) ve üretilen tahılların %70'ten fazlası, özellikle kırsal kesimde geleneksel yöntemlerle (toprak kaplar, silolar, çuvallar, çelik variller ve sepetler vb.) saklanmaktadır (Mobolade vd., 2019). Küresel ölçekte uzun süreli tahıl depolama süreçlerinde, mikroorganizmalar ve böcekler gibi biyolojik etmenlerin ciddi zararlar oluşturduğu bilinmektedir (Kumar ve Kalita, 2017). Özellikle böcek istilası, tahılların hem miktar hem de besin değerinde kayıplara neden olarak gıda güvenliğini tehdit etmektedir.

Bu durum gelişmekte olan ülkelerde daha büyük bir sorun teşkil etmekte olup, böcek zararlıları tüm biyotik faktörler arasında en önemli kayıp sebebi olarak kabul edildiği ve bu ülkelerde tahıl kayıplarının %30 ila %40 arasında değiştiği bildirilmiştir (Abass vd., 2014). Bu kayıplar ağırlık kaybı, estetik ve besin değerinde azalma gibi niceliksel ve niteliksel etkilere sebep olmaktadır (Mesterhazy vd., 2020; Begemann vd., 2021). Yapılan çeşitli araştırmalarda, depolama sürecinde meydana gelen bu kayıpların oldukça yüksek seviyelere ulaşabildiği gösterilmiştir (Aulakh vd., 2013; Buzby vd., 2014; Majumder vd., 2016).

Böcekler, bir milyondan fazla belgelenmiş türüyle oldukça çeşitli bir hayvan grubunu oluşturmaktadır (Sharma vd.,2023). Bunların çoğu insanlar için faydalı olsa da bir kısmı tarımsal üretimi, sağlığı ve insan refahını olumsuz etkileyerek zarar vermektedir. Herbivor böcekler, dünya çapındaki tarımsal üretime verilen zararın %18'inden sorumludur (Jankielsohn, 2018). Böcek zararlıları, dünya çapında pirinç, buğday, arpa ve mısır gibi temel tahıllara büyük zararlar vermektedir (Banga vd., 2018). Ayrıca, böcek istilası tohumların çimlenme yeteneğini düşürerek ekonomik değer kaybına neden olmakta ve tahılların fizikokimyasal özelliklerinde olumsuz değişikliklere yol açmaktadır. Bu değişiklikler arasında serbest yağ asitlerinin artışı, nem seviyesinin yükselmesi, protein miktarının azalması ve pH değerindeki düşüş yer almaktadır (Paul et al., 2020).

Böcekler, doğrudan tanecikleri tüketme veya derilerini dökme (exuviae), ağ örme (webbing) ve ölü böcek kalıntılarının birikmesi gibi yollarla tahıllara büyük zarar vermektedir (Singh vd., 2021). Depolama sırasında en yaygın görülen zararlı böcekler arasında; sarı un kurdu *(Tenebrio molitor* (Linnaeus)) (Coleoptera: Tenebrionidae), kırmızı un böceği (*Tribolium castaneum* (Herbst)) (Coleoptera: Tenebrionidae), hububat hortumlu böceği (*Rhyzopertha dominica* (Fabricius)) (Coleoptera: Bostrichidae), hint un güvesi (*Plodia interpunctella* (Hubner)) (Lepidoptera: Pyralidae), pirinç hortumlu böceği (*Sitophilus oryzae* (Linnaeus)) (Coleoptera: Curculionidae) ve tahıl güvesi (*Sitotroga cerealella* (Olivier)) (Lepidoptera: Gelechiidae) gibi böcekler yer almaktadır (Mir vd., 2023).

Bu zararlılar arasında sarı un kurdu böceği, *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae), tahıllar, un, kepek ve makarna gibi depolanmış gıda ürünlerine zarar

veren polifag bir böcektir. Ayrıca, *Zea mays* (L.) (Poales: Poaceae), *Triticum aestivum* (L.) (Poales: Poaceae) ve *Glycine max* (L.) (Fabales: Fabaceae) gibi tahılları da istila edebilmektedir (Plata-Rueda vd., 2017). Bu zararlı, yalnızca doğrudan ürünü tüketmekle kalmayıp, aynı zamanda ölü böcek parçaları ve dışkıları ile besinleri kirleterek ticari değerinin düşmesine de yol açmaktadır (Plata-Rueda vd., 2017). *T. molitor*, dünya genelinde tahıl ve un üretiminde %15'e varan kayıplara neden olmaktadır (Neethirajan vd., 2007).

Depolama sırasında tahıl kalitesinin korunması büyük önem arz etmektedir. Bu nedenle, böcek istilasının kontrol altına alınması, tahıl endüstrisinde meydana gelen kayıpların önlenmesi için temel bir gereklilik olarak görülmektedir. Çeşitli yöntemler, depolanan tahıllarda böcek istilasının kontrolü amacıyla araştırılmış olup bu konuya yönelik çalışmalar devam etmektedir (Moirangthem ve Baik, 2021). Günümüzde araştırmacılar ve ticari kuruluşlar, böcek kontrolü için uygun maliyetli, etkin, verimli ve gıda tahıllarının kalitesine minimum etki eden yeni yöntemlerin geliştirilmesi yolunda çalışmalar yürütmektedirler (Mir vd., 2023).

Bu tür tarım zararlıların yönetimi, büyük zaman ve emek gerektiren bir süreçtir. Her yıl, dünya çapında bakterisitler, fungisitler, herbisitler ve insektisitler gibi iki milyar tondan fazla pestisitin kullanılması, zararlı kontrolünde kimyasal mücadelenin yaygınlığını göstermektedir (Baron vd., 2019). Geleneksel mücadele yöntemleri, organofosfatlar, sinerjize piretrinler ve piretroid bileşikleri gibi kimyasal insektisitlerin kullanımına dayanmaktadır (Athanassiou vd., 2015). Tahıl endüstrilerinde depolama yapılan yapılarda böcek istilasını kontrol etmek amacıyla genellikle alüminyum fosfid ve metil bromür gibi fumigantlara başvurulmaktadır (Arora vd., 2021). Bununla birlikte, sentetik pestisitlerin kullanımı, zararlılara karşı mücadelede etkin olmasının yanı sıra su kaynaklarını ve toprağı kirletme, ozon tabakasını tahrip etme, gıda maddelerinde kalıntı bırakma ve uzun vadede böceklerin direnç geliştirmesi gibi pek çok soruna yol açmaktadır (Sakka vd., 2021; Sharma vd., 2023). Ayrıca, geniş spektrumlu insektisitlerin kullanımı, tarım zararlılarının doğal yırtıcıları gibi hedef dışı ve faydalı böcekleri de olumsuz etkileyerek ekolojik dengeyi bozabilmektedir (Sandhu vd., 2012; Sinha vd., 2016). Bu nedenlerden ötürü, bilim insanları daha güvenli ve çevre dostu kontrol teknikleri geliştirmeye odaklanmaktadır.

Bu doğrultuda kimyasal mücadeleye alternatif olarak yırtıcılar, parazitoitler veya patojenler kullanılarak uygulanan biyolojik mücadele, en başarılı kontrol stratejilerden biri olarak kabul görmektedir (Sharma vd., 2023). Böcek patojenleri (entomopatojenler), böcekleri enfekte edip sonunda öldüren virüsler, bakteriler, funguslar, protistler veya nematodlar gibi mikrobiyal biyokontrol ajanlarından oluşmaktadır (Silva vd., 2020). Entomopatojenik funguslar, böcekleri enfekte etmek için bakteriler ve virüslerden farklı bir mekanizma kullanmaktadır. Fungus sporları böceğin kitikulasına tutunarak çimlenir ve doğrudan vücut boşluğuna girerek böceği enfekte etmektedir (Mannino vd., 2019; Mantzoukas vd., 2022). Sarı un kurdu (*Tenebrio molitor* L.), entomopatojenik funguslar ve konak etkileşimleri üzerine yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir böcek türü olarak öne çıkmaktadır (Rodríguez-Gómez vd., 2009). *T. molitor* üzerinde fungusların başarılı bir şekilde kullanıldığı pek çok çalışma bulunmaktadır (Adatia vd., 2010; Maistrou vd., 2018; Altahawi vd., 2020).

Kimyasal mücadeleye alternatif bir diğer yöntem ise bitkisel esansiyel yağların kullanımına dayanmaktadır. Bitkisel esansiyel yağlar, insanlar için düşük toksisiteye sahip olmaları, hızlı bozunmaları ve çevresel etkilerinin düşük olması gibi nedenlerden dolayı ekotoksikolojik açıdan avantajlı özelliklere sahiptir ve zararlı yönetimi için uygun alternatiflerdir (Chermenskaya vd., 2010; Zanuncio vd., 2016). Bu esansiyel yağlar, bitkilerin ikincil metabolitleri olmakla birlikte alkaloidler, amidler, kalkonlar, flavonlar, kawapironlar, lignanlar, neolignanlar veya fenoller gibi bileşenler içermektedir ve bu bileşenler, böcek-bitki ilişkilerinde önemli roller üstlenmektedirler (Parmar vd., 1997; Isman, 2000; Martínez vd., 2015). Bitkisel esansiyel yağlar, böcekler üzerinde itici etki (repellent), yumurta bırakmayı ve beslenmeyi engelleme (deterrent), büyüme düzenleyici ve toksik etkiler göstererek böcek mücadelesinde alternatif bir yöntem sunmaktadır (Plata-Rueda vd., 2017). Depolanmış tahıllardaki zararlıları kontrol etmek için bitkisel esansiyel yağların kullanımına dair çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Zapata ve Smagghe, 2010; Stefanazzi vd., 2011; Jemâa vd., 2012).

Bu çalışmada, depolanmış tahıllarda önemli ekonomik kayıplara neden olan *Tenebrio molitor* (sarı un kurdu) zararlısına karşı biyolojik mücadele potansiyeli taşıyan entomopatojenik funguslar ile bitkisel kaynaklı esansiyel yağların bireysel ve kombinasyon halinde etkinlikleri araştırılmıştır. Bu amaçla, Bilecik ilinden toplanan

toprak örneklerinden entomopatojenik funguslar izole edilmiş, morfolojik ve moleküler yöntemlerle tanımlamaları yapılmıştır. İzolatların biyolojik etkinlikleri, laboratuvar koşullarında yetiştirilen *T. molitor* larvaları üzerinde farklı spor konsantrasyonlarında yürütülen biyotestlerle değerlendirilmiştir. Aynı zamanda, *Clinopodium serpyllifolium subsp. serpyllifolium* bitkisinden mikrodalga ekstraksiyonu yöntemiyle elde edilen esansiyel yağın fumigant etkisi belirlenmiş ve söz konusu esansiyel yağ ile en etkili fungus izolatlarının birlikte kullanımı sonucunda oluşan sinerjik, antogonistik veya additif etkiler istatistiksel analizlerle ortaya konmuştur. Böylece, çevre dostu ve alternatif zararlı yönetim stratejileri kapsamında, biyolojik etmenlerin tek başına ve birlikte kullanım potansiyelleri değerlendirilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

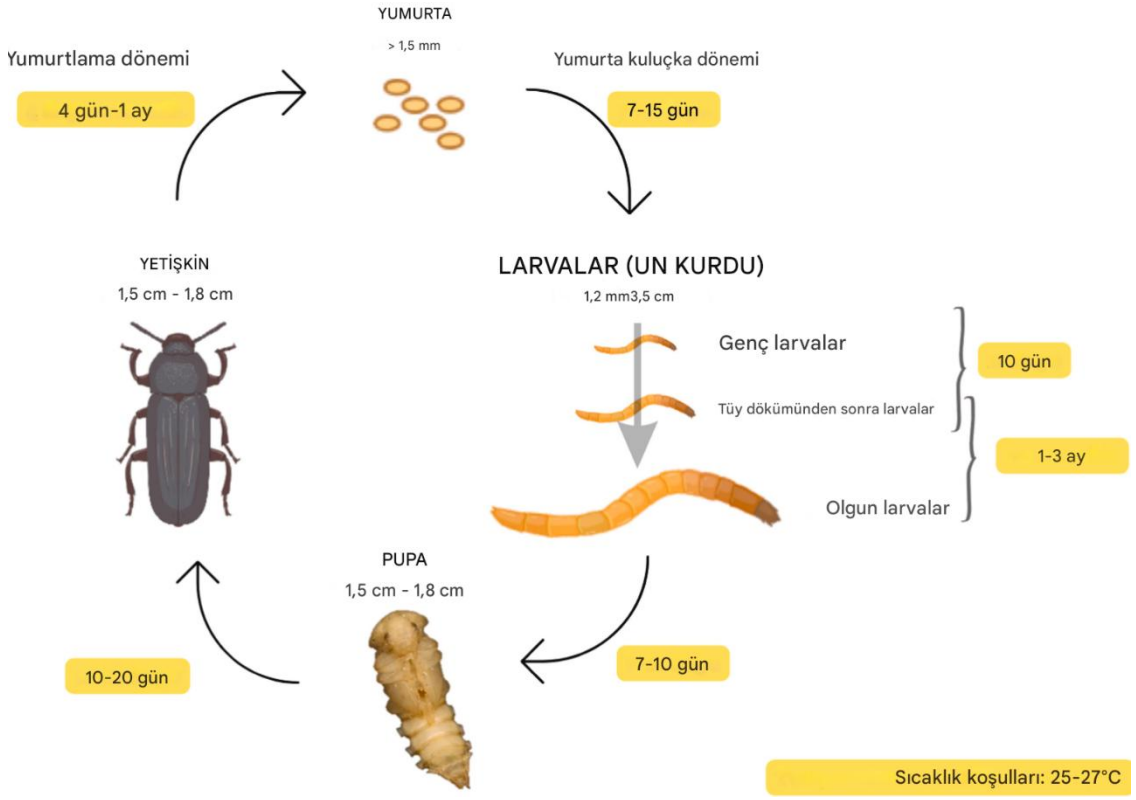
2.1. Tenebrio molitor

Tenebrionidae familyası, Coleoptera takımının en büyük familyalarından biridir ve dünya genelinde yaklaşık 30.000 tür içermektedir (Bouchard vd., 2021). Günümüzde Tenebrionidae türleri çeşitli habitatlarda bulunabilmektedir ancak bu familyanın üyeleri özellikle çöl ve kuru iklimlerde bol miktarda görülmektedir (Ragionieri vd., 2023). Bu familyanın önemli temsilcilerinden biri *Tenebrio molitor* (L.), un kurdudur. *T. molitor* ergin formunun parlak siyah bir vücuda sahip olmasıyla birlikte, yan tarafları paralel olan elytra (ön kanatlar) taşımakta ve clypeus, frons, pronotum bölgeleri üzerinde noktalı bir yapıya sahiptir (Adamaki-Sotiraki vd., 2024). Toraks ince noktalıdır ve ön kanatlar boyuna çizgili veya olukludur (Adamaki-Sotiraki vd., 2024). *T. molitor* erginleri, 14 mm'yi aşan büyük boyutları ve 100 mg'ı aşan ağırlıkları ile diğer tenebrionidlerden kolayca ayırt edilebilmektedir (Robinson, 2005).

Yeni çıkan erginler başlangıçta beyaz renkte olup, yumuşak bir dış iskelete sahiptir ve zamanla koyulaşarak sert bir kitikül oluşturmaktadır (Ribeiro vd., 2018). *T. molitor*'da cinsiyet ayrımı gözlemlenmiştir ve erkeklerin ön tibia kemiğinin ventral açısı küçük bir çıkıntı oluştururken, dişilerde bu açı yuvarlaktır (Bosquet, 1990). *T. molitor* yumurtaları ise, üzerlerine un ve diğer parçacıkların yapışmasına neden olan yapışkan bir salgı ile kaplıdır (Capinera, 2008). Larvalar elateriform yapıdadır, 25–30 mm uzunluğundadır, açık sarı renktedir ve erginlere kıyasla daha az sertleşmiş bir vücut yapısına sahiptir (Capinera, 2008). Pupa evresi hareketsizdir ve krem-beyaz renktedir (Adamaki-Sotiraki vd., 2024).

T. molitor tam başkalaşım (holometabolik gelişim) göstermekte ve gelişimi sırasında birçok değişim geçirmektedir (Şekil 2.1) (Adamaki-Sotiraki vd., 2024). Larvalar, yumurtadan çıkmasının ardından büyümelerine uyum sağlamak amacıyla dış iskeletlerini dökerek bir dizi ekdizis (deri değişimi) gerçekleştirmektedir (Adamaki-Sotiraki vd., 2024). Pupasyon sürecinde ise koruyucu bir koza oluşmaktadır (Vommaro vd., 2024). Pupadan çıkan erginlerin tamamen gelişmiş olmalarına rağmen, cinsel olgunluğa ulaşmaları için tamamen siyah renge dönüşmeleri gerekmektedir (Morales-Ramos vd., 2012). Çiftleşmenin ardından dişiler yumurtalarını tek tek veya küçük gruplar halinde bırakmaktadırlar (Adamaki-Sotiraki vd., 2024). Yumurtalar, beslenme substratı

içerisinde veya böceklerin yaşadığı kapların yüzeylerine yapışık halde bulunabilmektedir (Ribeiro ve ark., 2018). Optimum koşullarda, dişiler haftada 30 ila 100 arasında veya günde 10 ila 13 yumurta bırakabilmektedir (Adamaki-Sotiraki vd., 2023a, b; Morales-Ramos vd., 2012). En yüksek yumurtlama oranının çiftleşmeden sonraki ilk haftalarda gerçekleştiği ve yaşlanma ile birlikte üretilen yumurta sayısının azaldığı düşünülmektedir (Berggreen vd., 2018; Morales-Ramos vd., 2012). Kuluçka süresi, 26–30,8°C sıcaklıkta 4 ila 12 gün arasında değişmektedir (Adamaki-Sotiraki ve ark., 2022b). Ancak, daha düşük sıcaklıklarda kuluçka süresi 34 güne kadar uzayabilmektedir (Kim vd., 2015). *T. molitor* larvalarının yumurtadan çıkma oranı oldukça yüksektir ve %65 ila %80 arasında değişmektedir (Adamaki-Sotiraki vd., 2022a).



Şekil 2.1 *Tenebrio molitor*'un yaşam döngüsü (Zunzunegui vd., 2024'ten değiştirilerek alınmıştır).

Bazı çalışmalar, *T. molitor* erginlerinin kendi yumurtalarını yeme eğiliminde olduğunu ve böylece popülasyon dengesini sağladığını bildirmektedir (Berggreen vd., 2018; Halliday vd., 2015). Son araştırmalar, larva evresinin süresinin, larva ağırlığının ve hayatta kalma oranının beslenme substratının kalitesine ve miktarına bağlı olarak önemli ölçüde değiştiğini göstermektedir (Harsányi vd., 2020; Bordiean vd., 2022; Rumbos vd., 2022). Ayrıca, beslenme substratının ergin bireylerin doğurganlığını da etkilediği rapor edilmiştir (Rumbos vd., 2020; Andreadis vd., 2021).

Tenebrio molitor L. (Coleoptera: Tenebrionidae) türü, yaygın olarak un kurdu olarak bilinmektedir ve depolanmış ürün zararlısı olarak kabul edilmektedir (Adamaki-Sotiraki vd., 2024). Düşük nem içeriğine sahip tahıllar ve nişastalı substratlara belirgin bir eğilim göstererek birçok dayanıklı tarımsal ürünü istila ettiği tespit edilmiştir (Hagstrum vd., 2013). Bu böcek ayrıca kırılmış *Zea mays* (L.) (Poales: Poaceae), *Triticum aestivum* (L.) (Poales: Poaceae) ve *Glycine max* (L.) (Fabales: Fabaceae) tanelerini de istila edebilmektedir (Punzo ve Mutchmor, 1980; Fazolin vd., 2007; Cosimi vd., 2009). *T. molitor'un* depolanmış tahıl ve kepek içinde bulunması, vücut parçaları, dışkı ve dolaylı olarak saprofit mikroorganizmalar yoluyla gıda kalitesinin düşmesine neden olan bir kontaminasyona da yol açabilmektedir (Schroeckenstein vd., 1990; Barnes ve Siva-Jothy, 2009). *T. molitor*, dünya çapında tahıl ve un üretiminde %15'e varan kayıplara sebep olmaktadır (Flinn vd., 2003; Neethirajan vd., 2007).

2.2. Zararlılarla Mücadele

Pestisitler, sentetik olarak üretilen veya doğal yollarla elde edilen ajanlar olup insektisitler, fungisitler, herbisitler, nematositler ve rodentisitler gibi çeşitli kategorilere ayrılmaktadır. Küresel tarımda yıllık yaklaşık 2 milyon metrik ton pestisit kullanılmakta olup, Çin, ABD ve Arjantin en büyük pestisit tüketicileri arasında yer almaktadır (Dassanayake vd., 2016). Yapılan tahminlere göre, küresel pestisit kullanımının yakın gelecekte yıllık 3.5 milyon metrik tona ulaşması beklenmektedir (Zhang, 2018). Dünya genelinde kullanılan pestisitlerin %47.5'ini herbisitler, %29.5'ini insektisitler, %17.5'ini fungisitler ve geri kalan %5.5'ini diğer haşere kontrol ajanları oluşturmaktadır (Sharma vd., 2019).

Sentetik pestisitlerin aşırı kullanımı ciddi sağlık ve ekolojik tehlikelere yol açmaktadır. Kanser riskinin artışı, kardiyovasküler, nörolojik ve endokrin sistemle ilgili sağlık sorunları gibi olumsuz etkiler, ayrıca uygulanan ajanların hedef dışı organizmalara ve ekosisteme verdiği zararlar bu riskler arasındadır (Aktar vd., 2009). Örneğin, hekzaklorosikloheksan (HCH) içeren pestisitlerle çalışan işçilerde nörolojik semptomlar yaşadığı bildirilmiştir. Hindistan Ulusal İş Sağlığı Enstitüsü'nün (NIOH) 1992'de yaptığı bir araştırmaya göre, metomil içeren insektisitleri püskürten pirinç tarlası işçilerinde EKG anormallikleri, serum LDH ve kolinesteraz seviyelerinde değişiklikler tespit edilmiştir (Saiyed vd., 1992). Tarımsal uygulamalarda en yaygın kullanılan sentetik pestisitlerden biri olan klorpirifos, toprağı ve yeraltı suyunu kirletmekte olup sucul organizmalar için yüksek derecede toksiktir (Sanders, 1969).

Sentetik pestisitlerin çevresel, ekotoksikolojik ve sağlık üzerindeki olumsuz etkileri, aynı zamanda bu ajanlara karşı gelişen direnç, araştırmacılar ve tüketiciler arasında doğal ve sürdürülebilir ürünlere yönelme eğilimini artırmıştır. Yapılan tahminlere göre, dünya genelinde hasat edilen mısır, arpa, buğday, pirinç, patates, şeker pancarı ve soya fasulyesi mahsullerinin %40-50'si, büyük ölçüde bu ürünleri tüketen zararlı böceklerde gelişen pestisit direnci nedeniyle kaybedilmektedir (Popp vd., 2012).

Bu problemlerin yanı sıra, sentetik pesitisitlerin sahip olduğu tek bir bileşik için bile çok sayıda verinin üretilmesi ve doğrulanması yıllar sürebilmektedir ve oldukça maliyetli olabilmektedir (Damalas ve Eleftherohorinos 2011). Bir sentetik pestisit, kullanıldığı süre boyunca kaydının desteklenmesi için; ürünün içeriğinde bulunan aktif bileşenin kimliği, kimyasal ve fiziksel özellikleri, analitik yöntemler, önerilen etiket ve kullanım talimatları, insan ve çevre toksisitesi, güvenlik veri sayfaları, hedeflenen kullanıma yönelik etkinlik, ambalaj yönetimi, pestisit kullanımından kaynaklanan kalıntılar ve ürün atıklarının bertaraf edilmesi gibi veriler gerekmektedir (FAO, 2002; WHO, 2010).

Bu bağlamda, sentetik pestisitlerin daha az kullanıldığı, yeni etki mekanizmalarına sahip ve doğal kaynaklardan elde edilen alternatiflere yönelik ilgi ve talep giderek artmaktadır. Bu durum biyolojik mücadeleyi ön plana çıkarmaktadır. Biyolojik mücadele; farklı organizmalar kullanılarak zararlı bir organizmanın popülasyon yoğunluğunun veya zararlı etkisinin olabildiğince aza indirilmesi için yapılan mücadele yöntemidir (Eilenberg vd., 2001). Biyolojik mücadele yöntemi, etkisinin uzun sürmesi, yan

etkilerinin olmaması, böceklerde direnç oluşumunu tetiklememesi, çevreyi ve insan sağlığını olumsuz etkilememesi nedeniyle avantajlıdır (Shahid vd., 2012; Islam vd., 2021). Biyolojik mücadelede amaç zararlı populasyonunu ekonomik eşik değerinin altında tutmaktır. Biyolojik mücadelede mikroorganizmalardan omurgalılara kadar, birçok organizma kullanılabilmektedir. Biyolojik mücadelede kullanılan ajanlar genel olarak predatörler, parazitoitler ve patojenler olmak üzere üç gruba ayrılabilmektedir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Yaygın olarak kullanılan biyokontrol ajan grupları (Sandhu vd., 2012).

Biyolojik mücadele ajanı	**Yaygın örnekleri**	**Biyolojik etkileri**
Parazitoitler	*Trichogramma chilonis*, *Epiricania melanoleuca*	Konukçuları üzerinde veya içinde yaşar ve beslenirler.
Predatörler	*Chrysoperla carnea*, *Cryptolaemus montrouzieri*	Konukçularını (avlarını) yiyerek öldürürler.
Entomopatojenler	Bakteri: *Bacillus thuringiensis* Fungus: *Trichoderma* spp., Nomuraea spp., *Paecilomyces* spp., *Verticillium* spp., *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp. Virüs: Nuclear Polyhedrosis Virus	Konukçularında hastalık oluşturarak onları zayıflatır veya öldürürler.

Böceklerin de diğer canlı organizmalar gibi doğada düşmanları vardır. Böceklerde doğal yollarla enfeksiyon oluşturabilen bakteri, virüs ve funguslara entomopatojen denmektedir (Elkhateeb VD., 2021). Bu patojenler içerisinde önemli bir yeri olan entomopatojen funguslar (EPF), pek çok zararlı böceğin doğal olarak kontrol altına alınmasında rol oynamaktadırlar. Bu funguslar, diğer fungus gruplarında olduğu gibi, heterotrof, ökaryotik, tek hücreli veya çok hücreli (filamentli), eşeyli/eşeysiz veya iki tür sporla da çoğalabilen bir gruptur (Mora vd., 2017). Dünya üzerinde 1,5- 5,1 milyon olduğu tahmin

edilen fungus türü içerisinde yaklaşık 100 000'i tanımlanmış ve bunlardan yaklaşık 100 cinse ait 750-1000 civarında türün EPF türleri olduğu bildirilmiştir (Vega vd., 2012).

Entomopatojen funguslar; geniş konak dağılımına sahip olmaları ve böceklerde yalnızca beslenme yoluyla değil, direkt olarak solunum deliklerinden ve böcek kutikulasından enfeksiyon yapabilme kabiliyetine sahip olmaları sebebiyle diğer böcek patojenlerine göre avantaj sağlamaktadırlar (Um vd., 2018). Örneğin; bazı fungus türleri böcekleri enfekte ederek bakteri ve virüslerin neden olduğundan daha şiddetli epizootiklere neden olabilmektedir (Sandhu vd., 2012). En önemli entomopatojen funguslar Ascomycetes filumuna bağlı; *Beauveria, Metarhizium, Lecanicillium* ve *Paecilomyces* cinslerine ait fungus türleridir (Alyokhin vd., 2013).

Entomopatojen funguslarların; zararlı organizmaların kontrolünde yüksek derecede spesifite göstererek faydalı biyokontrol ajanlarına zarar vermeden zararlıları kontrol altına alabilmeleri, insektisitler kadar risk barındırmamaları, böceklerde direnç oluşturmamaları ve uzun vadeli mücadele sağlamaları EPF'lerin avantajları olarak sıralanabilmektedir (Wan, 2003).

2.3. Entomopatojenik Funguslar

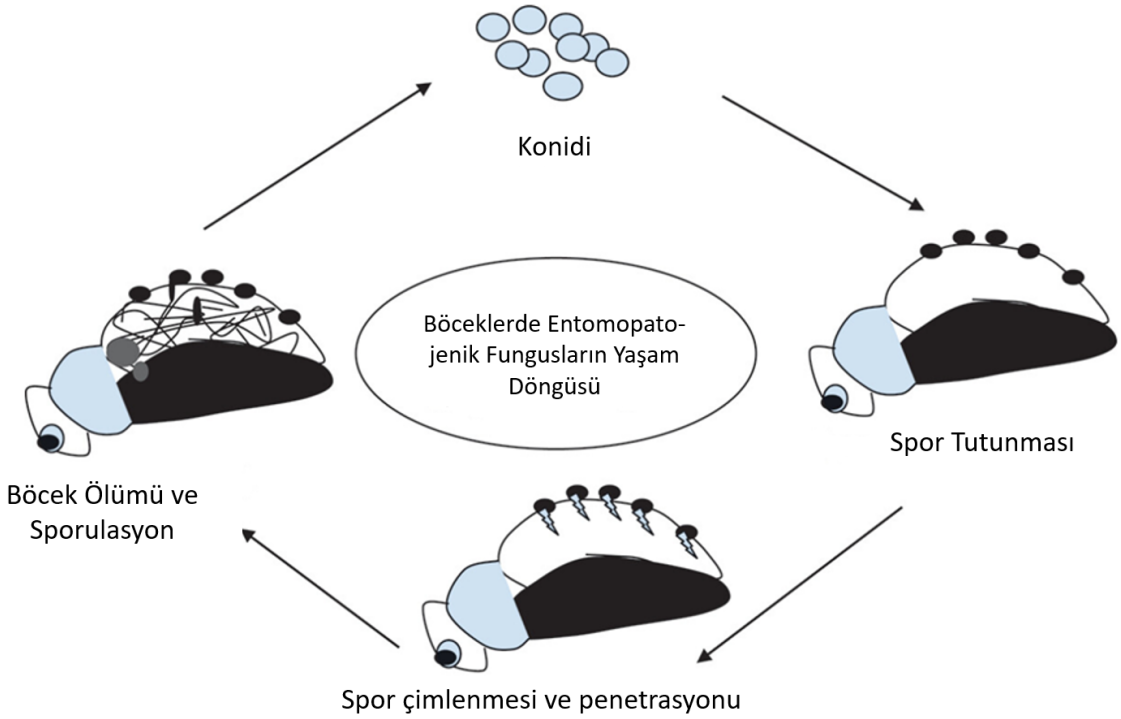
Son 400 milyon yıl boyunca, funguslar ve böcekler bir arada yaşamış ve farklı etkileşim biçimleri geliştirmiştir (Blackwell ve Vega, 2005; Araújo ve Hughes, 2016). Bu etkileşimler arasında, patojenlik, büyük fungus ailelerinde evrimleşmiş bir özellik olmuştur (Lacey vd., 2015; Lovett ve Leger, 2017). Funguslar sekiz ana sınıfa ayrılmaktadır ve bunlardan Zygomycota, Basidiomycota, Ascomycota ve Microsporidia sınıfları entomopatojenik funguslar (EPF) içermektedir (Bergman vd., 2019). Bunlar arasında Zygomycota ve Deuteromycota, önemli EPF türlerini barındırmakta olup, bu türler geniş çapta belgelenmiştir (Sinha vd., 2016).

Entomopatojenik funguslara olan keşif ve ilgi, insanların büyük miktarlarda böcek yetiştirmesiyle başlamıştır (Shin vd., 2020). İlk bilimsel raporlar, ipekböceği (*Bombyx mori*) hastalığına neden olan *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. ve *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin türlerine aittir (Singh, 2004; Xiao vd., 2012). Bu keşif, entomopatojenik funguslar alanında böcek patolojisinin başlangıcını oluşturmuştur.

Funguslar aleminin sınıflandırma sisteminde, Ascomycota şubesine ait olan *Beauveria bassiana* ve *Metarhizium anisopliae*, günümüzde en ünlü entomopatojenik fungus türleri olarak kabul edilmektedir (Shin vd., 2020). Yaklaşık 180 yıl önce başlayan bu ilgiyle birlikte, bugüne kadar toprak ve böcek kadavralarından 100 cinse ait 700'den fazla fungus türü izole edilmiştir (Shin vd., 2020). Bu fungusların genellikle insanlar ve hedef dışı organizmalar için zararsız olduğu bilinmekte olup, çevreye olumsuz etkileri olmaması nedeniyle böcek zararlıları için biyolojik kontrol ajanı olarak incelenmektedir (Tanada ve Kaya, 2012).

Entomopatojenik funguslar, konak böceklerde enfeksiyon oluşturarak ölümlerine ve dolayısıyla zararlı popülasyonlarında epizootiğe neden olarak doğal biyokontrol mekanizmalarına katkı sağlamaktadır (Islam vd., 2021). Entomopatojen fungusun epizootik oluşturması; fungusun böcekle olan etkileşimine, fungus sporunun virülansına, sporun yoğunluğuna ve dağılımına bağlıdır (Qayyum vd., 2021). Entomopatojen funguslarda yaşam döngüsü konaklarının gelişme dönemleriyle ile eş zamanlı olarak meydana gelmektedir (Shah ve Pell, 2003).

Entomopatojenik funguslar, böceklerin vücutlarına girerek çoğalabilmekte ve bir böcekten diğerine yayılabilmektedir (Kaya ve Vega, 2012). Bu fungusların sporları, konak böcek ile temas ettikten sonra böceğin kutikulası üzerinde çimlenerek iç katmanlara doğru ilerlemekte, ikincil konidileri üretmekte ve iç organları parçalayarak böceğin ölümüne neden olmaktadır (Shin vd., 2020; Vega vd., 2012) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Entomopatojenik funguslar tarafından konak böcekte enfeksiyon ve sporülasyon döngüsü (Sinha vd., 2016'dan değiştirilerek alınmıştır).

Entomopatojenik fungusların en belirgin özelliği, bakteriler veya virüsler gibi diğer böcek patojenlerinden farklı olarak, konakçılarını enfekte etmek için sindirim sistemine girmeye gerek duymadan doğrudan kutikula yoluyla enfeksiyon başlatabilmeleridir (Mannino vd., 2019). Bu nedenle, tarım zararlıları (örneğin, yaprak bitleri, yaprak pireleri, pis kokulu böcekler, tripsler) ve hastalık vektörleri (örneğin, sivrisinekler, tsetse sinekleri) gibi emici böceklerin kontrolünde büyük bir potansiyele sahiptirler (Mannino vd., 2019).

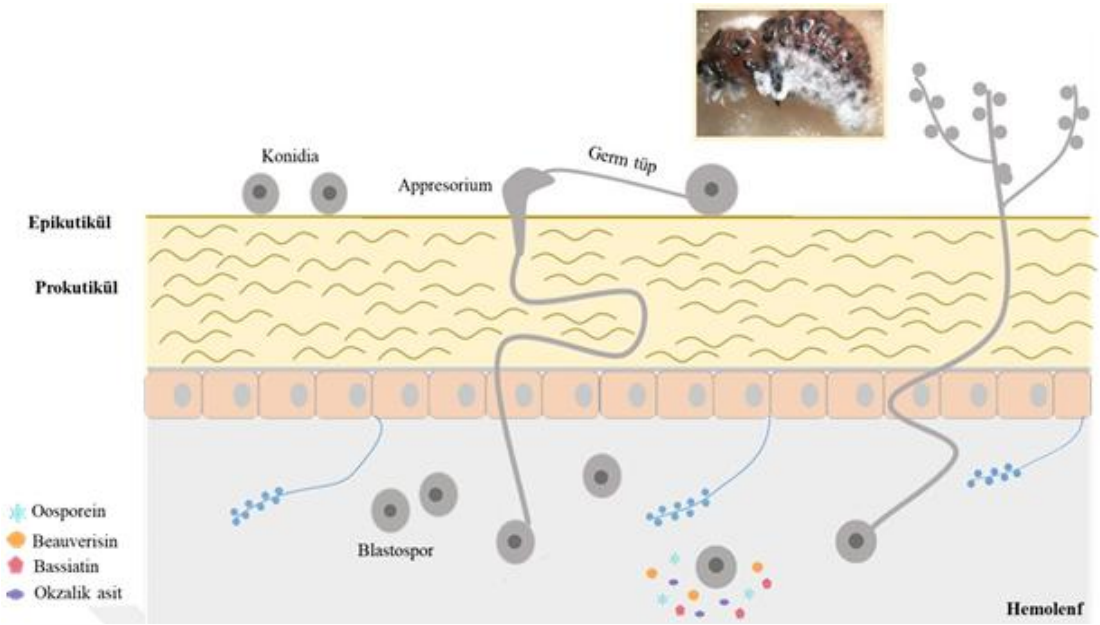
Entomopatojenik fungusların bolluğu ve çeşitliliği, sürdürülebilir zararlı böcek yönetimi açısından önemli bir potansiyel barındırmaktadır (Sinha vd., 2016). Bu fungusların konak özgüllüğü, tür ve suş düzeyinde farklılık göstermekle birlikte, Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, Diptera, Orthoptera ve Hymenoptera takımlarına ait birçok böcek türünü enfekte edebilmektedir (Ramanuja vd., 2014). Özellikle *Beauveria bassiana* ve *Metarhizium anisopliae*, en geniş konak dağılımına sahip entomopatojenik funguslar arasında yer almaktadır (Goettel vd., 2010). Şekil 2.3, farklı EPF türlerinin konak böcekleri nasıl istila ettiğini göstermektedir.

Şekil 2.3. Farklı entomopatojenik fungusların konak böcek üzerindeki etkileri. *Beauveria bassiana* (A), *Metarhizium anisopliae* (B) ve *Isaria fumosorosea* (C), patates dekstroz agar (PDA) plakalarında büyütülmüştür. Şekil D-H, şeker kamışı kurdu *Diatraea saccharalis*'in sırasıyla *B. bassiana* (D ve G), *M. anisopliae* (E ve H) ve *I. fumosorosea* (F) tarafından kolonize edilmesini göstermektedir (Baron vd., 2019'dan değiştirilerek alınmıştır).

EPF'nin rejenerasyon kapasitesi, uygulama sıklığını önemli ölçüde azaltarak kimyasal insektisitlere kıyasla daha düşük maliyet ve daha yüksek verimlilik sağlamaktadır (Ortiz-Urquiza ve Keyhani, 2013; Gul vd., 2014; Mwamburi, 2020). Birçok entomopatojenik fungus ticari olarak üretilmekte, zararlı böceklerle mücadelede başarıyla kullanılmakta ve geniş bir nem ve sıcaklık aralığında etkili olabilmektedir (Wraight ve Carruthers, 1999). EPF'lerin ticari ürünleri, bahçecilik, ormancılık ve tarımda entegre zararlı yönetimi (IPM) programlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Inglis vd., 1997). Ancak, şu ana kadar depolanmış tahıl zararlılarının biyolojik mücadelesine yönelik herhangi bir entomopatojenik fungus ürünü ticari olarak tescillenmemiştir (Batta, 2016).

2.3.1. Entomopatojenik Fungusların Etki Mekanizması

Entomopatojenik fungusların böceklerde enfeksiyon oluşturma biçimi, diğer patojenlerden farklı olarak konidiyumların konak üzerine yapışması ve daha sonra kesit yoluyla giriş yapması şeklinde gerçekleşmektedir (Şekil 2.4). EPF enfeksiyon süreci genellikle altı temel aşamadan oluşmaktadır: (1) konidiyumların konak yüzeyine yapışması, (2) konidiyumun çimlenmesi ve appressoryum oluşturması, (3) penetrasyon, (4) hemolenf içinde fungus gelişimi, (5) konak üzerinde sekonder konidiyum üretimi ve (6) yeni konidiyumların çevreye yayılması (Shin vd., 2020).



Şekil 2.4. Entomopatojen fungusun enfeksiyon şeması (Ulusoy, 2022)

Fungus, bu aşamalar sırasında farklı gen ve moleküler mekanizmalar kullanarak konakta enfeksiyonunu sürdürmektedir. Bu aşamalar, konidiyum yapışması ile başlamaktadır ve EPF enfeksiyonunun ilk adımı, konidiyum denilen fungus sporlarının böcek kutikulasına bağlanmasıdır. *Metarhizium anisopliae* gibi türlerde, konidiyum yüzeyindeki hidrofobin proteinleri ve rodlet (çubuk) tabakası yapışma olayını kolaylaştırmaktadır (Ment vd., 2010; Butt vd., 2013; Tseng vd., 2014). Rodlet yapısında bulunan hidrofobinler, konidiyum ile konak kutikulası arasındaki hidrofobik etkileşimi artırmaktadır. Örneğin *M. anisopliae*'de bulunan *Mad1* geni, konidiyumun konak yüzeyine tutunmasını sağlayan bir adezin proteini kodlarken, *M. acridum*'da *Hog1* kinazı çimlenme için sinyal iletiminde

rol oynamaktadır (Aw ve Hue, 2017). Yapışmayı etkileyen diğer faktörler arasında konak yüzeyinin kimyasal yapısı, nem durumu ve konuk beslenme alışkanlıkları da sayılabilmektedir (Ment vd., 2010; Santi vd., 2010; Greenfield vd., 2014). Başka bir deyişle, adhezyon aşaması pasif hidrofobik kuvvetler ve yüzey proteinlerinin ortak çalışmasıyla gerçekleşmektedir.

Daha sonra çimlenme ve appressoryum oluşumu ile enfeksiyon süreci devam etmektedir. Yapışmış konidiyum belli bir süre sonra çimlenerek bir germ tüpü oluşturmakta (Lovett ve Leger, 2015) ve bu germ tüpü uygun koşullarda kutikula üzerinde şişerek appressoryum adlı özel bir penetre yapısı geliştirmektedir (Lovett ve Leger, 2015). Appressoryum içinde oluşan turgor basıncı ve mekanik güç, fungusun kesit yoluyla kutikulaya nüfuz etmesini sağlamaktadır (Butt vd., 2013; Lovett ve Leger, 2015). Bu süreçte fungus, ortam pH'sı, nem ve besin gibi çevresel sinyallere yanıt veren içsel genetik mekanizmalar kullanmaktadır. Örneğin appressoryum gelişiminde *MAPK* ve *cAMP* yolağına bağlı genlerin rol oynadığı bilinmektedir (Aw ve Hue, 2017). Bu aşamada *M. anisopliae*, çimlenme ve appressoryum gelişimini kontrol eden genler aracılığıyla konak kütikulasına nüfuz etmeye hazırlanmaktadır (Shin vd., 2020).

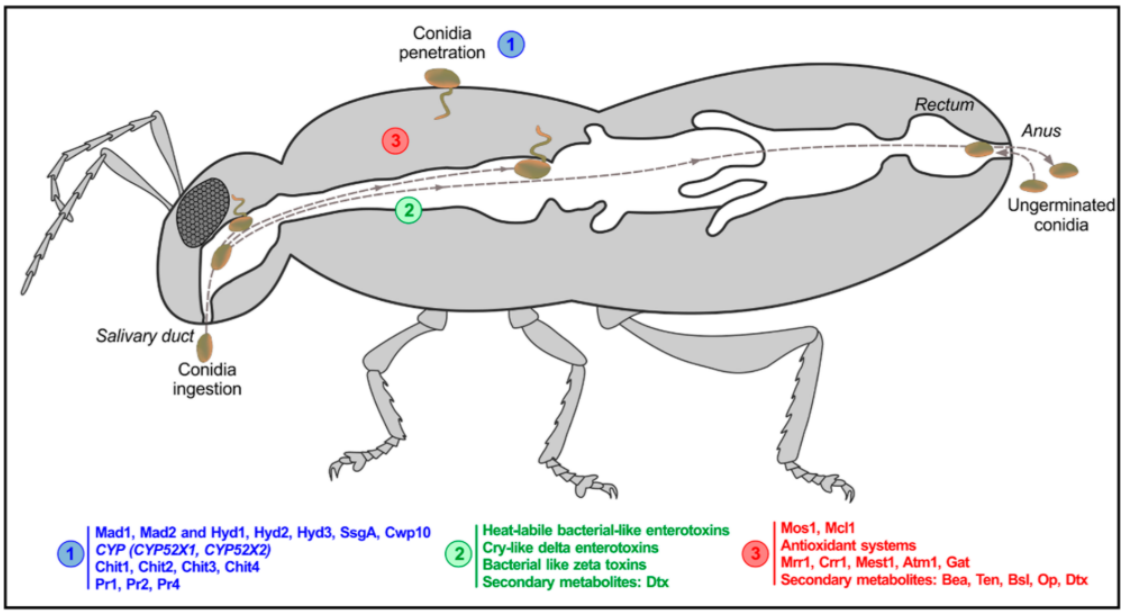
Enfeksiyon sonrasında penetrasyon ile devam etmektedir. Appressoryum tarafından oluşturulan mekanik basınçla başlatılan penetrasyon aşaması, enzimatik etkinlik gerektirmektedir. Fungus bu aşamada konak kutikulasını parçalayan çok sayıda hidrolitik enzim salgılamaktadır ve özellikle subtilisin, tripzin, kimotripsin ve karboksipeptidaz gibi proteazlar, böcek kutikulasında yüksek miktarda bulunan pro-kutikul proteinlerini hidroliz ederek kesitin delinmesine yardımcı olmaktadır (Wang vd., 2008). Örneğin *M. anisopliae*'de salgılanan *Pr1* proteazı, kesit proteinlerini parçalayarak penetrasyona izin vermektedir (Butt vd., 2013; Leão vd., 2015). Ayrıca kitinazlar da proteazlarla birlikte rol oynamakta, kutikulada bulunan kitini degrede etmekte ve daha fazla penetrasyon sağlamaktadırlar (Santi vd., 2010). Bu çoklu enzim kullanımına bağlı olarak, bazı tripzin izoenzimleri yalnızca belirli böceklerin kuikula proteinlerine özgü olması gibi farklı konaklar için farklı enzim profilleri gözlemlenmiştir (Butt vd., 2013). Bu aşamanın sonunda EPF, kutikulayı hem mekanik hem de kimyasal yöntemlerle açarak hemolenfe geçmeyi başarmaktadır (Aw ve Hue, 2017).

Bir sonraki aşama ise hemolenfte çoğalma ve toksin salınımıdır. Kutikuladan hemolenfe geçen fungus, burada hızla çoğalarak blastosit olarak adlandırılan hifal cisimcikleri oluşturmaktadır (Aw ve Hue, 2017). Böylelikle fungusun yüzey/hacim oranı artmakta ve besin alımı daha etkin hale gelmektedir. Hemolenfte çoğalma aşamasında EPF, konak bağışıklık savunmasını alt etmek için çeşitli moleküler araçlar kullanmaktadır ve bunların başında oksidatif stresi önleyen antioksidan enzimler gelmektedir (Gao vd., 2011). Ayrıca EPF, böceğe zehir etkisi gösteren bir dizi sekonder metabolit üretmektedir (Valero-Jiménez vd., 2016). *Beauveria bassiana*'dan elde edilen beauvericin, lakton üçlüsü yapısında bir toksin olup ve sitotoksik bir etki oluştururken; *Metarhizium anisopliae'*den elde edilen destruksin, siklik depsipeptidler olup konak böceklerde güçlü immünsüpresan etkiler göstermektedir (Molnár vd., 2010; Pedrini, 2018).

Bu çok aşamalı enfeksiyon süreci sonucunda EPF konağı öldürmekte, yüzeyde spor kümeleri (konidiyum) üretmekte, bu sporlar çevreye yayılmakta ve yeni konakların enfekte olmasını sağlamaktadır (Shin vd., 2020). EPF'nin tüm bu etki mekanizmaları moleküler düzeyde karmaşık bir gen ifadesi ve enzim sekresyonu ağı gerektirmektedir. Sonuç olarak, entomopatojenik funguslar konidiyumların yapışması ve çimlenmesinden toksin salınımına kadar bir dizi özelleşmiş moleküler strateji ile böceği enfekte ederek kontrol altına almaktadır. Bu mekanizmaların ayrıntılı anlaşılması, fungusların biyolojik mücadelede etkinliğini artıracak genetik müdahaleler ve formülasyon geliştirme çabalarına temel teşkil etmektedir.

Ek olarak bazı EPF'ler ağız yoluyla da enfeksiyon gerçekleştirebilmektedir; toksin salınımı, böceğin iç organlarında sistemik bir enfeksiyona yol açarak ölümle sonuçlanabilmektedir (Mannino vd., 2019). EPF enfeksiyonunda kabul gören yaygın yol, kutikuladan geçiştir. Ancak son yıllarda yapılan genomik çalışmalar, bazı EPF'lerin ağız yoluyla da enfekte olabilecek genetik altyapıya sahip olduğunu ortaya koymuştur (Mannino vd., 2019). Özellikle *B. bassiana* genomunda, bakteriyel delta-endotoksinlere ve ısıya duyarlı enterotoksin alt ünitelerine benzer genler saptanmıştır; bu durum da *B. bassiana*'nın *Bacillus thuringiensis* gibi bakteriyel böcek patojenlerine benzer toksinlere sahip olabileceğini düşündürmektedir (Xiao vd., 2012). Ağız yoluyla enfeksiyon, larvanın sindirim sistemine konidyum alınması ile başlamakta ve EPF, bakteri endotoksinlerine benzer moleküller sindirim kanalını tahrip ederek sisteme giriş

sağlamaktadır. Mannino ve arkadaşları (2019) bu alternatif yolu Şekil 2.5'te özetlemiş, ağız yoluyla enfeksiyon potansiyelini yeşil ok ile göstermiştir. Bu mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte, moleküler çalışmalarda birçok toksin ve enzim kodlayan gen takımının ağız yoluyla enfeksiyona katkı sağladığı görülmüştür.



Şekil 2.5. Mannino vd. (2019) tarafından önerilen alternatif enfeksiyon yolları. Mavi ok (1) kesit-kutikula penetrasyon yolunu, yeşil ok (2) ağız yoluyla enfeksiyon potansiyelini ve kırmızı ok (3) hemolenf içi gelişmeyi göstermektedir (Mannino vd., 2019).

2.4. Esansiyel Yağlar

Bitkiler ile diğer organizmalar (böcekler, otçul memeliler, funguslar, bakteriler vb.) arasındaki ortak yaşam, bitkilerin bu organizmalara karşı çok sayıda adaptasyon ve direnç mekanizması geliştirmesine olanak tanımış ve dolayısıyla çeşitli sekonder metabolitlerin ortaya çıkmasına yol açmıştır (Popescu vd., 2024). Bitkiler tarafından sekonder metabolitler olarak üretilen esansiyel yağlar, milyonlarca yıllık evrim sürecinde bitkiler ile böcekler arasındaki etkileşimin düzenlenmesine etki etmiştir (Popescu vd., 2024).

Esansiyel yağlar, aromatik ve lipofilik özellikleriyle karakterize edilen kokulu ve esansiyel doğal yağlardır (Dhifi vd., 2016). Bu yağlar, bitkiler için tozlaşmayı sağlayan böcekleri ve diğer faydalı organizmaları kendine çeken bileşikler olarak ya da zararlı böceklere karşı savunma mekanizmaları olarak işlev görmüştür (Pavela ve Benelli, 2016).

İnsanlar, bitkilerden elde edilen maddelerin potansiyelini ve tarımsal zararlılarla mücadelede sağlayabilecekleri faydaları, bu maddelerin kimyasal yapılarını ve özelliklerini anlamadan çok önce fark etmiştir. Tarihsel verilere göre, bitki ekstrelerinin böceklere karşı kullanımı yaklaşık 3000 yıl öncesine dayanmaktadır (Pavela, 2016). Bilgi birikiminin artması ve yakın dönemde kullanılan sentetik pestisitlerin çevreye verdiği zararlar, son yıllarda biyopestisit olarak kullanılan esansiyel yağlar üzerine çok sayıda çalışmanın yapılmasına yol açmıştır.

Bitkiler hem birincil (örneğin şekerler ve asitler) hem de ikincil metabolitler üretmektedirler ve esansiyel yağlar genellikle monoterpenler, esterler, seskiterpenler, fenoller, aldehitler, oksitler ve ketonlar gibi biyoaktif ikincil metabolitlerden oluşmaktadır (Preedy, 2015; Pott vd., 2019). Bu bileşikler, böcek-bitki ilişkilerinde önemli bir rol oynamaktadır (Parmar vd., 1997; Isman, 2000; Martínez vd., 2015). Bu bağlamda esansiyel yağlar; böcekler üzerinde kovucu (repellent), yumurtlama ve beslenmeyi caydırıcı (deterrent), büyüme düzenleyici (growth regulator) ve toksik etkileriyle düşük kirlilik riski ve hızlı çevresel bozunma sağlayan bir alternatif zararlı kontrol yöntemi olarak değerlendirilmektedir (Plata-Rueda vd., 2017). Çeşitli araştırmalar, depolanmış tahıllara uygulanabilecek esansiyel yağların, zararlı böceklerin kontrolünde kullanılma potansiyeline odaklanmıştır yapılmıştır (Zapata ve Smagghe, 2010; Stefanazzi vd., 2011; Jemâa vd., 2012).

Şu ana kadar 3000'den fazla esansiyel yağ türü tanımlanmış olup, yaklaşık 300'ü ticari olarak pazarlamıştır (Dhifi vd., 2016; Bhavaniramya vd., 2019; Sharmeen vd., 2021). Lauraceae, Myrtaceae, Lamiaceae, Rutaceae, Apiaceae, Asteraceae, Poaceae, Cupressaceae, Piperaceae ve Zingiberaceae gibi bitki aileleri, esansiyel yağ üretimi açısından sıkça araştırılmaktadır (Fahn, 2000; Svoboda, 2003; Asgar ve Jalal, 2015).

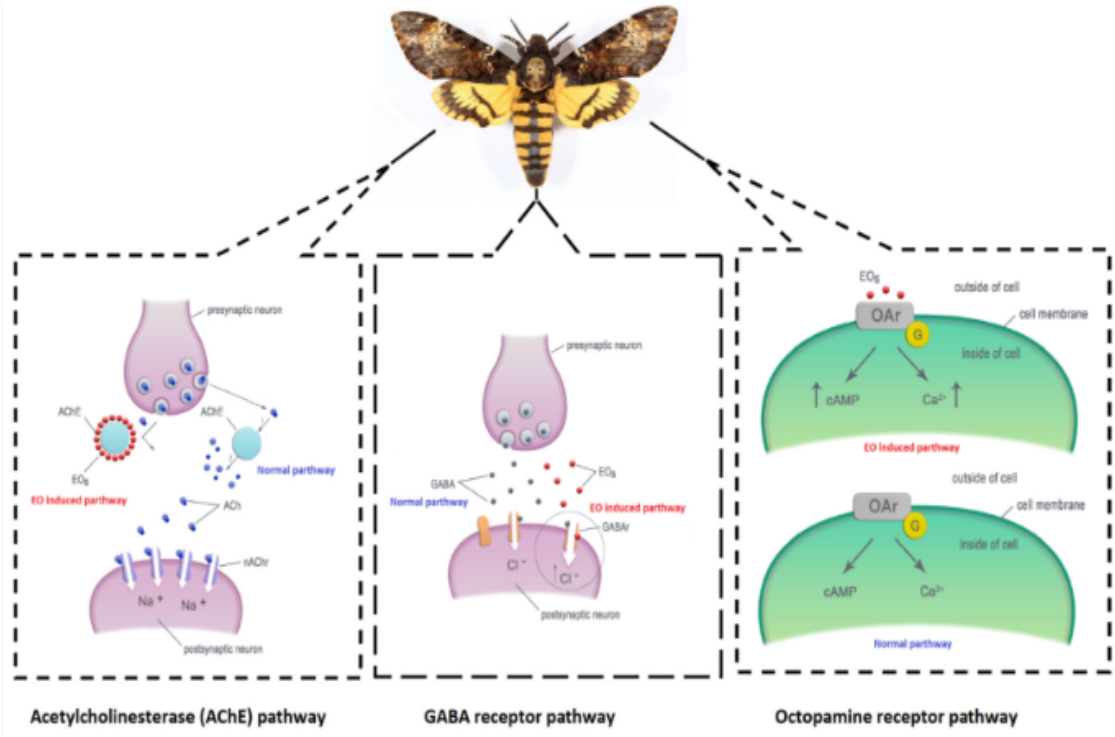
Bitkilerden, şifalı otlardan, meyve atıklarından ve olgunlaşan meyvelerin enzimlerinden elde edilen esansiyel yağlar biyolojik mücadelede etkili bir potansiyeldir sunmaktadır (Dassanayake vd., 2021). Günümüzde bu esansiyel yağların antioksidan, antikanser, antimikrobiyal, antiviral ve pestisit etkileri gibi çeşitli kimyasal özellikleri ve biyolojik aktiviteleri üzerine araştırmalar yürütülmektedir (Winska vd., 2019). Yapılan çalışmalarda, *T. molitor'*un mücadelesinde *Cymbopogon citratus*, *Citrus limonum*, *Muristica fragrans, Litsea cubeba* (Isman, 2006), *Origanum vulgare* ve *Carum carvi*

(Petrović vd., 2019; Plata-Rueda vd., 2021) esansiyel yağlarının kullanılabileceği gösterilmiştir.

2.4.1. Bitki Kaynaklı Esansiyel Yağların Etki Mekanizmaları

Bitki kaynaklı esansiyel yağlar böceklerin biyokimyasal, fizyolojik ve metabolik işlevlerine müdahale edebilen özelliklere sahiptir ve bu organizmaların hedef bölgelerindeki biyolojik aktiviteleri değiştirerek etkili olabilmektedirler (Daferera vd., 2000; Borzoui vd., 2016). Bitki bazlı esansiyel yağlardan elde edilen böcek önleyici bileşenler, dar veya geniş spektrumlu olabilmektedir. Dar spektrumlu ajanlar yalnızca belirli tür etkilerken, geniş spektrumlu ajanlar çok sayıda böceğe karşı etkili olabilmektedir (Hermans ve Keys, 2004). Böcek önleyici bitki bazlı ajanları, böcek kovucular (insect repellents) ve insektisitler (insecticides) olmak üzere ikiye ayırabilmek mümkündür (Dassanayake vd., 2016). Böcek kovucular kimyasal özellikleri sayesinde böcekleri sadece uzaklaştırma özelliğine sahipken, insektisitlerin öldürücü etkisi vardır ve böceklerin ölümüne sebep olmaktadır (Niroumand vd., 2016).

Çeşitli moleküler çalışmalar, esansiyel yağların pestisit ve böcek kovucu özelliklerinin etki mekanizmalarını açıklamıştır. Esansiyel yağ metabolitleri, böceklerin asetilkolinesteraz (AChE) ve oktopamin yollarını inhibe edebilmektedir (Şekil 2.6) (Polsinelli vd., 2010; Pang vd., 2012; Jankowska vd., 2018).



Şekil 2.6. Bitkisel kaynaklı esansiyel yağların böcek üzerinde etki mekanizmaları (Jankowska vd., 2017'den değiştirilerek alınmıştır).

AChE enziminin, böceklerin nöromüsküler ve nöronal iletişiminde kritik rol oynaması özelliğinden dolayı AChE inhibisyonu, bu mekanizmalar içinde, geçmiş yıllarda en çok araştırılan konulardan biri olmuştur (Bourguet vd., 1997; Marcel vd., 1998) AChE inhibisyonu, sinaptik zarın bozulmasına neden olarak sinir akımına müdahale etmekte ve böceklerde nörotransmitter toksisitesi olarak adlandırılan olaya yol açmaktadır (Re vd., 2000; Kostyukovsky vd., 2002; Marrs ve Maynard, 2013). Oktopamin hormonu ise, böceklerin sinir sistemiyle ilişkili önemli bir hormondur (Evans, 1980). Oktopamin-1, bir nörotransmitter ve Oktopamin-2 ise bir nöromodülatör olarak görev yapmaktadır (Dassanayake vd., 2016). Oktopaminin inhibisyonu, kas bağlantıları ve böceklerin vücut sıvılarının homeostazi (dengeleşim) ile ilişkili fizyolojik düzenlemelerin bozulmasına yol açmaktadır ve bu durum sinir sistemini olumsuz yönde etkilemektedir (Lange ve Orchard, 1986; Farooqui, 2007; Ohta ve Ozoe 2014). Bitki kaynaklı esansiyel yağlar böceklerde bulunan Gamma-Aminobütirik Asit (GABA) reseptörlerini de inhibe edebilmekte ve GABA reseptörlerinin sinaps dışı zarlarındaki reseptörlere bağlanmasını engelleyebilmektedir (Sattelle, 1990; Ben-Ari vd., 2012; Sigel ve Steinmann, 2012). Ayrıca, esansiyel yağlardan elde edilen fitokimyasal metabolitler, böceklerin

ksenobiyotik metabolizması ve solunumu ile ilişkili enzimlerin aktivitelerini bozabilmekte veya inhibe edebilmektedir. Bu enzimler arasında sitokrom P450'ler, kitinazlar, karboksilesterazlar (CarEs), ATP-bağlı kaset taşıyıcıları (ABC taşıyıcıları) ve glutatyon S-transferazlar (GST'ler) bulunmaktadır (Merzendorfer, 2012; Yu vd., 2017; Campolo vd., 2018).

Bitki kaynaklı esansiyel yağların diğer biyolojik ajanlarla birlikte kullanılması ve sinerjik etki göstermeleri de araştırılmıştır. Örneğin, Radha ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan bir araştırma, *Chenopodium ambrosoides* ve *Thymus vulgaris* bitkilerinden elde edilen esansiyel yağların, *Beauveria bassiana* tarafından üretilen metabolitler ile sinerjistik etki göstererek *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (cowpea bruchid) türüne karşı insektisit ve böcek kovucu etki sağladığını ortaya koymuştur (Radha vd., 2014).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Entomopatojenik Fungusların Topraktan İzolasyonu ve Saflaştırılması

3.1.1.Toprak Örneklerinin Toplanması

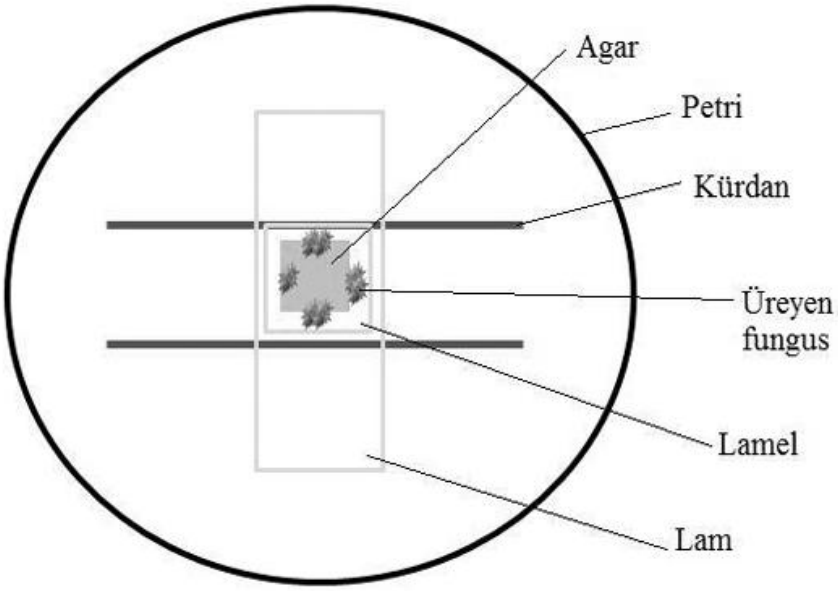
Toprak örnekleri Bilecik ilindeki tarım arazilerinden alınmıştır. Toprak yüzeyi kaldırılarak örnekler 5-20 cm derinlikten bir kürek yardımıyla toplanmıştır. 10 farklı bölgeden, her bölgede 3 farklı yerden örnek alınmıştır. Aynı bölgeden toplanan topraklar bir kova içerisinde karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Karışımdan alınan yaklaşık 1 kg toprak 25×42 cm boyutlarındaki polietilen torbalara yerleştirilmiş, etiketlenmiş ve mümkün olduğunca kısa sürede entomopatatojenik fungus yönünden incelenmiştir (Ali-Shtayeh ve ark., 2002).

3.1.2. Toprak Örneklerinden Entomopatojenik Fungus İzolasyonu

Topraktan EPF izolasyonu Zimmermann (1986)'ın önerdiği "Galleria tuzak metodu" modifiye edilerek yapılmıştır. Tuzak böcek olarak *Galleria mellonella* larvaları yerine *Tenebrio molitor* (un kurdu) larvaları kullanılmıştır. Her bir toprak örneği 1 litrelik plastik kaplar içerisine yerleştirilerek üzerine 10'ar adet *T. molitor* larvası eklenmiştir. Toprağın çok kuru olması durumunda gerekli nemi sağlamak için toprağa steril su ilave edilmiştir. Larvaların toprağın altında kalmasını sağlamak için kapların kapağı kapatılıp ters çevrilmiştir. Daha sonra kaplar oda sıcaklığında (20-25°C) bekletilerek böceklerin topraktaki bulunması muhtemel funguslarla maksimum temasını sağlamak amacıyla sıklıkla sallanarak alt üst edilmiştir. (Zimmermann, 1986; Meyling ve Eilenberg, 2006). Gözlemler sonucu öldüğü tespit edilen larvalar, fungus izolasyonu için seçilmiştir. Bu larvalar yüzey sterilizasyonu için steril kabine alınarak %1'lik sodyum hipoklorit (NaClO) solüsyonunda 2-3 dk bekletilmiş, ardından 3 defa steril saf su ile yıkanarak kurutma kağıdı üzerine alınmıştır. Yüzey sterilizasyonu yapılan böcekler içerisinde nemli filtre kağıdı bulunan steril petrilere alınarak, 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır (Ali-Shtayeh vd., 2002). İnkübasyon periyodundan sonra mikozlanma görülen böceklerin yüzeyinden alınan funguslar %1 maya ekstraktı içeren Sabouraud dekstroz agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, ABD) besiyerine inoküle edilerek 25°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu oluşan koloniler birkaç pasaj yapılarak saf kültürler elde edilmiştir.

3.2. Entomopatojenik Fungusların Makroskobik ve Mikroskobik Düzeyde Morfoloji Analizleri

Fungusların morfolojik tür tayinleri Dr. Richard Humber (USDA-ARS Collection of Entomopathogenic Fungi, Ithaca, NY, USA) tarafından yayınlanan "Entomopathogenic Fungal Identification" adlı kaynağa göre yapılmıştır (Humber, 1997). İzole edilen fungusların SDA ve PDA besiyeri üzerine ekimleri yapılarak stereomikroskop altında koloni şekilleri ve renkleri incelenmiştir. Mikroskobik incelemeler için agar blok yöntemi kullanılarak preperatlar hazırlanmıştır. Bu yöntemin ilk basamağında PDAY hazırlanarak bir petriye dökülmüştür. Daha önceden steril edilmiş petriler içerisinde bulunan lam, lamel ve kürdanlar kullanılarak bir düzenek hazırlanmıştır. Katı hale gelmiş olan kalın bir agarlı besiyeri parçası (en az 0,5 cm kalınlıkta) steril bistüri ile kare şeklinde kesilerek kürdanlar üzerinde bulunan lam üzerine bırakılmıştır. Kesilen bu kare besiyerinin her kenarına iğne uçlu öze ile nokta ekim yapılmış ve üzeri lamel ile kapatılmıştır (Şekil 3.1). Bu düzeneğin altında bulunan kurutma kağıtları distile su ile nemlendirilmiştir. Hazırlanan kültürler 28°C de 4-8 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu besiyerinin üzerinden alınan lameller laktofenol cotton blue ile boyanarak mikroskop incelemeleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Fungal örneklerin agar blok yöntemi ile mikroskobik incelenmesi.

3.3. Entomopatojenik Fungusların Moleküler Karakterizasyonu ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması

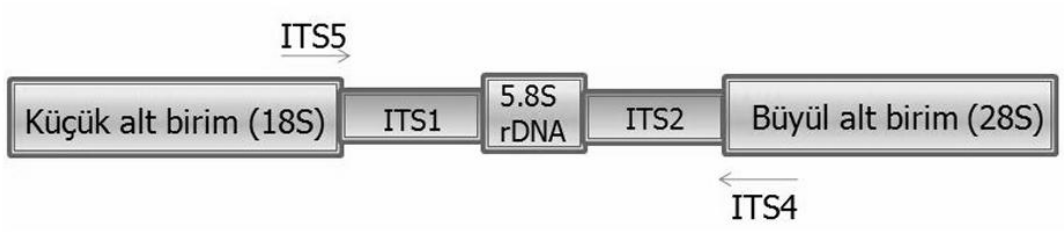
3.3.1. DNA İzolasyonu

Fungal izolatlardan DNA izolasyonu için **Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit** kullanılmış, üreticinin protokolü uygulanmıştır. İzolasyon için öncelikle fungusların PDA besiyerine ekimleri yapılmış ve 28°C'de 1 haftalık süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Büyüyen fungus kolonilerinden 50-100 mg ağırlığında parça kesilerek alınmıştır. Parçalar **ZR BashingBead™ Lysis** lizis tüplerine transfer edildikten sonra üzerine 750 µl BashingBead™ Buffer solüsyonu eklenerek bead beater cihazı yardımıyla maksimum hızda ≥ 5 dk lizis edilmiştir. Daha sonra tüpler 10.000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Pipet yardımıyla süpernetanttan 400 µl alınmış ve Zymo-Spin™ III-F filtrasyon tüplerine aktarılarak 1 dk 8.000×g'de santrifüj edilmiştir. Filtrenin altında kalan ve toplama tüpünde biriken sıvıya 1.200 µl Genomic Lysis Buffer solüsyonu eklenmiştir. Oluşan karışımdan 800 µl, DNA'nın tutunabileceği Zymo-Spin™ IICR Column filtreli tüplerine alınarak 10.000×g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki sıvı dökülerek bir önceki adım tekrarlanmıştır. Filtreli tüp yeni bir tüpe alınarak 200 µl DNA Pre-Wash Buffer solüsyonu ile yıkama işlemi yapılmış ve 10.000×g'de 1 dk santrifüj

edilmiştir. Tüpün altında kalan sıvı uzaklaştırılarak ikinci kez yıkama yapmak için 500 µl g-DNA Wash Buffer yıkama solüsyonu filtreli tüpe eklenmiştir. Tüpler 10.000 g'de 1 dk santrifüj edilerek, DNA'nın saklanacağı 1.5 ml mikrosantrifüj tüplere alınmıştır. Son olarak filtrenin üzerine 50 µl DNA Elution Buffer direkt filtrenin üzerine bırakılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA'lar, kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.3.2. İlgili Gen Bölgelerin PCR ile Çoğaltılması

1990'lardan bu yana, ITS-rDNA bölgesi fungus tanımlaması ve moleküler taksonomide yaygın kullanılan genetik belirteç olmuştur ve yakın zamanda fungus çalışmaları için evrensel DNA barkodlama yöntemi haline gelmiştir (Şekil 3.2) (Seifert, 2009; Schoch vd., 2012; Kõljalg vd., 2013). Bununla birlikte, alternatif belirteç olarak *translasyon uzama faktörü-1 alfa* (EF1-α), tür kompleksleri içindeki tür sınırlarını güvenilir bir şekilde değerlendirmek için filogenetik belirteçlerden biri olarak geliştirilmiştir (Reeb ve ark., 2004; Rehner vd., 2006; Hofstetter ve ark., 2007). Bu doğrultuda, Çizelge 3.1'de belirtilmiş olan ITS*1–5.8S*-ITS*2* ve *Translasyon Uzama Faktörü-1 alfa (*EF1-α*)* gen bölgelerine özgü primeler kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır.



Şekil 3.2. ITS1-5.8S-ITS2 bölgesini çoğaltmak için kullanılan primerlerin pozisyonları.

Çizelge 3.1. Kullanılan primerler ve özellikleri.

Gen	Primer Adı	Primer Dizisi	Ürün Boyutu	Kaynak
ITS1-5.8S-ITS2	ITS4	5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′	600 bp	White vd., (1990)
	ITS5	5′-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3′		
EF1-α	EF1T	5′-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3′	1150-1200 bp	Rehner ve Buckley (2005)
	1567R	5′-ACHGTRCCRATACCACCSATCTT-3′		

PCR reaksiyonu, Thermo Scientific DreamTaq^{TM} DNA Polymerase kullanılarak üreticinin talimatları takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Tek bir tüp (25x) için; 2,5 µl reaksiyon tamponu, 0,5 µl dNTP, 0,5 µl forward primer, 0,5 µl reverse primer, 1 µl kalıp DNA, 0,125 µl DreamTaq^{TM} DNA Polymerase enzimi ve 19,875 µl ddH_2O kullanılmıştır. Uygulanan PCR koşulları Çizelge 3.2'de gösterilmiştir. PCR işlemi sonrasında oluşan ürünler, 0.5 µg/ml etidyum bromür katkılı %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür.

Çizelge 3.2. Uygulanan PCR koşulları.

PCR Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
İlk Denatürasyon	95	120 sn	1
Denatürasyon	95	30 sn	25
Bağlanma	53	30 sn	
Uzatma	72	60 sn	
Son Uzatma	72	600 sn	1

3.3.3. Klonlama ve Sekanslama

PCR işlemi sonrasında oluşan ürünlerin klonlama vektörüne ligasyonu ve DH5-α kompotent hücresine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Transformasyon sonucu canlı kalan koloniler seçilip PCR ile doğrulama için kullanılmıştır. İstenen geni içerdiği belirlenen kolonilerden plazmid izolasyonu yapılarak DNA dizi analizine gönderilmiştir. Bu aşama aşağıda belirtilen uygulamalarla gerçekleştirilmiştir.

a. Gen Bölgelerinin pJET1.2/ blunt Cloning Vektörüne Ligasyonu

PCR yöntemi ile çoğaltılan gen bölgeleri CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) kullanılarak pJET1.2/ blunt Cloning vektörüne klonlanmıştır. Klonlama için tüpe; 10 µl 2× Reaction Buffer, 1 µl PCR ürünü, 17 µl nucleaese-free su, 1 µl DNA Blunting Enzyme eklenmiş ve 70°C'de 10 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında tekrardan buzda soğutulmuştur. Daha sonra tüpe, 1 µl pJET1.2/blunt Cloning Vector (ng/µl), 1 µl T4 DNA ligase eklenmiş ve 22°C'de 10 dk inkübe edilmiştir. Elde edilen ürün transformasyon için kullanılmıştır.

b. Kompotent Hücre Hazırlanması

E. coli DH5-α, 3 ml'lik Leura Bertani (LB) besiyerine inoküle edilerek gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Büyüyen suşun OD_{600} nm dalga boyunda ölçümü yapılarak, 30 ml LB besiyerine OD_{600} = 0,1 olacak şekilde aşılama yapılmış ve 37°C'de 1 saat çalkalayıcı inkübatöre alınmıştır. 45-50 dk sonra OD_{600} = 0,45-0,50 ulaştığında tüm sıvı falkon tüpe aktarılarak 4500 rpm'de 5 dakika çöktürülmüştür. Oluşan pellet 10 ml 100 mM'lık soğuk $CaCl_2$ ile çözdürülerek 30 dakika buzda bekletilmiştir. Sonrasında bir kez daha 4500 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. Oluşan pellet 2 ml, 100 mM'lık soğuk $CaCl_2$ içerisinde çözdürülerek +4°C'de 2 saat boyunca kullanıma hazır olması için bekletilmiştir.

c. Transformasyon

Hazırlanmış olan kompotent hücreden 200 µl ve ligasyon ürününden 3 µl alınarak bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüpünde birleştirilmiştir. Rekombinant vektörün kompotent hücresine transformasyonu için önce 30 dakika buzda daha sonra 45°C'de 2 dk ısıtıcı blokta

bekletilmiştir. Sonrasında tüpün içerisindeki karışım, 1 ml LB bulunan tüpe aktarılmış ve 37°C'de 1 saat çalkalayıcı inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 6000×g'de 3 dakika santrifüj edilmiş ve oluşan süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet çözdürülerek LB+amp agar besiyerine yayma ekim yapılmıştır. Petriler 37°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası oluşan koloniler petri üzerinde işaretlenmiş ve PCR ile doğrulama için kullanılmıştır. PCR sonucu, istenilen geni bulundurduğu tespit edilen koloniler, steril bir pipet ucu yardımıyla, temiz LB+amp agarlı besiyerine ekilmiş ve stok oluşturulmuştur.

d. Plazmid İzolasyonu

Plazmit izolasyonu Promega Wizard Plus Sv Minipreps DNA Purification Systems kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, 5 mL bakteri kültürü, LB besiyerinde 37°C'de 24 saat boyunca 180 rpm'de çalkalanarak büyütülmüştür. Kültürleme süresi sonunda, 5 ml sıvı kültür en yüksek hızda 5 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüjlenerek pelet haline getirilmiştir. Süpernatantın dikkatlice atılmasının ardından pellet, 250 µl Cell Resuspension Solution ile tamamen süspanse edilmiştir. Ardından 250 µl Cell Lysis Solution eklenip dört kez ters çevrilmiş, 10 µl Alkaline Protease Solution ilave edilerek 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Karışıma 350 µl Neutralization Solution eklenip dört kez ters çevrildikten sonra 10 dk boyunca en yüksek hızda santrifüj yapılarak berrak lizata ulaşılmıştır. Berrak lizattan alınan süpernatant, spin kolonun içine aktarılmış ve 1 dk süreyle en yüksek hızda santrifüj edilerek plasmid DNA kolona tutturulmuştur. Bağlanan DNA, daha önce etanol eklenmiş 750 µl Wash Solution ile 1 dk, ardından 250 µl aynı solüsyonla tekrarlanan bir yıkama basamağı sonrası 2 dk en yüksek hızda santrifüj edilerek temizlenmiştir. Spin kolon, steril bir 1,5 ml mikro santrifüj tüpüne aktarılmış, 100 µl nükleaz içermeyen su eklenerek 1 dk santrifüj yapılmış ve elde edilen plazmid DNA –20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.4. Dizi Analizleri

Plazmidler dizi analizi için BMLabosis firmasına gönderilmiştir. Elde edilen sekanslar NCBI GenBank veritabanında yer alan sekanslar ile BLAST yapılarak karşılaştırılmıştır. BLAST sonrası benzerlik gösteren türler kullanılarak Bioedit programında hizalama işlemi yapılmış MEGA X programı yardımıyla da filogenetik ağaçları oluşturulmuştur.

3.4. *Clinopodium serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* Bitkisinden Mikrodalga Ekstraksiyonu Yöntemi ile Esansiyel Yağın Elde Edilmesi

Bitki kuru halde temin edilmiş ve örneklerden NEOS Microwave ekstraksiyon sistemi yardımıyla esansiyel yağ ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bir beher içerisine 100 gr bitki konularak su ile ıslatılmış ve ekstraksiyon için cihaza yerleştirilmiştir. Cihazın gücü ekstraksiyon için 10 dakika 900W, 30 dakika 700W, 60 dakika 500W ve 120 dakika 300W olacak şekilde ayarlanmıştır. Süre sonunda biriken esansiyel yağ toplanarak amber şişelere alınmış ve fumigant etki denemelerinde kullanılıncaya kadar +4°C' de buzdolabında saklanmıştır (Wang vd., 2016).

3.5. *Tenebrio molitor* Üzerinde Entomopatojenik Fungusların Biyotestleri

3.5.1. *Tenebrio molitor*'un Laboratuvar Koşulları Altında Üretimi

Tenebrio molitor larvaları ve erginleri un-buğday kepeği içeren plastik kaplar içinde, 12 saat gündüz ve 12 saat gece döngüsü sağlanarak 24°C sıcaklıktaki iklimlendirme kabininde üretilmiştir. Böceğin su ihtiyacını karşılamak için taze patates dilimleri kullanılmıştır (Rodríguez-Gómez vd., 2009).

3.5.2. Spor Süspansiyonlarının Hazırlanması

Patojenite testlerinde kullanılan fungal izolatlar 1×10^5 spor/ml konsantrasyonda stok solüsyonlarından PDAY besiyeri üzerine 100 µl yayma ekim yapılmış ve 25°C'de 2-3 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Büyüme periyodunun sonunda, tek koloniler seçilerek başka bir PDAY besiyerine transfer edilmiş ve 25°C'de 4 hafta boyunca inkübe edilmiştir. Büyüme periyodunun sonunda, petri üzerine 10 ml steril % 0,1'lik Tween 80 eklenecek ve cam baget ile kazınarak sporlar elde edilmiştir. Spor süspansiyonları iki katlı tülbent ile 50 ml'lik steril falkon tüplerine süzülerek misel ve agar parçalarının uzaklaştırılması sağlanmıştır. Elde edilen süspansiyonlar 5 dk vortekslenerek homojen hale getirilmiştir. Spor konsantrasyonları Neubauer hemositometresi kullanılarak belirlenmiş ve biyotestlerde kullanılmak üzere 1×10^7 spor/ml konsantrasyonuna ayarlanmıştır. Ayrıca, sporların çimlenme yüzdesi, 100 µl spor süspansiyonun PDAY

agar üzerine yayma ekim yapılması ve 24 saatlik bir inkübasyondan sonra çimlenme özelliğinin belirlenmesiyle test edilmiştir. Germ tüpü spor çapından büyük olan sporlar çimlenmiş olarak kabul edilmiştir. Bunun sonucunda %95 oranında çimlenme görülen izolatlar patojenite testlerinde kullanılmıştır.

3.5.3. Patojenite Testleri

Patojenite testleri hastalık belirtisi göstermeyen sağlıklı larva ve erginler üzerinde yapılmıştır. Öncelikle, spor süspansiyonları tarama testi için 1×10^7 spor/ml konsantrasyonda zararlının larval dönemine püskürtme yöntemiyle uygulanmıştır. Uygulama sonrası böcekler 250 ml'lik plastik kaplara alınarak beslemeye devam edilmiştir. Çalışmada her fungal izolat için 30 böcek kullanılmış ve 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Kaplar 25-28°C olacak şekilde iklim odalarında 14 gün bekletilmiştir. Kontrol grubuna steril %0,1 Tween 80 içeren steril su uygulanmıştır. Böcekler günlük olarak takip edilmiş ve ölen böcekler 3 dakika %1'lik sodyum hipoklorit solüsyonu ile yüzey dezenfeksiyonunun ardından 3 defa steril su ile yıkanarak içerisinde nemli filtre kağıdı bulunan steril petrilere aktarılmıştır. 28°C'lik etüvde inkübasyona bırakılarak mikozlanmaları sağlanmıştır. Uygulamadan 14 gün sonra elde edilen ölüm oranları Abbott formülü kullanılarak kontrole göre düzeltilmiş ölüm oranları belirlenmiştir (Abbott, 1925). Ayrıca varyans analizi (ANOVA) ile izolatların ölüm oranları arasındaki farklılıklar ortaya konmuştur.

3.5.4. Konsantrasyon Denemeleri

Tarama testleri sonucu en yüksek virülansa sahip 2 izolatın 5 farklı konsantrasyonu (1×10^3, 1×10^4, 1×10^5, 1×10^6, 1×10^7 spor/ml kullanılarak biyotestler gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılacak süspansiyonlar stok süspansiyondan seri dilüsyon yoluyla elde edilmiştir. Biyotestler tarama testlerindeki gibi gerçekleştirilmiştir. Uygulamadan 10 gün sonra elde edilen ölüm değerleri kullanılarak izolatın zararlı üzerindeki medyan letal konsantrasyonu Probit analizi ile belirlenmiştir (Finney, 1971).

3.6. Nişoş Esansiyel Yağının *Tenebrio molitor* Üzerindeki Fümigant Etkisinin Analizi

Denemeler petri kapları (120 mm) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Petri kapaklarının iç yüzeyine 3×3 cm boyutlarında filtre kağıdı yapıştırılmıştır. Elde edilen esansiyel yağ 2, 4, 8, 16 ve 32 µl olacak şekilde otomatik pipet ile filtre kağıtlarına emdirilmiştir. Petrilere 10 gr un-kepek karışımı ve 30'ar adet *T. molitor* larvası konulmuştur. Esansiyel yağ emdirilmiş üst kapak kapatılarak 10 gün boyunca takip edilmiştir. Uygulama 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve meydana gelen ölümler günlük kayıt altına alınmıştır. Kontrol grubu da aynı şekilde 3 tekrarlı olarak tasarlanmış ve esansiyel yağ yerine 32 µl steril saf su kullanılmıştır. Biyotestler sonucu meydana gelen ölüm oranları Abbott formülü ile düzeltilmiş (Abbott 1925) ve varyans analizi uygulanarak denemelerde kullanılan konsantrasyonlar arasındaki benzerlikler ve farklılıklar istatistiksel olarak belirlenmiştir. Ayrıca probit analizi kullanılarak esansiyel yağın medyan letal konsantrasyonları belirlenmiştir (Finney, 1971).

3.7. Entomopatojenik Fungusların ve *Clinopodium serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* Esansiyel Yağının Birlikte Biyolojik Etkinlikleri

Sinerjik etki denemelerinde en yüksek etkinliğe sahip olduğu belirlenen fungus ile *C. erpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* esansiyel yağı kullanılmıştır. Çizelge 3.3'te belirtilen konsantrasyonlardaki uygulamalar gerçekleştirilerek biyolojik etmenlerin sinerjik etkisi belirlenmiştir.

Çizelge 3.3. Sinerjik etki denemelerinde kullanılan konsantrasyonlar ve uygulamalar.

Uygulama	Fungus	Esansiyel yağ
1	LC_{20}	-
2	LC_{30}	-
3	-	LC_{20}
4	-	LC_{30}
5	LC_{20}	LC_{20}
6	LC_{20}	LC_{30}
7	LC_{30}	LC_{20}
8	LC_{30}	LC_{30}

Sinerjik etki çalışmaları sonunda, kombinasyonda kullanılan fungus ve esansiyel yağ arasındaki etkileşimin türü aşağıdaki formüle göre değerlendirilmiştir.

$$CTF = (Oc - Oe) / Oe \times 100$$ CTF: kotoksisite faktörü

Oc: Kombinasyon uygulamasının meydana getirdiği ölüm yüzdesi (Yani fungus+esansiyel yağ uygulaması sonucu gözlenen ölüm yüzdesi)

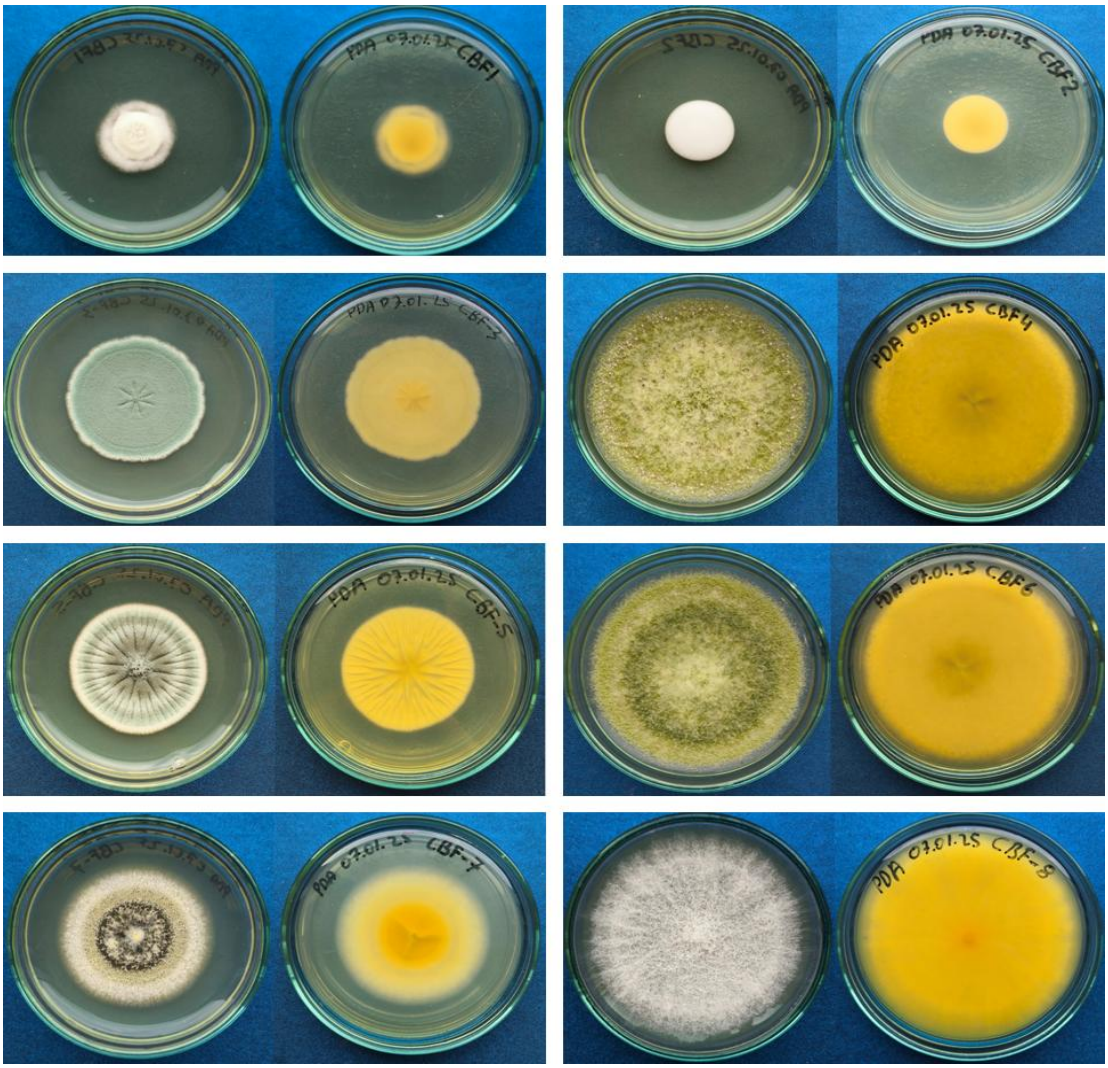
Oe: Kombinasyonu oluşturan patojenlerin tek başlarına meydana getirdikleri ölüm oranları toplamı (yani fungusun meydana getirdiği ölüm oranı+esansiyel yağın meydana getirdiği ölüm oranı)

Sonuçta; kotoksisite faktör değeri +20 ve fazlası çıkarsa etki sinerjistik, -20 ve altı çıkarsa etki antogonistik, +20 ve -20 arasında çıkarsa additif olarak değerlendirilmiştir (Ma vd., 2008).

4. BULGULAR

4.1. Entomopatojenik Fungusların Topraktan İzolasyonu ve Saflaştırılması

Arazi çalışmalarında Bilecik ilinin farklı tarım arazileri lokasyonlarından toplanan toprak örneklerinden, "Materyal ve Metot" bölümünde açıklandığı şekilde entomopatojenik fungus izolasyonu yapılmış ve toplamda sekiz adet izolat elde edilmiştir. Bu izolatlar sırasıyla CBF-1, CBF-2, CBF-3, CBF-4, CBF-5, CBF-6, CBF-7 ve CBF-8 olarak kodlanmıştır. Saflaştırma işlemi sonrasında tüm izolatların koloni morfolojileri, patates dekstroz agar (PDA) besiyerinde nokta ekim yöntemiyle inoküle edildikten sonra 10. gün sonunda değerlendirilmiştir (Şekil 4.1).



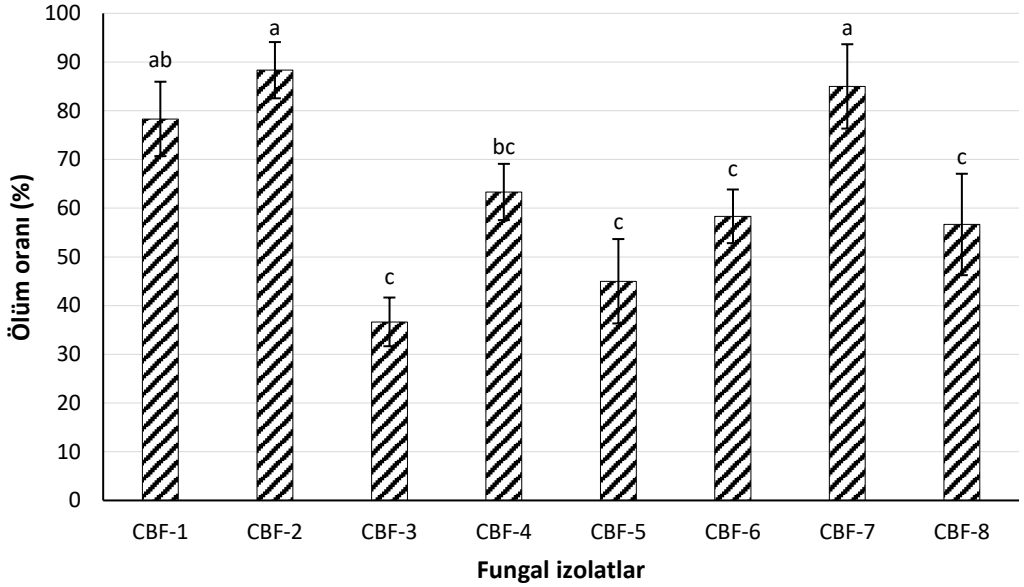
Şekil 4.1. İzole edilen tüm suşlarının petri morfolojileri. Görseller, her bir suşa ait petrilerin önden (sol) ve arkadan (sağ) görüntülerini içermektedir.

4.2. Patojenite Tarama Testleri

Saflaştırılan sekiz izolatın patojenitesi, *Tenebrio molitor* larvaları üzerinde gerçekleştirilen tarama testleri ile belirlenmiştir. Her bir izolatın 10^7 spor/ml konsantrasyonunda uygulandığı testler sonucunda, larvalarda enfeksiyonun dıştan gözlemlenebilir morfolojik belirtileri kaydedilmiştir (Şekil 4.2). Enfekte larvalarda; renkte koyulaşma, nekroz bölgelerinin oluşumu, hareket kabiliyetinde azalma, ölüm ve mikozlanma gibi karakteristik patojenik belirtiler belirgin olarak gözlemlenmiştir.

Şekil 4.2 İzole edilen tüm suşların, enfeksiyon sonrası *T. molitor* larvalarında gözlemlenen morfolojik belirtiler.

İzolatların tamamının böcek üzerinde patojen olduğu ancak virülanslarının farklı olduğu görülmüştür (ANOVA, Tukey'nin HSD testi, $p < 0,05$). CBF-2 ve CBF-7 izolatları sırasıyla %88,3 ve %85 ölüm oranı ile en etkili izolatlar olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte %36,66 ölüm oranı ile CBF-3 izolatı virülansı en düşük izolat olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3).



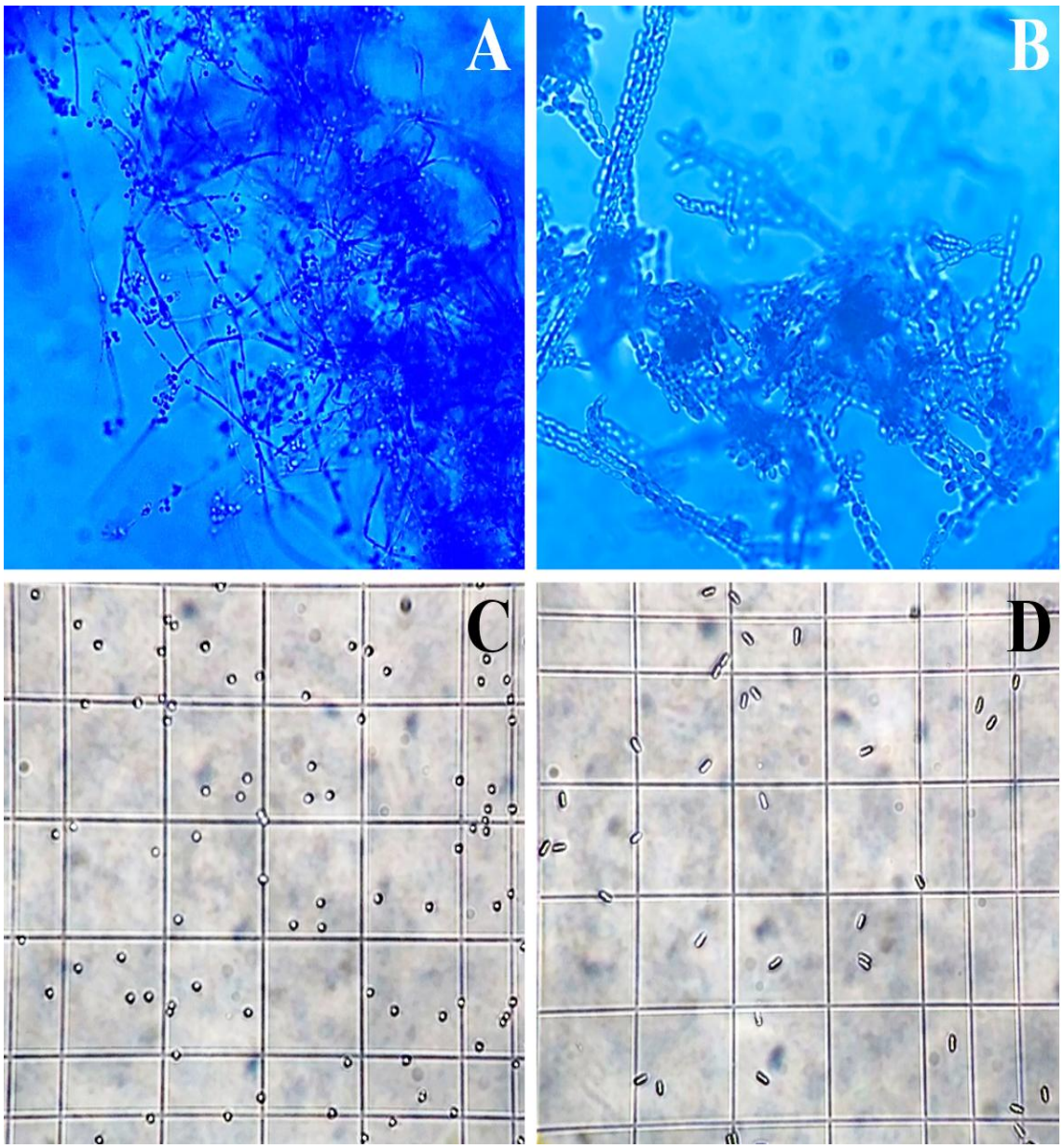
Şekil 4.3. 10^7 spor/ml konsantrasyonunda entomopatojenik fungal izolatların *T. molitor* larvaları üzerindeki etkisi. Uygulamalar, üç tekrar gerçekleştirilmiş ve 10 gün boyunca izlenmiştir. Sütunlar, biyolojik testlerden elde edilen düzeltilmiş ortalama ölüm oranlarını göstermekte olup, hesaplamalar Abbott formülüne göre yapılmıştır. Hata çubukları, ortalamalar arasındaki standart sapmayı temsil etmektedir. Farklı harflerle işaretlenen gruplar, istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir (ANOVA, Tukey'nin HSD testi, $p < 0.05$).

4.3. Seçilen İzolatların Mikroskobik ve Moleküler Karakterizasyonu

Patojenite testlerinde en yüksek mortalite oranlarını gösteren iki izolat olan CBF-2 ve CBF-7, mikroskobik ve moleküler karakterizasyon çalışmalarıyla detaylı olarak incelenmiştir. Mikroskobik incelemeler sonucunda, her iki izolatın morfolojik özellikleri ilgili cinslerin literatürde tanımlanan karakteristik yapılarıyla uyumlu bulunmuştur.

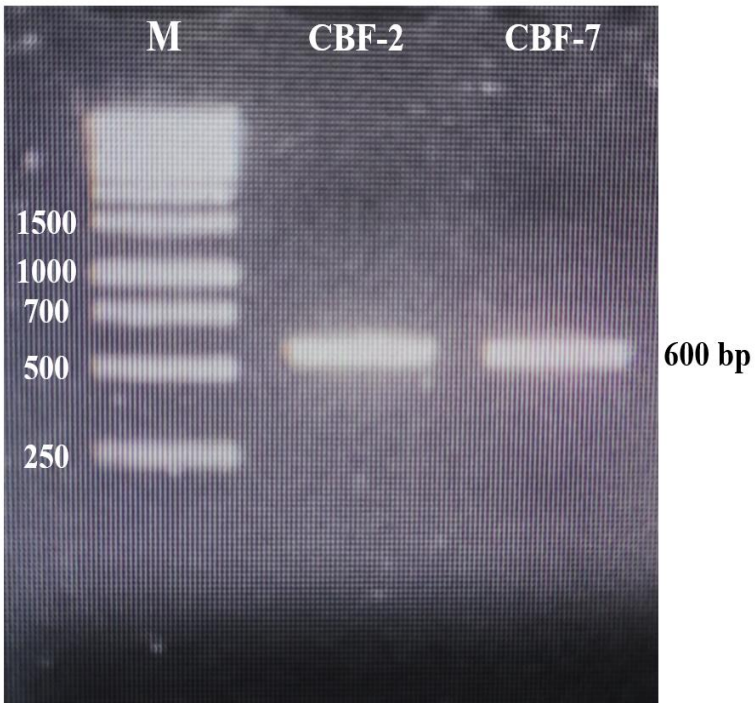
CBF-2 izolatı, *Beauveria* cinsine özgü olarak beyaz, pamuksu koloni morfolojisi göstermekte olup, mikroskobik gözlemde dallanmış konidioforlardan doğrudan oluşan oval konidilere sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4A, 4.4C). CBF-7 izolatı ise,

Metarhizium cinsinin karakteristik yeşilimsi koloni morfolojisini sergilemiş; mikroskobik olarak ise vertisilli (dairesel şekilde dallanmış) konidioforlar üzerinde sıralanan silindirik konidiler ile tanımlanmıştır (Şekil 4.4B, 4.4D).

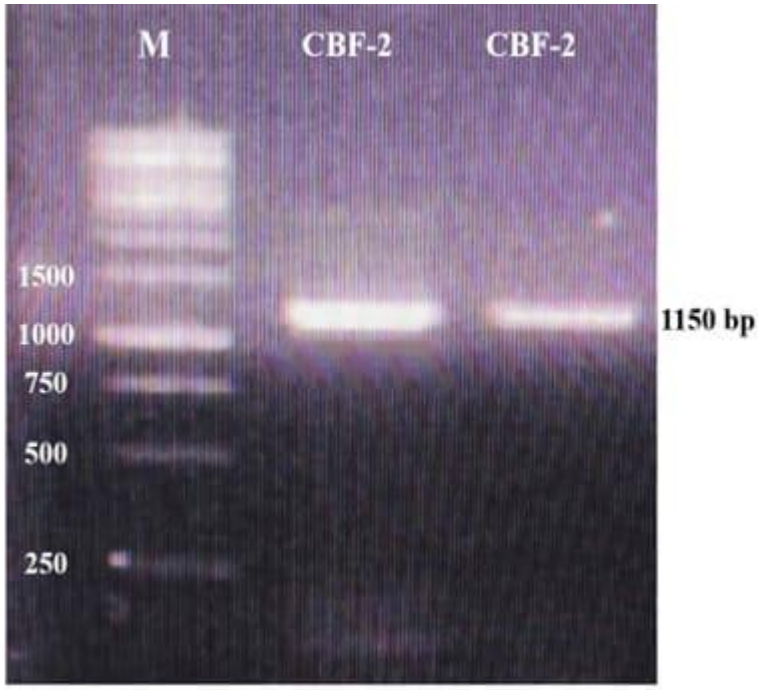


Şekil 4.4. Seçilen entomopatojenik fungusların mikroskobik yapıları ve sporları. A: CBF-2 izolatına ait misel yapılar ve konidioforlar. B: CBF-7 izolatına ait misel yapılar ve konidioforlar. C: CBF-2 izolatının sporları. D: CBF-7 izolatının sporları.

Moleküler düzeyde yapılan karakterizasyon çalışmaları kapsamında her iki izolatın DNA'sı izole edilmiş ve ITS (Internal Transcribed Spacer) ile EF1-α (elongation factor 1-alpha) bölgeleri PCR ile amplifiye edilmiştir. ITS bölgesi analizinde her iki izolat da yaklaşık 600 bp uzunluğunda bantlar vermiştir (Şekil 4.5). EF1-α bölgesinde ise yaklaşık 1150 bp büyüklüğünde belirgin bant görülmüştür (Şekil 4.6). Elde edilen PCR ürünlerinin klonlanarak *E. coli* hücresine transformasyonu sonrası doğrulanarak plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiş ve dizi analizine gönderilmiştir.

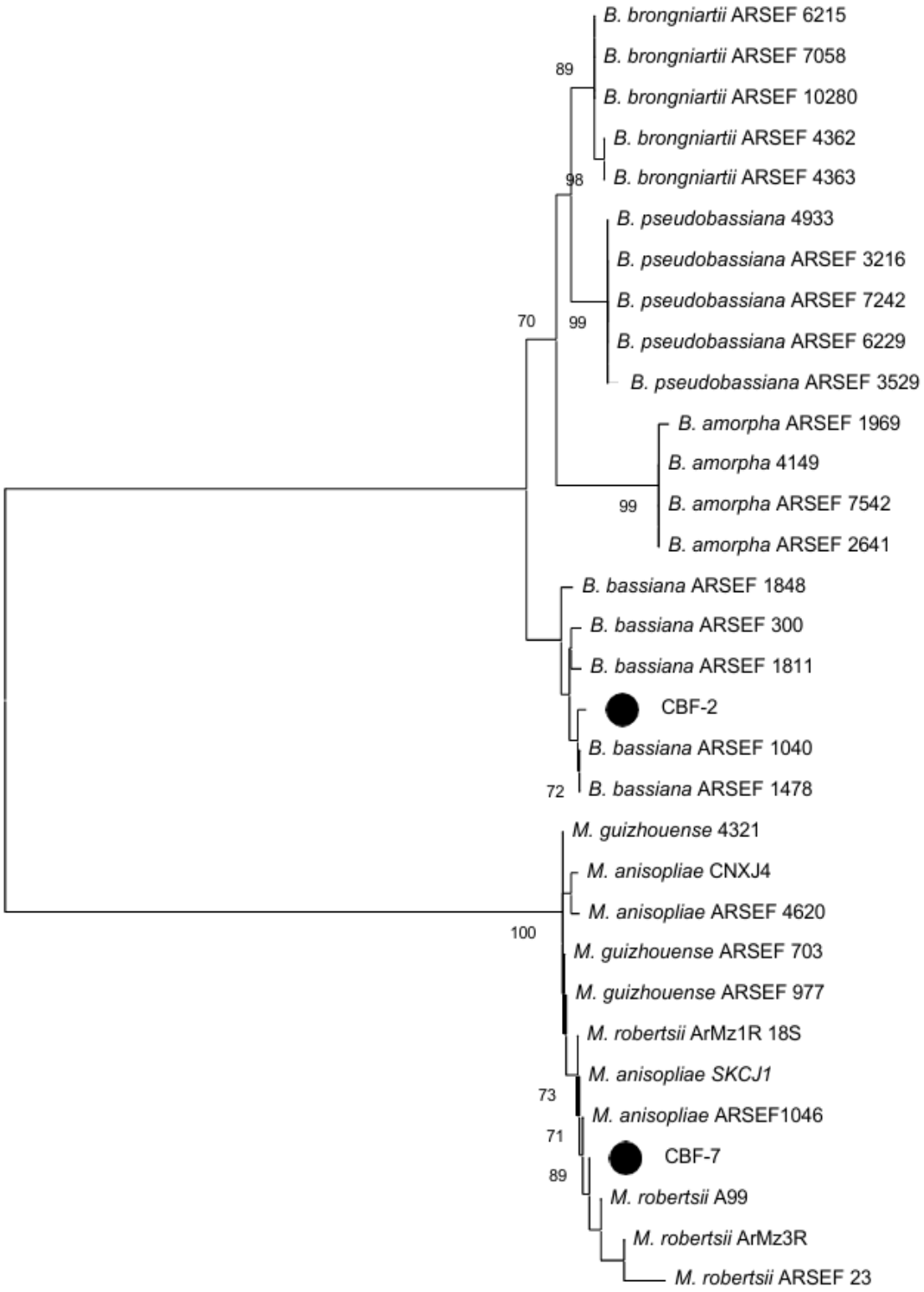


Şekil 4.5. rRNA ITS1-5.8S-ITS2 bölgesinin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen ürünlerin %1'lik agaroz jeldeki bant profilleri. Kuyucuklar sırasıyla: DNA ladder, CBF-2 ve CBF-7 izolatlarına ait PCR ürünlerini göstermektedir.

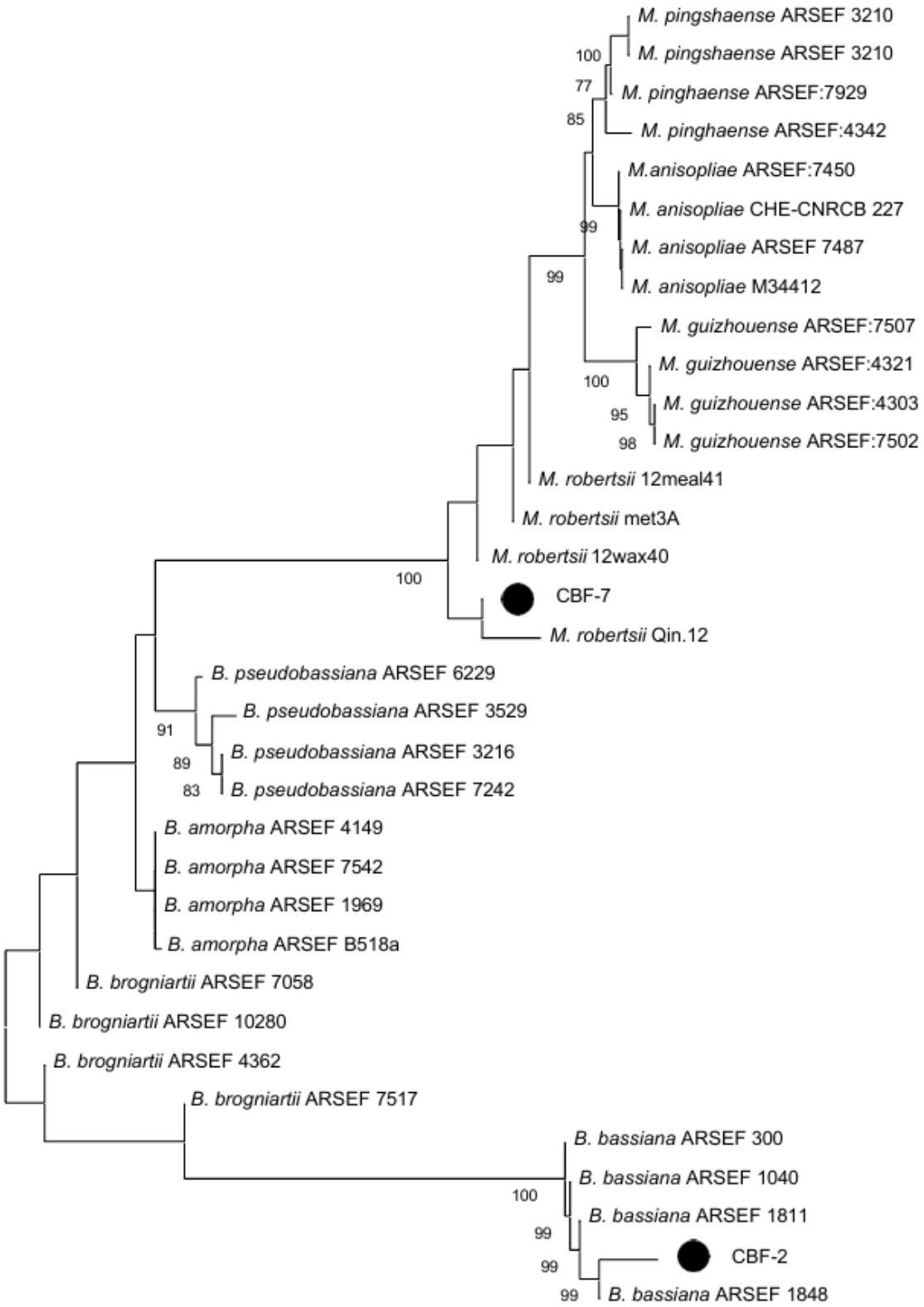


Şekil 4.6. EF1-α bölgesinin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen ürünlerin %1'lik agaroz jeldeki bant profilleri. Kuyucuklar sırasıyla; DNA ladder, CBF-2 ve CBF-7 izolatlarına ait PCR ürünlerini göstermektedir.

Sekanslar GenBank veritabanındaki dizilerle karşılaştırıldığında ITS gen bölgesine göre CBF-2 izolatı *Beauveria bassiana* EF_35 izolatı ile %99,93, CBF-7 izolatı ise *Metarhizium robertsii* ArMz1R izolatı ile %99,83 benzerlik göstermektedir. Benzer şekilde, EF-1 α gen bölgesine göre de CBF-2 izolatı, *Beauveria bassiana* Kudzu izolatı ile %100, CBF-7 izolatı ise *Metarhizium robertsii* 12wax40 izolatı ile %99,9 benzerlik göstermiştir. İzolatların moleküler sekans dizileri Ek1'de sunulmuştur. Filogenetik analizler de CBF-2 izolatının *B. bassiana*, CBF-7 izolatının ise *M. robertsii* olduğu ortaya koymuştur (Şekil 4.7, Şekil 4.8).



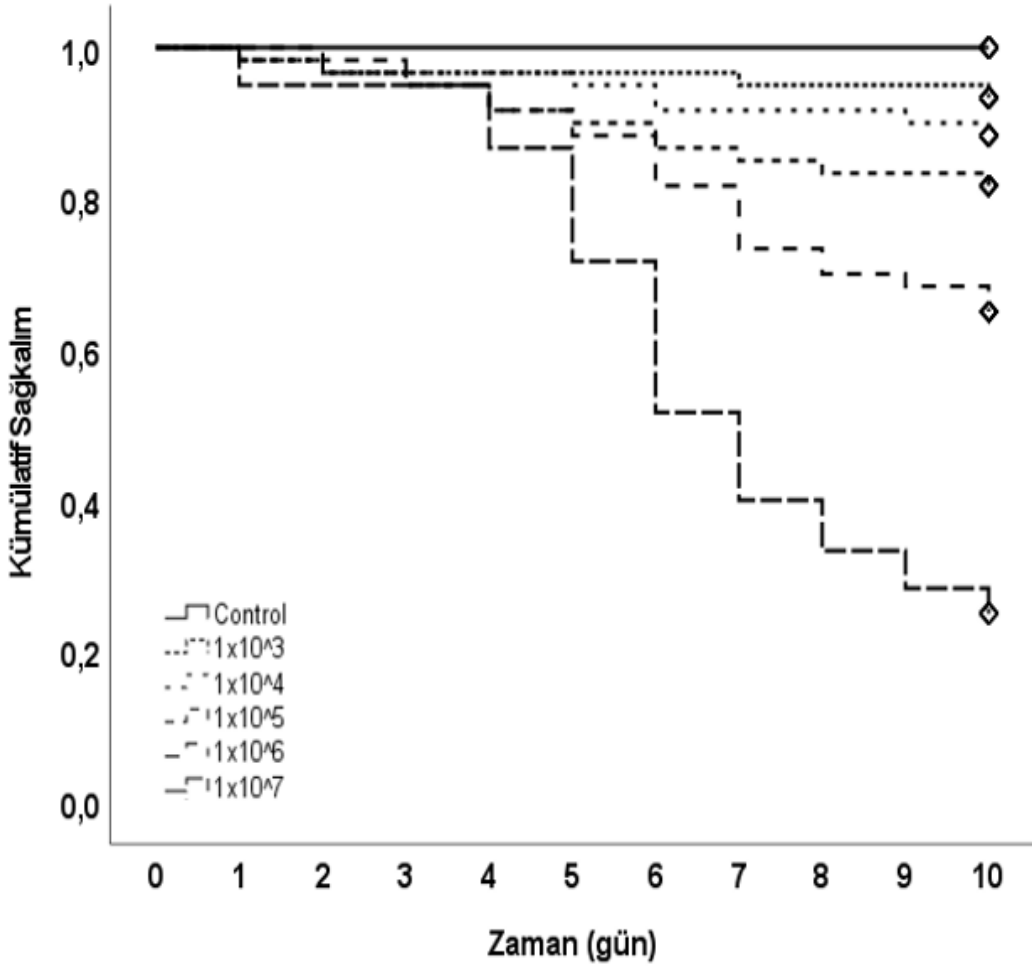
Şekil 4.7. İzolatların ITS gen bölgesinin Neighbor-Joining analizi ile filogenetik ağacı.



Şekil 4.8. İzolatların EF1-α gen bölgesinin Neighbor-Joining analizi ile filogenetik ağacı.

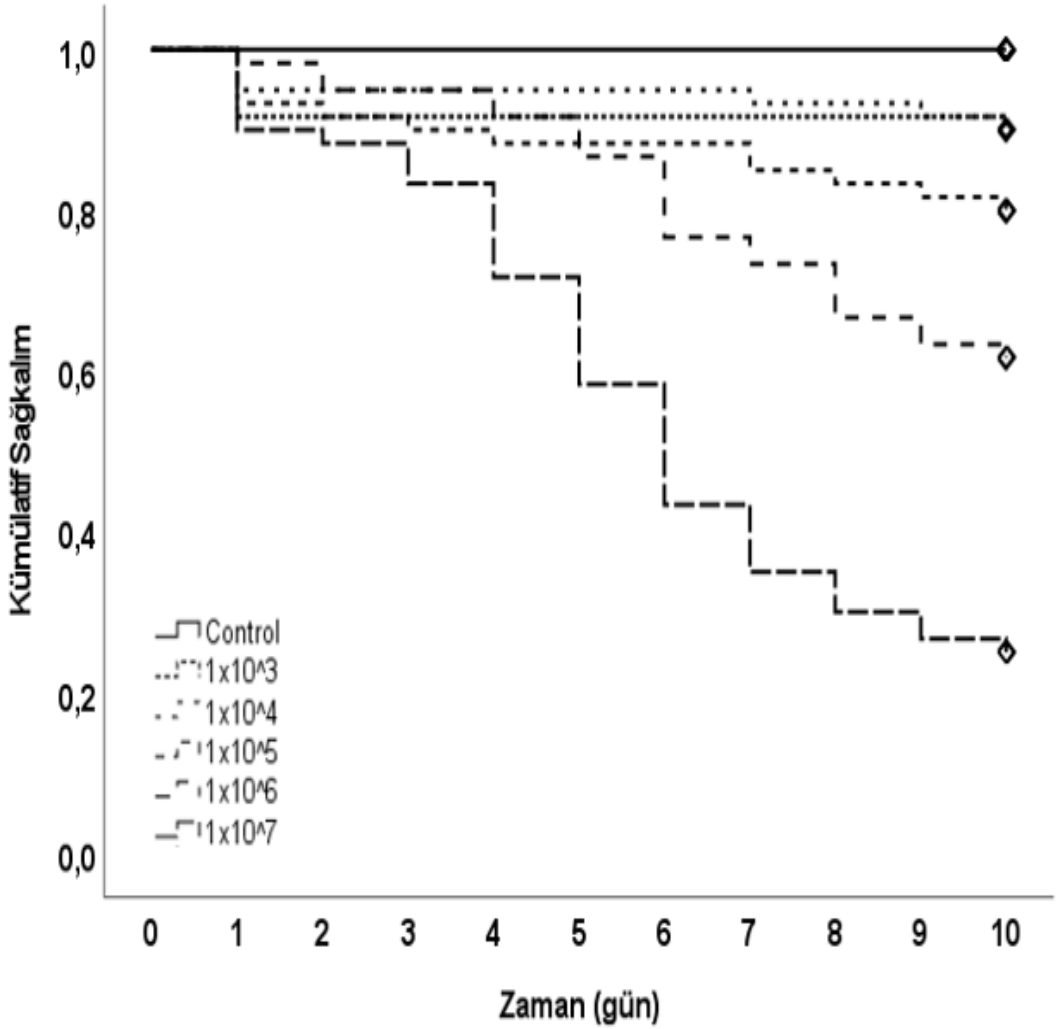
4.4. Konsantrasyon-Etki Denemeleri

Patojenite testlerinde en yüksek virülansa sahip CBF-2 ve CBF-7 izolatlarının beş farklı spor konsantrasyonu kullanılarak (10^3, 10^4, 10^5, 10^6 ve 10^7 spor/ml) biyotestler gerçekleştirilmiştir. Biyotestler sonucu elde edilen veriler Kaplan–Meier sağkalım yöntemiyle analiz edilmiştir. Şekil 4.9'da CBF-2 izolatı için farklı konsantrasyonların 10 gün boyunca larvaların sağkalım oranları üzerindeki etkisi gösterilmiş; en yüksek konsantrasyonun (10^7 spor/ml) 7. gün itibariyle %60, 10. günün sonunda ise %75 ölüm oranı oluşturduğu görülmüştür. Daha düşük konsantrasyonlarda (10^3–10^5 spor/ml) ise ölüm oranı zamanla artış gösterse de 10. gün sonunda ancak yaklaşık %7–20 aralığına ulaşmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. *T. molitor* larvalarının, CBF-2'nin beş farklı konsantrasyonuna 10 gün maruz bırakılmasının Kaplan-Meier sağkalım eğrileri.

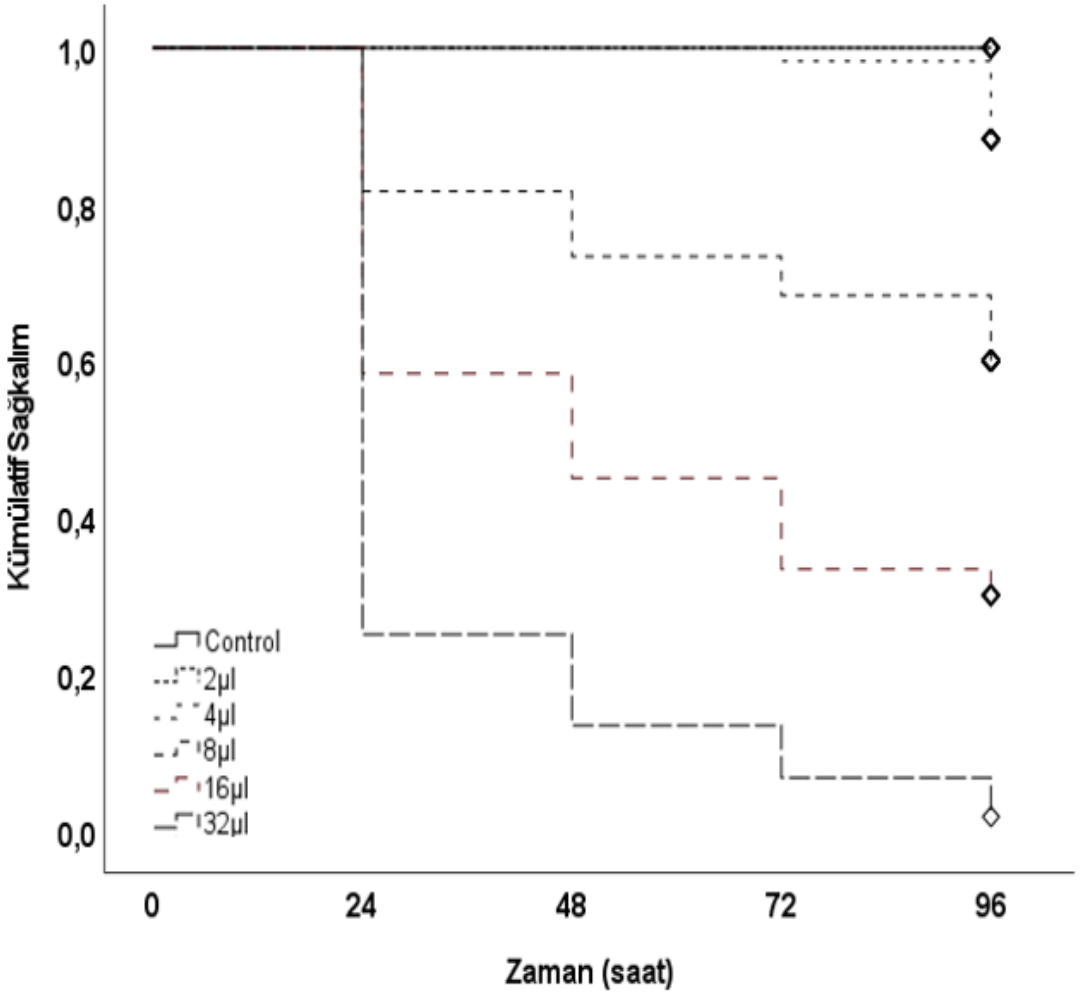
Benzer şekilde, Şekil 4.10'da CBF-7 izolatı için uygulanan beş konsantrasyonun 10 günlük sağkalım analizleri sunulmuştur. CBF-7 izolatı, özellikle 10^7 spor/ml konsantrasyonunda CBF-2'ye yakın bir mortalite profili göstermiş; 7. gün itibariyle %65, 10. günün sonunda ise %75 ölüm oranına ulaşmıştır (Şekil 4.10). Daha düşük konsantrasyonlarda (10^3–10^5 spor/ml) ise gözlemlenen ölüm oranları, CBF-2'ye kıyasla daha yüksek seyretmiştir.



Şekil 4.10. *T. molitor* larvalarının, CBF-7'nin beş farklı konsantrasyonuna 10 gün maruz bırakılmasının Kaplan-Meier sağkalım eğrileri.

4.5. *Clinopodium serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* Esansiyel Yağının Etkisi

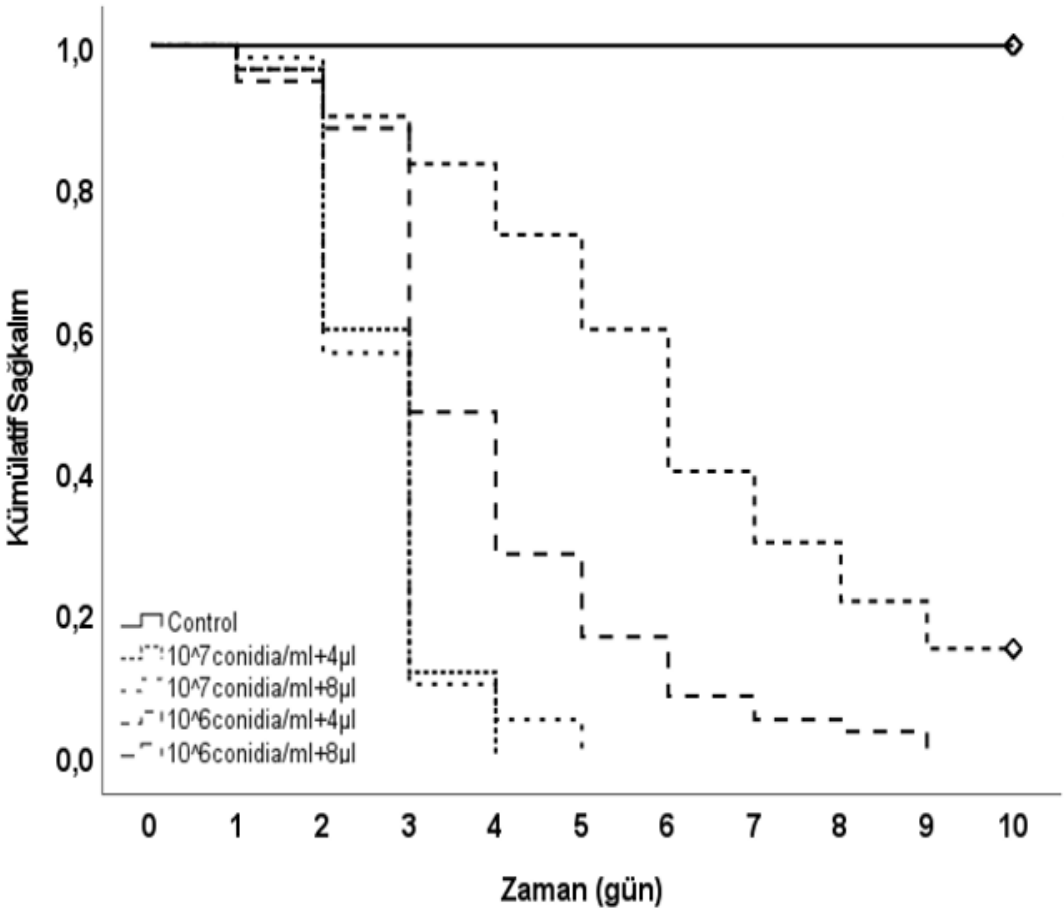
Fungusların yanı sıra, *C. serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* esansiyel yağının *T. molitor* larvaları üzerindeki etkisi beş farklı konsantrasyonda (2, 4, 8, 16 ve 32 µl) 96 saat boyunca incelenmiştir. Şekil 4.11'de esansiyel yağ uygulamalarının larvaların sağkalım oranlarına etkisini gösteren Kaplan–Meier sağkalım eğrileri yer almaktadır. En yüksek konsantrasyon (32 µl) ile 24. saat sonunda %75 ölüm oranına ulaşılırken, daha düşük konsantrasyonlarda (2–8 µl) 96 saat sonunda ölüm oranları %0–10 arasında kalmıştır (Şekil 9). Bu bulgu, *C. serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* esansiyel yağının tek başına belirgin ancak sınırlı düzeyde bir etki oluşturduğunu göstermektedir.



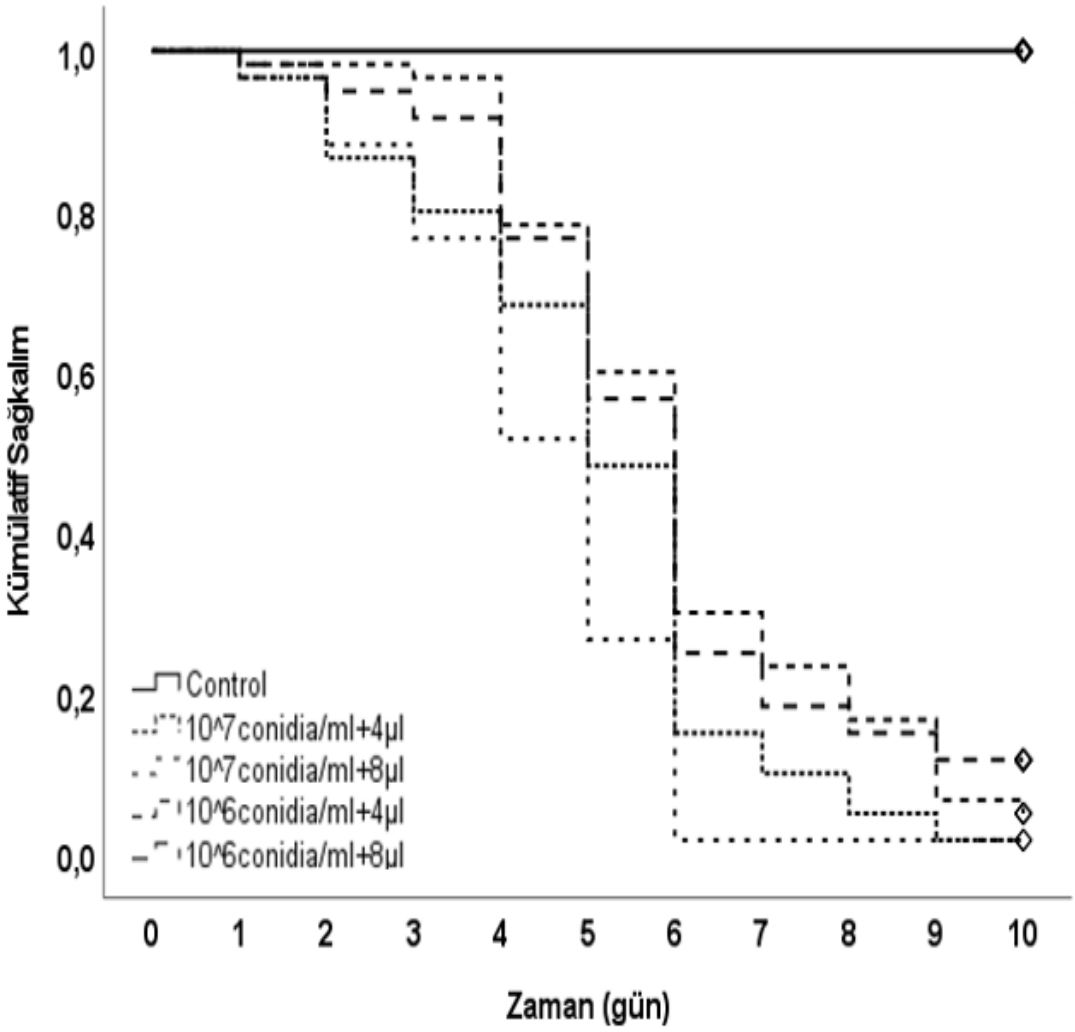
Şekil 4.11. *T. molitor* larvalarının, *C. serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* esansiyel yağının beş farklı konsantrasyonuna 96 saat maruz bırakılmasının Kaplan-Meier sağkalım eğrileri

4.6. Kombine Uygulamaların Etkinliği

Seçilen izolatlar ile *C. serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* esansiyel yağının birlikte uygulanmasının potansiyel sinerjistik etkisi, her iki etkenin farklı konsantrasyonları kullanılarak (10^6–10^7 spor/ml + 4–8 µl esansiyel yağ), 10 gün boyunca *T. molitor* larvalarında izlenmiştir. Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te kombine uygulamaların laboratuvar koşullarındaki sağkalım profilleri Kaplan–Meier eğrileri olarak sunulmuştur. En dikkat çekici bulgu, ölüm oranının, konsantrasyon kombinasyonlarının hepsinde tek başına izolat veya esansiyel yağ uygulamalarına göre anlamlı derecede ($p < 0,05$) yüksek olmasıdır. İzolat + esansiyel yağ uygulamaları, zaman içinde sürdürdüğü yüksek ölüm oranı ile tekil uygulamalara kıyasla daha güçlü bir etki göstermiştir.



Şekil 4.12. CBF-2 izolatı ile *Clinopodium serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* esansiyel yağının farklı konsantrasyonlarda 10 gün birlikte uygulanmasının *T. molitor* larvalarında gözlemlenen Kaplan-Meier sağkalım eğrileri



Şekil 4.13. CBF-7 izolatı ile *Clinopodium serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* esansiyel yağının farklı konsantrasyonlarda 10 gün birlikte uygulanmasının *T. molitor* larvalarında gözlemlenen Kaplan-Meier sağkalım eğrileri

Elde edilen mortalite verileri Probit analizi ile değerlendirilmiş ve izolatlar ile esansiyel yağın LC_{50} (letal konsantrasyon %50) ile LC_{95} (letal konsantrasyon %95) değerleri, ilgili emniyet sınırları, regresyon eğilim değerleri (slope ± SE), serbestlik derecesi (df) ve Ki-kare (χ^2) değerleri Çizelge 4.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. CBF-2 ve CBF-7 izolatlarının (spor/ml) ve *C. serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* esansiyel yağının (µl) LC_{50} ve LC_{95} değerleri.

İzolatlar	**LC_{50} (spor/ml) (Emniyet sınırları)**	**Slope ± SE**	**LC_{95} (spor/ml)**	**df**	**X^2**
CBF-2	$1,8x10^6$ ($3,5\times10^5$-$6,3\times10^7$)	0,57±0,05	$1,5\times10^9$	3	11,24
CBF-7	$1,6\times10^6$ ($2,1\times10^5$-$3,7\times10^8$)	0,52±0,50	$2,4\times10^9$	3	14,88

Esansiyel Yağ	**LC_{50} (µl) (Emniyet sınırları)**	**Slope ± SE**	**LC_{95} (µl)**	**df**	**X^2**
C. serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium	12,3 (7,5-24)	0,14±0,12	24,1	3	22,4

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, topraktan izole edilen entomopatojenik fungusların makroskobik ve mikroskobik özelliklerinin, literatürde tanımlanan *Beauveria* ve *Metarhizium* cinslerinin karakteristik özellikleri ile büyük ölçüde uyumluluk gösterdiği tespit edilmiştir. CBF-2 izolatı, beyaz ve pamuksu koloni görünümüyle *Beauveria* cinsine özgü morfolojik bir yapı sergilemiş; dallanmış konidioforlar üzerinde doğrudan oluşan oval konidiler, *B. bassiana* türü için tarif edilen "zigzag" konidiogenez modeline benzerlik göstermektedir (Bich vd., 2021; Wang vd., 2022). *B. bassiana* kolonileri genellikle yoğun bir miselyum örtüsü oluşturmaktadır ve mikroskobik incelemelerde, tek tek veya küçük gruplar halinde oval-konidili konidyoforlar oluşturduğu gözlemlenmektedir (Bich vd., 2021). CBF-7 izolatı ise yeşil tonlarındaki koloni rengi, silindirik şekilli konidiyum şekli ve bölmeli (septate) hifler yapısıyla *M. robertsii* türünün tipik morfolojisini göstermiştir (Bich vd., 2021; Geremew vd., 2024). Bu bulgular, her iki izolatın da morfolojik olarak ilgili cinslerin literatürde bildirilen tanımlarıyla eşleştiğini ortaya koymaktadır. Örneğin, Bich ve arkadaşları (2021) çalışmalarında *B. bassiana* ve *M. anisopliae* izolatlarını makroskopik (koloni morfolojisi) ve mikroskopik (konidi ve konidiofor yapıları) karakterlere dayanarak başarılı biçimde tanımlamış; daha sonra moleküler verilerle aynı türler olduğunu doğrulamışlardır.

Entomopatojenik funguslarda yalnızca fenotipik özelliklere dayanan karakterizasyonun, özellikle yakın akraba kriptik türler söz konusu olduğunda yetersiz kalabileceği bilinmektedir (Chaithra vd., 2022; Wang vd., 2022). *Beauveria* cinsi içinde makroskopik ve mikroskopik özellikler düzeyinde türler arası örtüşme sıkça görülmektedir ve yalnızca morfolojiye dayanarak kesin tür ayrımı yapmak yeterli değildir (Wang vd., 2022). Bu sebeple morfolojik karakterizasyon, izolatların cins düzeyinde ön tanısı amacıyla önemli bilgiler sağlasa da tür düzeyindeki tanımlamanın güvenilirliği için moleküler analize de ihtiyaç duyulmaktadır (Chaithra vd., 2022).

İzolatların kesin tür teşhisini yapmak ve morfolojik bulguları desteklemek amacıyla ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesi ile EF1-α (Elongasyon Faktörü 1-alfa) gen bölgesi dizileme analizleri gerçekleştirilmiştir. ITS bölgesi, fungusların evrensel barkod bölgesi olarak geniş çapta kabul görmektedir ve filogenetik düzeyde tür ayrımında sıklıkla kullanılmaktadır (Chaithra vd., 2022). Bu bölgede türler arası dizilim farklılıklarının

genellikle belirgin olmasından dolayı, ITS sekansları entomopatojenik fungusların ilk basamak tanısında tercih edilmektedir (Chaithra vd., 2022). Nitekim yüksek kalitedeki genom verilerine dayanan kapsamlı analizler, funguslarda en yüksek polimorfizmin çoğunlukla ITS bölgelerinde toplandığını göstermektedir (Stadler vd., 2020). Bununla birlikte, tek bir gen bölgesine dayanarak tür teşhisi yapmak her zaman yeterli olmayabilir; özellikle *Beauveria* ve *Metarhizium* gibi cinslerin içinde bazı yakın türlerin ITS dizileri çok benzer olabileceğinden, ilave gen bölgelerinin analizi önerilmektedir (Chaithra vd., 2022; Wang vd., 2022).

Bu çalışmada seçilen ikinci bölge olan EF1-α, kodlayıcı bir tek kopya gen olması ve evrimsel olarak daha fazla çeşitleme sunması sebebiyle entomopatojenik funguslarda tür ve soy içi ayrımlarda değerli bilgiler sağlamaktadır (Rehner ve Buckley, 2005). Özellikle *Beauveria* cinsi için ITS ile birlikte EF1-α geninin kullanılması, küresel düzeyde farklı soyların ayrımında ve tür çeşitliliğinin ortaya konmasında etkili bir strateji olarak rapor edilmiştir (Chaithra vd., 2022). Rehner ve Buckley (2005) tarafından gerçekleştirilen kapsamlı bir analizde, dünya genelinden toplanan *B. bassiana* türüne ait izolatların ITS ve EF1-α dizileri birlikte değerlendirilmiş; morfolojik ve moleküler filogenetik verilerin bütüncül analiziyle tür içi ve türler arası varyasyonlar başarılı şekilde ortaya konulmuştur (Rehner ve Buckley, 2005). Dolayısıyla, bu çalışmada ITS ve EF1-α bölgelerinin seçilmiş olması, literatürdeki bu yaklaşımlarla uyumlu olmakla birlikte izolatların, çoklu-bölge (multi-locus) sekanslama yöntemi ile güvenilir olarak tanımlanması hedeflemiştir.

CBF-2 ve CBF-7 izolatlarının hem ITS hem de EF1-α bölgelerinden elde edilen dizileri, GenBank veritabanındaki referans sekanslarla karşılaştırılmıştır. ITS bölgesi için her iki izolat da ~600 bp'lik tek bant vermiş ve CBF-2 izolatının *Beauveria bassiana* EF_35 izolatı ile %99,93 benzerlikte olduğunu ve CBF-7 izolatının ise *Metarhizium robertsii* ArMz1R izolatı ile %99,83 benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. EF1-α bölgesi (~1150 bp) için de benzer şekilde, CBF-2 izolatı *Beauveria bassiana* Kudzu izolatı ile %100, CBF-7 izolatının ise *Metarhizium robertsii* 12wax40 izolatı ile %99,9 benzerlik göstermiştir. *M. robertsii*, Bischoff ve arkadaşlarının (2009) yaptıkları çalışmaya kadar *Metarhizium anisopliae sensu lato* içinde "soğuk-aktif" izolat grubu içerisinde bulunmaktaydı. Ancak çoklu-lokus filogenetik analizlerle, *M. robertsii*'nin yeniden

değerlendirerek, *M. anisopliae* kompleksinden güvenle ayırt edilebileceğini ve ayrı bir tür olarak tanımlanması gerektiğini göstermişlerdir (Bischoff vd., 2009).

Güncel literatür, entomopatojenik fungusların taksonomisi ve tür ayrımında çoklu gen bölgelerine dayalı filogenetik analizlerin önemine vurgu yapmaktadır. Özellikle *Beauveria* cinsi içerisinde, yakın akraba türlerin varlığı ve fenotipik benzerlikleri nedeniyle, tür sınırlarının doğru çizilebilmesi için çok lokuslu dizi analizi rutin hale gelmiştir (Wang vd., 2022). Rehner ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, *B. bassiana sensu lato* ve *B. brongniartii sensu lato* kompleksleri içindeki popülasyonlar dört lokus (*Bloc* intergenik bölgesi ile EF1-α, *RPB1* ve *RPB2* kodlayan genler) kullanılarak filogenetik olarak incelenmiş ve altı yeni kriptik tür tanımlanmıştır (Rehner vd., 2011). Bunu takiben, yine çoklu-lokus dizilerin birleştirilmesiyle yürütülen çalışmalar sonucunda *Beauveria* cinsine ait çok fazla sayıda yeni tür ve yeni kombinasyon tanımlanmıştır (Robène-Soustrade vd., 2015; Imoulan vd., 2016; Chen vd., 2018). Benzer biçimde, *Metarhizium* cinsinde de Bischoff ve Rehner (2009) ile Kepler ve ark. (2017) gibi araştırmacılar, *beta-tübülin*, *RPB1/RPB2*, EF1-α ve mitokondriyal gen dizileri dahil olmak üzere çoklu gen dizilerini kullanarak *M. anisopliae* tür kompleksini yeniden düzenlemiş ve farklı türleri ortaya koymuşlardır (örn. *M. robertsii, M. brunneum, M. guizhouense* vb. ayrımları). Dolayısıyla, bu çalışma kapsamında iki ayrı lokustan elde edilen verilerin birlikte değerlendirilmesi, literatürdeki bu polifazik (çok yönlü) yaklaşımla uyumludur ve seçilen CBF-2 ve CBF-7 izolatlarının tür kimliklerinin sağlam temellere oturtulmasını sağlamıştır.

Bu çalışmada elde edilen bulgular, izole edilen entomopatojenik fungusların, *Tenebrio molitor* larvalarına karşı yüksek düzeyde biyolojik etkinlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Sekiz entomopatojenik izolatın *Tenebrio molitor* larvaları üzerinde gerçekleştirilen patojenite tarama testleri, izolatlar arasında belirgin virülans farklılıkları olduğunu ortaya koymuştur. Laboratuvar koşullarında farklı spor konsantrasyonlarında uygulanan yerel fungus izolatları, *T. molitor* larvalarında anlamlı oranlarda ölüm meydana getirmiştir. Özellikle CBF-2 ve CBF-7 kodlu iki izolat, 10 günlük gözlem süresince diğerlerine kıyasla anlamlı derecede daha yüksek mortalite oranları üretmiştir (ANOVA ve Tukey HSD, $p<0,05$). Bu iki izolatın moleküler olarak *B. bassiana* ve *M.*

robertsii olarak tanımlanması, literatürde de bu türlerin entomopatojenik etkinliğinin yüksek olmasıyla paralellik göstermektedir.

Test edilen izolatlar arasında CBF-2 ve CBF-7 suşlarının LC değerleri bakımından dikkat çekici farklılıklar gözlemlenmiştir. Bu çalışmada *B. bassiana* olarak tanımlanan ve etkili olarak seçilen ilk suş CBF-2, düşük LC_{50} değerine sahip olup yüksek öldürücülük potansiyelini göstermiştir. Benzer şekilde literatürde de *B. bassiana* suşlarının güçlü virulansı çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Örneğin Mishra ve Modi (2022) tarafından Helicoverpa armigera larvalarında yürütülen bir araştırmada, *B. bassiana* PSC-13 izolatının en düşük LC_{50} ve LC_{90} değerlerine sahip olup en virulant suş olarak belirlendiği, onu daha yüksek LC değerleriyle bir *Metarhizium* suşunun izlediği rapor edilmiştir (Mishra ve Modi, 2022). Bu durum, farklı tür ve suşlar arasında biyolojik etkinlik farkları bulunabileceğini göstermektedir. Nitekim *B. bassiana* türü içinde bile farklı izolatların etkinliği değişebilmektedir. Li ve arkadaşlarının (2024) altı yerel *B. bassiana* suşunu *Bactrocera dorsalis* üzerinde karşılaştırdığı çalışmada, suşlardan biri (B4) diğerlerini geride bırakarak ergin sineklerde ~%91 ölüme varan en yüksek mortaliteyi sağlamıştır (Li vd., 2024). Bu bulgu, tek bir tür içerisindeki genetik farklılıkların bile virülensi ciddi ölçüde etkileyebildiğini vurgulamaktadır.

M. robertsii olarak tanımlanan diğer etkili suş CBF-7 de oldukça düşük LC değerleri sergileyerek yüksek bir biyolojik etkinlik göstermiştir. Literatürde *M. robertsii* ile ilgili benzer güçlü etkilere rastlanmaktadır. Zheng ve ark. (2024), *Monochamus alternatus* adlı kabuk böceğinin larvalarına karşı yeni bir *M. robertsii* suşunu test etmiş ve bu suş için LC_{50} değerini $1{,}93\times10^{6}$ spor/mL, LC_{90} değerini ise $1{,}35\times10^{7}$ spor/mL olarak rapor etmişlerdir (Zheng vd., 2024). Bu düşük konsantrasyon değerleriyle elde edilen yüksek mortalitenin, ilgili suşun oldukça virulant olduğunu gösterdiği vurgulanmıştır. Bu durum, yeterli konsantrasyonlarda uygulandığında her iki fungus türünün de hedef zararlı popülasyonunu büyük oranda baskılayabildiğini göstermektedir.

Literatürde *Beauveria bassiana* ve *Metarhizium anisopliae* gibi yaygın entomopatojenik fungusların *T. molitor'*u enfekte ederek yüksek mortalite oranlarına yol açtığı bildirilmektedir. Örneğin, Eski ve Gezgin'in (2022) yaptığı bir çalışmada yerel bir *B. bassiana* izolatının, farklı larva dönemlerinde %100'e varan ölüm oranlarına ulaştığı bildirilmiştir (Eski ve Gezgin, 2022). Benzer şekilde, Vivekanandhan ve arkadaşlarının

(2024) yaptığı bir çalışmada *Metarhizium rileyi* fungusunun da sarı un kurdu erginlerinde 12 gün içinde %100, larvalarda ise %92 mortaliteye ulaştığı rapor edilmiştir (Vivekanandhan vd., 2024a). Bu veriler, entomopatojenik fungusların *T. molitor* üzerinde son derece etkili olabildiğini göstermektedir.

Çok sayıda araştırma, *B. bassiana* ve *M. anisopliae* tür kompleksine ait suşların geniş bir konak yelpazesinde yüksek öldürücülük sergilediğini bildirmektedir. Örneğin, küresel ölçekte *B. bassiana'nın* 700'den fazla böcek türünde enfeksiyon yapabildiği ve pek çok ticari biyopestisit ürününün etken fungusu olduğu rapor edilmiştir (Vivekanandhan vd., 2024b). Bu fungusın geniş konak aralığı ve çevresel koşullara dayanıklı sporları sayesinde tarım zararlılarıyla mücadelede etkili bir biyoajan olduğu vurgulanmaktadır (Fargues vd., 1997). *M. anisopliae* ve yakın akrabası *M. robertsii* de benzer şekilde dünya çapında toprak kökenli yaygın entomopatojenler olup, *Metarhizium*'un *Anisoplia austriaca* isimli hububat zararlısına karşı kullanımı, ilk ticari fungus bazlı böcek ilacı uygulamalarının konusu olmuştur (Maniania, 1992). Güncel araştırmalar, *M. robertsii*'nin yalnızca böcek patojeni olmayıp bitki köklerinde endofit olarak yaşayarak bitki gelişimini teşvik etme ve bazı bitki patojenlerini baskılama gibi ekolojik roller de üstlenebildiğini göstermektedir (Sasan ve Bidochka 2013; Mukherjee ve Vilcinskas 2018; Sharma vd., 2018). Bu durum, *M. robertsii*'nin çevrede uzun süre varlığını sürdürebilen ve fırsatçı bir yaşam döngüsüne sahip bir tür olduğuna işaret etmektedir; bu da tarımsal biyokontrol uygulamalarında süreklilik açısından avantaj sağlama potansiyeline sahiptir.

Yapılan çalışmalarda, *T. molitor* larvalarında gözlemlenen enfeksiyon semptomları, entomopatojen fungus enfeksiyonlarının literatürde tanımlanan tipik belirtileriyle uyumluluk göstermiştir. Deneylerde, enfekte larvalarda ilk olarak hareket kabiliyetinde azalma, vücut renginde koyulaşma (melanizasyon) ve deri üzerinde matlaşma gibi durumlar fark edilmiştir. İlerleyen günlerde larvaların beslenmeyi kestiği, bazı bireylerin yüzeyinde nekrotik lekeler oluştuğu ve genellikle ölümlerin başladığı kaydedilmiştir. Enfekte kadavralar, yüksek nemli koşullarda fungusın sporulasyonuna uğramış ve beyaz veya yeşilimsi misel örtüsü ile kaplanarak tipik muskardin (muscardine) enfeksiyon görüntüsünü sergilemiştir.

Entomopatojenik funguslar, konak böceğin kutikulasına tutunan konidyalarının çimlenmesi ile enfeksiyona başlamaktadır; mekanik basınç ve enzimatik aktivite

kombinasyonu ile sert kitinöz kütikül bariyerini delerek hemolenfe ulaşmakradırlar (Zimmermann 2007a; Shahid vd., 2012; Vivekanandhan vd., 2024b). Proteaz, kitinaz ve lipaz gibi enzimlerin ardışık salgılanması, böceğin dış iskeletini oluşturan protein, kitin ve lipit matriksini parçalayarak fungusın konak içine invazyonunu mümkün kılmaktadır (Zimmermann 2007a; Vivekanandhan vd., 2024b). Konak hemolenfinde çoğalan miselyum, besin dokularını tahrip etmekte ve çoğu zaman böceğin bağışıklık sistemi tarafından başlatılan yoğun bir melanizasyon (kararma) tepkisine sebep olmaktadır (Vivekanandhan vd., 2024b). Sonuçta enfekte böcek genellikle birkaç gün ila birkaç hafta içinde ölmekte ve uygun çevre koşullarında kadavra üzerinden fungus sporulasyonu gerçekleşerek enfeksiyon döngüsü tamamlanmaktadır (Shin vd., 2020; Swathy vd., 2024).

Bu çalışmada *T. molitor* larvalarında gözlemlenen renk koyulaşması, hareket azalması, ölüm ve fungus misel çıkışı gibi belirtiler, literatürde tarif edilen patogenez süreci ile tam olarak paralellik göstermiştir. Tarama testlerinde, CBF-2 (*B. bassiana*) izolatının enfekte ettiği larvalarda beyaz renkli "beyaz muskardin" adı verilen misellenme, CBF-7 (*M. robertsii*) izolatının enfekte ettiği larvalarda ise yeşilimsi sporulasyon ile karakterize edilen "yeşil muskardin" görüntüsü saptanmıştır. Bu bulgular, entomopatojenik fungus enfeksiyonunun makroskopik semptomları bakımından da literatürle uyumlu bir tablo sunmaktadır. Elde edilen patojenite test sonuçları diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında, *B. bassiana* ve *Metarhizium* türlerinin hedef konaklarda yüksek mortalite oluşturma potansiyelinin tutarlı biçimde gözlendiği görülmektedir. Örneğin, Praprotnik ve arkadaşlarının (2021), 71 farklı entomopatojen fungus izolatını *T. molitor* üzerinde test ettikleri çalışmada, *Beauveria bassiana* ve *Metarhizium brunneum* (*M. anisopliae* kompleksinden bir tür) izolatlarının %100 larva ölümleri ile en yüksek virülansı gösterdiğini rapor etmişlerdir (Praprotnik vd., 2021). Benzer şekilde, Wang ve arkadaşları (2022), Çin ve Tayland'dan topladıkları çeşitli *Beauveria* türlerini ipekböceği (*Bombyx mori*) ve un kurdu (*T. molitor*) larvaları üzerinde biyolojik etkinlik açısından karşılaştırmış; *B. bassiana* kompleksine ait izolatların her iki konakta da yüksek öldürücülük sergilediğini, buna karşın *B. brongniartii* alt grubuna giren bazı türlerin dar konak spektrumlu ve düşük virülanslı olduğunu ortaya koymuşlardır (Wang vd., 2022). Bu sonuçlar, bu çalışmada yapılan deneyler sonucunda, seçilen *B. bassiana* ve *M. robertsii* suşlarının tarama testlerinde öne çıkışını açıklamaktadır. Esansiyel yağ

denemelerinde de elde edilen bulgular, en etkili entomopatojenik fungus izolatları ile *C. serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* esansiyel yağının kombinasyon halinde uygulanmasının, *T. molitor* larvaları üzerindeki toplam öldürücülükte değişimler meydana getirdiğini göstermektedir. Yapılan istatistiksel analizler, yapılan kombinasyonların tekil uygulamalara kıyasla daha yüksek mortalite sağladığını ortaya koymuştur.

Literatürde de benzer kombinasyonların etkisine dair çalışmalar mevcut olup, elde edilen sonuçlar kombinasyonun bileşenlerine bağlı olarak değişebilen etkileşim tiplerine işaret etmektedir (Bitencourt vd., 2022; Lak vd., 2022). Sinerjik etki, bir entomopatojen ile bir esansiyel yağın birlikte uygulanması sonucunda beklenen toplam ölüme kıyasla anlamlı derecede daha yüksek ölüm oranı gözlenmesi durumudur. Lak vd. (2022) yaptıkları çalışmada *Metarhizium anisopliae* ile bazı bitkisel esansiyel yağları (rezene, lavanta, tarhun yağları) bir arada kullanarak baklagil tohum böceği *Acanthoscelides obtectus* üzerinde denemeler yapmış ve kombinasyonların çoğunda additif veya sinerjik etki elde etmiştir. Özellikle rezene ve lavanta yağlarının fungus ile birlikte uygulanması, böcek ölüm oranlarını tek başına uygulamalara kıyasla anlamlı düzeyde artırmış ve sinerjistik bir etki ortaya çıkmıştır (Lak vd., 2022). Yazarlar, *A. obtectus* erginlerinin hem söz konusu yağlara hem de fungus izolatlarına duyarlı olduğunu, birlikte uygulandıklarında yağın böceğin savunma mekanizmalarını zayıflatıp fungusın enfeksiyonunu kolaylaştırdığı ihtimalini dile getirmiştir. Benzer biçimde, Bitencourt vd. (2022) *Beauveria bassiana* ve *Metarhizium anisopliae* gibi fungusların *Schinus molle* (ağaç biberi) esansiyel yağı ile kombinasyonunu *Aedes aegypti* sivrisinek larvalarına karşı denemiş ve bu kombinasyonun tek başına fungus veya yağ uygulamalarına göre daha yüksek öldürücülük gösterdiğini tespit etmiştir (Bitencourt vd., 2022). Bu çalışmada fungus + esansiyel yağ uygulaması, sivrisinek larvalarında hızlı bir ölüm meydana getirmiş ve "iki çevre dostu etmenin kombinasyonu" olarak tanımlanan bu yaklaşımın vektör mücadelesinde umut vadettiği belirtilmiştir (Bitencourt vd., 2022).

Entomopatojenik funguslar ile bitkisel esansiyel yağların kombinasyon halinde kullanımı, doğru eşleştirmeler yapıldığında sinerjik etkiyle mücadele etkinliğini artırma potansiyeline sahiptir. Ancak uygun olmayan kombinasyonlar veya yüksek antifungal özelliğe sahip yağlar kullanıldığında, fungus aktivitesinin baskılanmasıyla antagonistik

etki ortaya çıkabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle, farklı bitkisel yağlar ve entomopatojenik suşlar arasında uyumluluk testleri yapılması önem arz etmektedir. Bu çalışmada, *C. serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* yağı ile en etkili fungus izolatlarının kombinasyonu belirgin bir başarı göstermiş olup sinerjik etkiye yakın bir mortalite artışı sağlamıştır. Bu bulgu, doğru şartlarda bu iki biyolojik etmenin entegre kullanımının *T. molitor* kontrolünde beklenenden daha yüksek bir etki yaratabileceğini düşündürmektedir.

Entomopatojenik funguslar başta olmak üzere mikrobiyal biyokontrol ajanları, tarımsal zararlıların yönetiminde giderek önem kazanan sürdürülebilir alternatiflerdir. Günümüzde *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria* gibi türlere ait çok sayıda suş, biyopestisit formülasyonları olarak ticarileştirilmiş, kullanıma sunulmuş ve son birkaç on yılda 170'den fazla entomopatojen fungus suşunun "mikopestisit" adı altında pazara girdiği bildirilmiştir (Bamisile vd., 2021). Bu durum, mikrobiyal ajanların laboratuvardan uygulamaya geçiş potansiyelinin yüksek olduğunu göstermektedir. Entomopatojenik fungusların biyoteknolojik potansiyeli, sadece doğrudan insektisit etkiyle sınırlı değildir; aynı zamanda bu organizmaların çeşitli yan faydaları ve kullanım alanları da keşfedilmektedir.

Bu organizmalar, farklı konak bitkileri kolonize etme yeteneğine sahip olup fungal endofitler formunda bulunabilmekte (Bamisile vd., 2018; Wakil vd., 2020), rizosfer kolonizatörleri olarak işlev görebilmekte (Hu ve St Leger, 2002), bitki patojenlerine karşı antagonistik etki gösterebilmekte (Ownley vd., 2010; Jaber ve Ownley, 2018), bitki gelişimini teşvik eden ajanlar/biyogübreler olarak görev alabilmekte (Liao vd., 2014; Lopez ve Sword, 2015; Jaber ve Enkerli, 2017) ve yeni biyoaktif bileşikler ile çeşitli sekonder metabolitlerin kaynağı olarak kullanılabilmektedirler (Hu vd., 2016; Al-Ani vd., 2021). Bamisile ve arkadaşlarının (2021) derlemesinde entomopatojenik fungusların bu "gizli" potansiyellerine dikkat çekilmiş ve böcek öldürmenin ötesinde üstlenebileceği roller vurgulanmıştır (Bamisile vd., 2021). Dolayısıyla, bu organizmalar sadece birer "böcek patojeni" değil, aynı zamanda biyoteknolojik olarak çok yönlü kullanılabilecek bir kaynak olarak da değerlendirilmektedir.

Mikrobiyal biyokontrol ajanlarının avantajları, klasik kimyasal pestisitlere kıyasla birçok açıdan öne çıkmaktadır. Entomopatojenik fungus bazlı biyopestisitler, çevre ve insan

sağlığı açısından daha güvenlidir. Bu fungusların memelilere toksisitesi son derece düşüktür ve ürünlerde zararlı kimyasal kalıntı bırakmamaktadırlar (Strasser, 2000; Zimmermann, 2007a; Zimmermann, 2007b). Bu çevre dostu özellikleri, özellikle sürdürülebilir tarım ve entegre mücadele programlarında onları cazip kılmaktadır. Bir başka önemli avantaj ise, konukçu özgüllüğünün genellikle yüksek olmasıdır; yani entomopatojenik bir fungus belirli bir veya birkaç böcek grubunu hedef almaktadır, bu sayede faydalı böceklere ve diğer çevresel unsurlara zarar vermemekte veya minimal düzeyde zarar vermektedir (Mantzoukas vd., 2023). Mantzoukas ve arkadaşlarının (2023) yaptıkları çalışmada; test edilen funguslarda, belirli bir fungus türünün etkinliğinin her zaman suşa özgü olduğunu ve virülansın konakçıya bağlı olarak değişebileceğini göstermişlerdir (Mantzoukas vd., 2023).

Genel değerlendirme olarak bu çalışmada, Bilecik ili tarım arazilerinden izole edilen entomopatojenik fungus suşlarının tanımlanması ve biyolojik kontrol potansiyelleri ile *C. serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* esansiyel yağının depolama zararlıları, özellikle *Tenebrio molitor* (sarı un kurdu) üzerindeki etkinlikleri incelenmiştir. Sekiz izolat arasından patojenite taramalarında en yüksek virülans sergileyen CBF-2 ve CBF-7, koloni ve spor morfolojileri temel alınarak sırasıyla *Beauveria bassiana* ve *Metarhizium robertsii* olarak teşhis edilmiş; bu tanımlama ITS ve EF1-α gen bölgelerinin dizilenmesi ve filogenetik analizleri ile doğrulanmıştır. Çok lokuslu moleküler yaklaşımlar, seçilen izolatların tür kimliklendirilmelerinde güvenilir sonuçlar sağlayarak literatürdeki benzer çalışmalarla tutarlılık göstermiştir. Deneysel bulgular, izole edilen *B. bassiana* ve *M. robertsii* suşlarının model konak *T. molitor* üzerinde yüksek virülans ve ölüm oranları oluşturduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, *C. serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* türü esansiyel yağın fumigasyon yoluyla uygulandığında sarı un kurduna karşı önemli bir biyolojik etkinliğe sahip olduğu gözlenmiştir. Her iki biyolojik ajan da ayrı ayrı ve birlikte kullanıldıklarında, geleneksel kimyasal pestisitlerle kıyaslanabilecek düzeyde etkin kontrol sağlayarak gıda güvenliği ve çevre sağlığı açısından avantaj sunmuştur. Bu sonuçlar ışığında, depolama zararlıları yönetiminde entomopatojenik funguslar ile bitkisel esansiyel yağların entegre uygulanmasının sürdürülebilir bir strateji ve inovatif bir yaklaşım olduğu vurgulanmaktadır. İleriki çalışmalarda, farklı fungus suşları ile esansiyel yağ kombinasyonlarının sinerjistik etkilerinin kapsamlı olarak test edilmesi, en uygun formülasyon ve uygulama şartlarının belirlenmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak, izolasyondan tür tayinine, biyoaktivite analizinden entegrasyon stratejilerine kadar yürütülen bu bütüncül yaklaşım, kimyasal pestisit bağımlılığını azaltabilecek, çevre dostu, sürdürülebilir ve etkili bir depolama zararlıları yönetimine önemli katkılar sunmaktadır. Gelecekte yapılacak saha uygulamaları, formülasyon geliştirme çalışmaları ve hedef zararlılara yönelik geniş kapsamlı etkinlik testleri, bu yerel izolatların biyolojik mücadele programlarına kazandırılması ve biyopestisit ürünlerine dönüştürülmesi yolunda önemli adımlar olacaktır.

KAYNAKLAR

Abass, A. B., Ndunguru, G., Mamiro, P., Alenkhe, B., Mlingi, N., & Bekunda, M. (2014). Post-harvest food losses in a maize-based farming system of semi-arid savannah area of Tanzania. *Journal of Stored Products Research, 57*(1), 49-57.

Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology, 18*(1), 265-267.

Adamaki-Sotiraki, C., Deruytter, D., Rumbos, C., & Athanassiou, C. (2023). Cross-breeding of Tenebrio molitor strains from a large-scale perspective. *Journal of Insects as Food and Feed, 9*(advance online publication), 1-10. https://doi.org/10.1163/23524588-20230116

Adamaki-Sotiraki, C., Rumbos, C. I., & Athanassiou, C. G. (2024). From a stored-product pest to a promising protein source: A U-turn of human perspective for the yellow mealworm Tenebrio molitor. *Journal of Pest Science, 97*(1), 1-17.

Adamaki-Sotiraki, C., Rumbos, C., & Athanassiou, C. (2022a). Developmental plasticity among strains of the yellow mealworm, Tenebrio molitor L., under dry conditions. *Journal of Insects as Food and Feed, 8*(3), 281-288. https://doi.org/10.3920/JIFF2021.0087

Adamaki-Sotiraki, C., Rumbos, C., & Athanassiou, C. (2022b). Strain effect on the adult performance of the yellow mealworm Tenebrio molitor L. *Journal of Insects as Food and Feed* (advance online publication). https://doi.org/10.3920/JIFF2021.0207

Adatia, A., Johnson, D., & Entz, S. (2010). Pathogenicity of two new isolates of Metarhizium anisopliae from Canadian soil to Melanoplus bivittatus (Orthoptera: Acrididae) and Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae). *Canadian Entomologist, 142*(2), 128-134. https://doi.org/10.4039/N09-041

Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticide use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology, 2*(1), 1-12.

Ali-Shtayeh, M. S., Mara'i, A. B. B., & Jamous, R. M. (2002). Distribution, occurrence and characterization of entomopathogenic fungi in agricultural soil in the Palestinian area. *Mycopathologia, 156*(3), 235-244.

Allai, F. M., Azad, Z. R. A. A., Dar, B. N., & Gul, K. (2022). Effect of extrusion processing conditions on the techno-functional, antioxidant, textural properties and storage stability of whole grain-based breakfast cereal incorporated with Indian horse chestnut flour. *Italian Journal of Food Science, 34*(3), 105-123.

Altahawi, A., Ibrahim, A., Eid, F., Ahmed, S., & Mahfouz, H. (2020). Efficacy of new isolates of entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae (Metsch.) from Sinai Peninsula against yellow mealworm Tenebrio molitor L. (Coleoptera: Tenebrionidae) under laboratory conditions. *Journal of Plant Protection Research, 60*(4), 687-691. https://doi.org/10.21608/jppp.2020.166217

Andreadis, S. S., Panteli, N., Mastoraki, M., Rizou, E., Stefanou, V., Tzentilasvili, S., & Antonopoulou, E. (2021). Towards functional insect feeds: Agri-food by-products enriched with post-distillation residues of medicinal-aromatic plants in Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae) breeding. *Antioxidants, 11*(1), 68. https://doi.org/10.3390/antiox11010068

Araújo, J. P. M., & Hughes, D. P. (2016). Diversity of entomopathogenic fungi: Which groups conquered the insect body? In B. Lovett & R. St. Leger (Eds.), *Advances in Genetics* (Vol. 94, pp. 1-39). Elsevier.

Arora, S., Stanley, J., & Srivastava, C. (2021). Temporal dynamics of phosphine fumigation against insect pests in wheat storage. *Crop Protection, 144*, 105602.

Asgar, E., & Jalal, J. S. (2015). A review on recent research results on bio-effects of plant essential oils against major coleopteran insect pests. *Toxin Reviews, 34*(1), 76-91.

Athanassiou, C. G., Kavallieratos, N. G., Boukouvala, M. C., Mavroforos, M. E., & Kontodimas, D. C. (2015). Efficacy of alpha-cypermethrin and thiamethoxam against Trogoderma granarium Everts (Coleoptera: Dermestidae) and Tenebrio molitor L. (Coleoptera: Tenebrionidae) on concrete. *Journal of Stored Products Research, 62*, 101-107. https://doi.org/10.1016/j.jspr.2015.02.003

Aulakh, J., Regmi, A., Fulton, J. R., & Alexander, C. (2013). Estimating post-harvest food losses: Developing a consistent global estimation framework. In *Proceedings of the Agricultural & Applied Economics Association's 2013 AAEA & CAES Joint Annual Meeting* (Washington, DC, USA, 4-6 August 2013).

Aw, K. M. S., & Hue, S. M. (2017). Mode of infection of Metarhizium spp. fungus and their potential as biological control agents. Journal of Fungi, 3(2), 30.

Banga, K. S., Kotwaliwale, N., Mohapatra, D., & Giri, S. K. (2018). Techniques for insect detection in stored food grains: An overview. *Food Control, 94*, 167-176.

Barnes, A. I., & Siva-Jothy, M. T. (2000). Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle Tenebrio molitor L. (Coleoptera: Tenebrionidae): Cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. *Proceedings of the Royal Society B, 267*(1439), 177-182. https://doi.org/10.1098/rspb.2000.0984

Baron, N. C., Rigobelo, E. C., & Zied, D. C. (2019). Filamentous fungi in biological control: Current status and future perspectives. *Chilean Journal of Agricultural Research, 79*(2), 307-315. https://doi.org/10.4067/ 50718-58392019000200307

Batta, Y. A. (2016). Recent advances in formulation and application of entomopathogenic fungi for biocontrol of stored-grain insects. *Biocontrol Science and Technology, 26*(9), 1171-1183.

Begemann, J., Ostovar, S., & Schwake-Anduschus, C. (2021). Facing tropane alkaloid contamination in millet - Analytical and processing aspects. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, 13*(2), 79-86.

Ben-Ari, Y., Khalilov, I., Kahle, K., & Cherubini, E. (2012). The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *The Neuroscientist, 18*(5), 467-486.

Berggreen, I., Ofenberg, J., Calis, M., & Heckmann, L.-H. (2018). Impact of density, reproduction period and age on fecundity of the yellow mealworm Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Insects as Food and Feed, 4*(1), 43-50. https://doi.org/10.3920/JIFF2017.0013

Bergman, M. E., Davis, B., & Phillips, M. A. (2019). Medically useful plant terpenoids: Biosynthesis, occurrence, and mechanism of action. *Molecules, 24*(21), 3961. https://doi.org/10.3390/ molecules24213961

Bhavaniramya, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M., Vijayakumar, R., & Baskaran, D. (2019). Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology, 2*(3), 49-55.

Bischoff, J. F., Rehner, S. A., & Humber, R. A. (2009). A multilocus phylogeny of the Metarhizium anisopliae lineage. *Mycologia, 101*(4), 512-530.

Blackwell, M., & Vega, F. E. (2005). Introduction: Seven wonders of the insect-fungus world. In M. Blackwell & F. E. Vega (Eds.), *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution* (pp. XIII-XVII). Oxford University Press.

Bordiean, A., Krzyżaniak, M., Aljewicz, M., & Stolarski, M. J. (2022). Influence of different diets on growth and nutritional composition of yellow mealworm. *Foods, 11*(19), 3075. https://doi.org/10.3390/ foods11193075

Borzoui, E., Naseri, B., Abedi, Z., & Karimi-Pormehr, M. (2016). Lethal and sublethal effects of essential oils from Artemisia khorassanica and Vitex pseudo-negundo against Plodia interpunctella (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental Entomology, 45*(5), 1220-1226.

Bouchard, P., Bousquet, Y., Aalbu, R. L., Alonso-Zarazaga, M. A., Merkl, O., & Davies, A. E. (2021). Review of genus-group names in the family Tenebrionidae (Insecta, Coleoptera). *ZooKeys, 1050*, 1-104. https:// doi.org/10.3897/zookeys.1050.64217

Bourguet, D., Roig, A., Toutant, J., & Arpagaus, M. (1997). Analysis of molecular forms and pharmacological properties of acetylcholinesterase in several mosquito species. *Neurochemistry International, 31*(1), 65-72.

Bousquet, Y. (1990). *Beetles associated with stored products in Canada: An identification guide* (Publication 1837). Agriculture Canada.

Butt, T. M., Greenfield, B. P., Greig, C., Maffeis, T. G., Taylor, J. W., Piasecka, J., ... & Eastwood, D. C. (2013). Metarhizium anisopliae pathogenesis of mosquito larvae: a verdict of accidental death. PLOS ONE, 8(12), e81686.

Buzby, J. C., Farah-Wells, H., & Hyman, J. (2014). *The estimated amount, value, and calories of postharvest food losses at the retail and consumer levels in the United States*. Economic Information Bulletin Number 121. U.S. Department of Agriculture.

Campolo, O., Giunti, G., Russo, A., Palmeri, V., & Zappalà, L. (2018). Essential oils in stored product insect pest control. *Journal of Food Quality, 2018*, 6906105. https://doi.org/10.1155/2018/6906105

Canay, F. U., Sanal, T., & Köksel, H. (2022). Quality and nutritional characteristics of durum wheats grown in Anatolia. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, 14*(4), 169-177.

Capinera, J. L. (2008). *Encyclopedia of entomology* (2nd ed.). Springer Science & Business Media.

Chermenskaya, T. D., Stepanycheva, E. A., Shchenikova, A. V., & Chakaeva, A. S. (2010). Insectoacaricidal and deterrent activities of extracts of Kyrgyzstan plants against three agricultural pests. *Industrial Crops and Products, 32*(1), 157-163. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.04.009

Cosimi, S., Rossi, E., Cioni, P., & Canale, A. (2009). Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests: Evaluation of repellency against Sitophilus zeamais Motschulsky, Cryptolestes ferrugineus (Stephens), and Tenebrio molitor (L.). *Journal of Stored Products Research, 45*(2), 125-132. https://doi.org/10.1016/j.jspr.2008.10.002

Daferera, D., Ziogas, B., & Polissiou, M. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on Penicillium digitatum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48*(6), 2576-2581.

Damalas, C. A., & Eleftherohorinos, I. G. (2011). Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health, 8*(5), 1402-1419.

Dassanayake, M. K., Chong, C. H., Khoo, T. J., Figiel, A., Szumny, A., & Choo, C. M. (2021). Synergistic field crop pest management properties of plant-derived essential

oils in combination with synthetic pesticides and bioactive molecules: A review. *Foods, 10*(9), 2016.

Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines, 3*(4), 25. https://doi.org/10.3390/ medicines3040025

Elkhateeb, W. A., Mousa, K. M., Elnahas, M. O., & Daba, G. M. (2021). Fungi against insects and contrariwise as biological control models. *Egyptian Journal of Biological Pest Control, 31*(1), 1–9.

Evans, P. D. (1980). Biogenic amines in the insect nervous system. *Advances in Insect Physiology, 15*, 317- 473.

Fahn, A. (2000). Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research, 31*, 37-75.

Farooqui, T. (2007). Octopamine-mediated neuromodulation of insect senses. *Neurochemical Research, 32*(8), 1511-1529.

Fazolin, M., Estrela, J., Catani, V., Alécio, M., & Lima, M. (2007). Propriedade inseticida dos óleos essenciais de Piper hispidinervum C. DC., Piper aduncum L. e Tanaecium nocturnum (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre Tenebrio molitor L. 1758. *Ciência e Agrotecnologia, 31*(1), 113-120. https://doi.org/10.1590/ S1413-70542007000100017

Ferreira, D. S., Rocha, J. C. B., Arellano, D. B., & Pallone, J. A. L. (2022). Discrimination of South American grains based on fatty acid profile. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, 14*(3), 30-42.

Finney, D. J. (1971). *Probit Analysis* (3rd ed.). Cambridge University Press.

Flinn, P. W., Hagstrum, D. W., Reed, C., & Phillips, T. W. (2003). United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service stored-grain area-wide integrated pest management program. *Pest Management Science, 59*(6-7), 614-618. https://doi.org/10.1002/ps.695

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2002). *Manual on the Submission and Evaluation of Pesticide Residues Data for the Estimation of Maximum Residue Levels in Food and Feed*. Rome, Italy: FAO.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2009, September 23). *2050: A third more mouths to feed* [Press release]. Retrieved January 26, 2018, from http://www.fao.org/news/story/en/ item/35571/icode/

Gao, Q., Jin, K., Ying, S. H., Zhang, Y., Xiao, G., Shang, Y., ... & Wang, C. (2011). Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi Metarhizium anisopliae and M. acridum. PLOS Genetics, 7(1), e1001264.

Goettel, M. S., Eilenberg, J., & Glare, T. (2010). Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. In L. I. Gilbert & S. S. Gill (Eds.), *Insect Control: Biological and Synthetic Agents* (pp. 387-432). Academic Press.

Goettel, M. S., Hajek, A. E., Siegel, J. P., & Evans, H. C. (2001). Safety of fungal biocontrol agents. In T. M. Butt, C. Jackson, & N. Magan (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential* (pp. 347-377). CABI Publishing.

Greenfield, B. P., Lord, A. M., Dudley, E., & Butt, T. M. (2014). Conidia of the insect pathogenic fungus, Metarhizium anisopliae, fail to adhere to mosquito larval cuticle. Royal Society Open Science, 1(2), 140193.

Gul, H. T., Saeed, S., & Khan, F. A. (2014). Entomopathogenic fungi as effective insect pest management tactic: A review. *Applied Sciences and Business Economics, 1*(1), 10-18. (Retrieved from http:// www.asbejournal.org/10-18.pdf)

Hagstrum, D., Klejdysz, T., Subramanyam, B., & Nawrot, J. (2013). *Atlas of stored-product insects and mites*. AACC International, St. Paul, MN.

Halliday, W. D., Thomas, A. S., & Blouin-Demers, G. (2015). High temperature intensifies negative density dependence of fitness in red flour beetles. *Ecology and Evolution, 5*(5), 1061-1067. https://doi.org/ 10.1002/ece3.1402

Harsányi, E., Juhász, C., Kovács, E., Huzsvai, L., Pintér, R., Fekete, G., & Gyuricza, C. (2020). Evaluation of organic wastes as substrates for rearing Zophobas morio, Tenebrio molitor, and Acheta domesticus larvae as alternative feed supplements. *Insects, 11*(9), 604. https://doi.org/10.3390/insects11090604

Hermans, P. E., & Keys, T. F. (1983). Antifungal agents used for deep-seated mycotic infections. *Mayo Clinic Proceedings, 58*(5), 223-231.

Hofstetter, V., Miadlikowska, J., Kauff, F., & Lutzoni, F. (2007). Phylogenetic comparison of protein-coding versus ribosomal RNA-coding sequence data: A case study of the Lecanoromycetes (Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution, 44*(2), 412-426.

Humber, R. A. (1997). Entomopathogenic fungal identification. In L. A. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology* (pp. 153-185). Academic Press.

Inglis, G. D., Johnson, D. L., & Goettel, M. S. (1997). Effects of temperature and sunlight on mycosis by Beauveria bassiana in grasshoppers under field conditions. *Environmental Entomology, 26*(2), 400-409.

Islam, W., Adnan, M., Shabbir, A., Naveed, H., Abubakar, Y. S., Qasim, M., & Ali, H. (2021). Insect–fungal interactions: A detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests. *Microbial Pathogenesis, 159*, 105122.

Isman, M. B. (2000a). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection, 19*(8), 603- 608. https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00079-X

Isman, M. B. (2006b). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology, 51*, 45-66.

Jaber, L. R., & Enkerli, J. (2017). Fungal entomopathogens as endophytes: Can they promote plant growth? *Biocontrol Science and Technology, 27*(1), 28-41. https://doi.org/10.1080/09583157.2016.1243227

Jaber, L. R., & Enkerli, J. (2017). Fungal entomopathogens as endophytes: Can they promote plant growth? *Biocontrol Science and Technology, 27*(1), 28-41, 2017.

Jankielsohn, A. (2018). The importance of insects in agricultural ecosystems. *Advances in Entomology, 6*(2), 62-73. https://doi.org/10.4236/ae.2018.62006

Jankowska, M., Rogalska, J., Wyszkowska, J., & Stankiewicz, M. (2017). Molecular targets for components of essential oils in the insect nervous system - a review. *Molecules, 23*(1), 34.

Jankowska, M., Rogalska, J., Wyszkowska, J., & Stankiewicz, M. (2018). Molecular targets for components of essential oils in the insect nervous system - a review. *Molecules, 23*(1), 34.

Jemâa, J. M. B., Tersim, N., Toudert, K. T., & Khouja, M. L. (2012). Insecticidal activities of essential oils from leaves of Laurus nobilis L. from Tunisia, Algeria and Morocco, and comparative chemical composition. *Journal of Stored Products Research, 48*(1), 97-104. https://doi.org/10.1016/j.jspr.2011.10.003

Kaya, H. K., & Vega, F. E. (2012). Scope and basic principles of insect pathology. In F. Vega & H. K. Kaya (Eds.), *Insect Pathology* (pp. 1-12). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384984-7.00001-4

Kim, S. Y., Park, J. B., Lee, Y. B., Yoon, H. J., Lee, K. Y., & Kim, N. J. (2015). Growth characteristics of mealworm Tenebrio molitor. *Journal of Entomological Science, 53*(1), 1-5. https://doi.org/10.7852/JSES. 2015.53.1.1

Kiss, L. (2012). Limits of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences as species barcodes for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 109*(E18), E1811.

Kõljalg, U., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A. F. S., Bahram, M., & Larsson, K. H. (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology, 22*(21), 5271-5277.

Kostyukovsky, M., Rafaeli, A., Gileadi, C., Demchenko, N., & Shaaya, E. (2002). Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: Possible mode of action against insect pests. *Pest Management Science, 58*(11), 1101-1106.

Kumar, D., & Kalita, P. (2017). Reducing postharvest losses during storage of grain crops to strengthen food security in developing countries. *Foods, 6*(1), 8.

Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., & Goettel, M. S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology, 132*, 1-41.

Lange, A., & Orchard, I. (1986). Identified octopaminergic neurons modulate contractions of locust visceral muscle via cyclic AMP. *Brain Research, 363*(1), 340-349.

Leão, M. P. C., Tiago, P. V., Andreote, F. D., de Araújo, W. L., & de Oliveira, N. T. (2015). Differential expression of the pr 1A gene in Metarhizium anisopliae and Metarhizium acridum across different culture conditions and during pathogenesis. Genetics and Molecular Biology, 38(01), 86–92.

Lovett, B., & St. Leger, R. J. (2015). Stress is the rule rather than the exception for Metarhizium. Current Genetics, 61, 253–261.

Lovett, B., & St. Leger, R. J. (2017). The insect pathogens. *Microbiology Spectrum, 5*(2), 1-19.

Ma, X. M., Liu, X. X., Ning, X., Zhang, B., Han, F., Guan, X. M., & Tan, Y. F. (2008). Effects of Bacillus thuringiensis toxin Cry1Ac and Beauveria bassiana on Asiatic corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Invertebrate Pathology, 99*(2), 123-128.

Maistrou, S., Paris, V., Jensen, A. B., Rolff, J., Meyling, N. V., & Zanchi, C. (2018). A constitutively expressed antifungal peptide protects Tenebrio molitor during a natural infection by the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana. *Developmental and Comparative Immunology, 86*, 26-33. https://doi.org/10.1016/j.dci. 2018.04.015

Majumder, S., Bala, B. K., Arshad, F. M., Haque, M. A., & Hossain, M. A. (2016). Food security through increasing technical efficiency and reducing postharvest losses of rice production systems in Bangladesh. *Food Security, 8*(2), 361-374.

Mannino, M. C., Huarte-Bonnet, C., Davyt-Colo, B., & Pedrini, N. (2019). Is the insect cuticle the only entry gate for fungal infection? Insights into alternative modes of action of entomopathogenic fungi. Journal of Fungi, 5(2), 33.

Mannino, M. C., Huarte-Bonnet, C., Davyt-Colo, B., & Pedrini, N. (2019). Is the insect cuticle the only entry gate for fungal infection? Insights into alternative modes of action of entomopathogenic fungi. *Journal of Fungi, 5*(2), 33. https://doi.org/10.3390/jof5020033

Mantzoukas, S., Kitsiou, F., Natsiopoulos, D., & Eliopoulos, P. A. (2022). Entomopathogenic fungi: interactions and applications. *Encyclopedia, 2*(2), 646-656. https://doi.org/10.3390/encyclopedia2020044

Marcel, V., Palacios, L., Pertuy, C., & Fournier, D. (1998). Two invertebrate acetylcholinesterases show activation followed by inhibition with substrate concentration. *Biochemical Journal, 329*(2), 329-334.

Marrs, T., & Maynard, R. (2013). Neurotransmission systems as targets for toxicants: A review. *Cell Biology and Toxicology, 29*(5), 381-396.

Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Zanuncio, J. C., & Serrão, J. E. (2015). Bioactivity of six plant extracts on adults of Demotispa neivai (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Insect Science, 15*(1), 34. https:// doi.org/10.1093/jisesa/iev021

Ment, D., Gindin, G., Rot, A., Soroker, V., Glazer, I., Barel, S., & Samish, M. (2010). Novel technique for quantifying adhesion of Metarhizium anisopliae conidia to the tick cuticle. Applied and Environmental Microbiology, 76(11), 3521–3528.

Merzendorfer, H. (2012). Chitin synthesis inhibitors: Old molecules and new developments. *Insect Science, 20*(1), 121-138.

Mesterházy, Á., Oláh, J., & Popp, J. (2020). Losses in the grain supply chain: Causes and solutions. *Sustainability, 12*(6), 2342.

Meyling, N. V., & Eilenberg, J. (2006). Occurrence and distribution of soil-borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agriculture, Ecosystems & Environment, 113*(1-4), 336-341.

Mir, S. A., Mir, M. B., Shah, M. A., Hamdani, A. M., Sunooj, K. V., Phimolsiripol, Y., & Khaneghah, A. M. (2023). New prospective approaches in controlling the insect infestation in stored grains. *Journal of Asia- Pacific Entomology, 26*(2), 102058.

Mir, S. A., Shah, M. A., Bosco, S. J. D., Sunooj, K. V., & Farooq, S. (2020). A review on nutritional properties, shelf life, health aspects, and consumption of brown rice in comparison with white rice. *Cereal Chemistry, 97*(5), 895-903.

Moirangthem, T. T., & Baik, O. D. (2021). Disinfestation of stored grains using non-chemical technologies a review. *Trends in Food Science & Technology, 107*, 299-308.

Molnár, I., Gibson, D. M., & Krasnoff, S. B. (2010). Secondary metabolites from entomopathogenic Hypocrealean fungi. Natural Product Reports, 27(9), 1241–1275.

Mora, M. A. E., Castilho, A. M. C., & Fraga, M. E. (2017). Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. *Arquivos do Instituto Biológico, 84*(1), e0842015.

Morales-Ramos, J. A., Rojas, M. G., Kay, S., Shapiro-Ilan, D. I., & Tedders, W. L. (2012). Impact of adult weight, density, and age on reproduction of Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Entomological Science, 47*(3), 208-220. https://doi.org/10.18474/0749-8004-47.3.208

Morales-Ramos, J. A., Rojas, M. G., Kelstrup, H. C., & Emery, V. (2020). Self-selection of agricultural by- products and food ingredients by Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae) and impact on food utilization and nutrient intake. *Insects, 11*(12), 827. https://doi.org/10.3390/insects11120827

Mwamburi, L. A. (2020). Beauveria. In N. Amaresan, M. Senthil Kumar, K. Annapurna, K. Kumar, & A. Sankaranarayanan (Eds.), *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi* (pp. 727-748). Academic Press. https://doi.org/10.1016/8978-0-12-823414-3.00037-X

Neethirajan, S., Karunakaran, C., Jayas, D. S., & White, N. D. G. (2007). Detection techniques for stored- product insects in grain. *Food Control, 18*(2), 157-162. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.09.008

Niroumand, M. C., Farzaei, M., Karimpour-Razkenari, E., Amin, G., Khanavi, M., Akbarzadeh, T., & Shams- Ardekani, M. (2016). An evidence-based review on medicinal plants used as insecticide and insect repellent in traditional Iranian medicine. *Iranian Red Crescent Medical Journal, 18*(e22361).

Ohta, H., & Ozoe, Y. (2014). Molecular signaling, pharmacology, and physiology of octopamine and tyramine receptors as potential insect pest control targets. *Advances in Insect Physiology, 46*, 73-166.

Ortiz-Urquiza, A., & Keyhani, N. O. (2013). Action on the surface: Entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects, 4*(3), 357-374. https://doi.org/10.3390/insects4030357

Ownley, H., Gwinn, K. D., & Vega, F. E. (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: Ecology and evolution. *BioControl, 55*(1), 113-128.

Pang, Y., Brimijoin, S., Ragsdale, D. W., Zhu, K. Y., & Suranyi, R. (2012). Novel and viable acetylcholinesterase target site for developing effective and environmentally safe insecticides. *Current Drug Targets, 13*(4), 471-482.

Parmar, V. S., et al. (1997). Phytochemistry of the genus Piper. *Phytochemistry, 46*(4), 597-673. https:// doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00328-2

Paul, A., Radhakrishnan, M., Anandakumar, S., Shanmugasundaram, S., & Anandharamakrishnan, C. (2020). Disinfestation techniques for major cereals: A status report. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 19*(3), 1125-1155.

Pavela, R. (2016a). History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects a review. *Plant Protection Science, 52*(4), 229-241.

Pavela, R., & Benelli, G. (2016b). Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends in Plant Science, 21*(12), 1000-1007.

Pedrini, N. (2018). Molecular interactions between entomopathogenic fungi (Hypocreales) and their insect host: Perspectives from stressful cuticle and hemolymph battlefields and the potential of dual RNA sequencing for future studies. Fungal Biology, 122(6), 538–545.

Petrović, M., Popović, A., Kojić, D., Šućur, J., Bursić, V., Aćimović, M., & Vuković, G. (2019). Assessment of toxicity and biochemical response of Tenebrio molitor and Tribolium confusum exposed to Carum carvi essential oil. *Entomologia Generalis, 38*(4), 333-348.

Plata-Rueda, A., Martínez, L. C., Santos, M. H. D., Fernandes, F. L., Wilcken, C. F., Soares, M. A., Serrão, J. E., & Zanuncio, J. C. (2017). Insecticidal activity of garlic essential oil and its constituents against the mealworm beetle, Tenebrio molitor Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae). *Scientific Reports, 7*, 46406. https://doi.org/10.1038/srep46406

Polsinelli, G., Singh, S., Mishra, R., Suranyi, R., Ragsdale, D., Pang, Y., & Brimijoin, S. (2010). Insect-specific irreversible inhibitors of acetylcholinesterase in pests including the bed bug, the eastern yellowjacket, German and American cockroaches, and the confused flour beetle. *Chemico-Biological Interactions, 187*(1-3), 142-147.

Popescu, I. E., Gostin, I. N., & Blidar, C. F. (2024). An overview of the mechanisms of action and administration technologies of the essential oils used as green insecticides. *AgriEngineering, 6*(2), 1195- 1217.

Popp, J., Pető, K., & Nagy, J. (2013). Pesticide productivity and food security: A review. *Agronomy for Sustainable Development, 33*(1), 243-255.

Pott, D., Osorio, S., & Vallarino, J. (2019). From central to specialized metabolism: An overview of some secondary compounds derived from primary metabolism for their role in conferring nutritional and organoleptic characteristics to fruit. *Frontiers in Plant Science, 10*, 835.

Preedy, V. (2016). *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Academic Press.

Punzo, F., & Mutchmor, J. A. (1980). Effects of temperature, relative humidity and period of exposure on the survival capacity of Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of the Kansas Entomological Society, 53*(2), 260-270.

Qayyum, M. A., Bilal, H., Ullah, U. N., Ali, H., Raza, H., & Wajid, M. (2021). Factors affecting the epizootics of entomopathogenic fungi - a review. *Journal of Bioresource Management, 8*(4), 5.

Radha, R., Murugan, K., Wei, H., Amerasan, D., Madhiyazhagan, P., Chen, F., Kovendan, K., Nataraj, T., Nareshkumar, A., Hwang, J., et al. (2014). Insecticidal activity of essential oils and entomopathogenic fungi against cowpea bruchid, Callosobruchus maculatus (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *International Journal of Current Innovation Research, 1*(1), 12-19.

Ragionieri, L., Zúñiga-Reinoso, Á., Bläser, M., & Predel, R. (2023). Phylogenomics of darkling beetles (Coleoptera: Tenebrionidae) from the Atacama Desert. *PeerJ, 11*, e14848. https://doi.org/10.7717/peerj. 14848

Ramakuwela, T., Hatting, J., Bock, C., Vega, F. E., Wells, L., Mbata, G. N., & Shapiro-Ilan, D. (2020). Establishment of Beauveria bassiana as a fungal endophyte in pecan (Carya illinoinensis) seedlings and its virulence against pecan insect pests. *Biological Control, 140*, 104102.

Rampersad, S. N. (2014). ITS1, 5.8S and ITS2 secondary structure modelling for intraspecific differentiation among species of the Colletotrichum gloeosporioides sensu lato species complex. *SpringerPlus, 3*, 684.

Re, L., Barocci, S., Sonnino, S., Mencarelli, A., Vivani, C., Paolucci, G., Scarpantonio, A., Rinaldi, L., & Mosca, E. (2000). Linalool modifies the nicotinic receptor-ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction. *Pharmacological Research, 42*(2), 177-181.

Reeb, V., Lutzoni, F., & Roux, C. (2004). Contribution of RPB2 to multilocus phylogenetic studies of the euascomycetes (Pezizomycotina, Fungi) with special emphasis on the lichen-forming Acarosporaceae and evolution of polyspory. *Molecular Phylogenetics and Evolution, 32*(3), 1036-1060.

Rehner, S. A., & Buckley, E. (2005). A Beauveria phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences: Evidence for cryptic diversification and links to Cordyceps teleomorphs. *Mycologia, 97*(1), 84-98.

Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G. H., Luangsa-Ard, J. J., Devotto, L., & Humber, R. A. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus Beauveria. *Mycologia, 103*(5), 1055-1073.

Rehner, S. A., Posada, F., Buckley, E. P., Infante, F., Castillo, A., & Vega, F. E. (2006). Phylogenetic origins of African and Neotropical Beauveria bassiana s.l. pathogens of the coffee berry borer, Hypothenemus hampei. *Journal of Invertebrate Pathology, 93*(1), 11-21.

Ribeiro, N., Abelho, M., & Costa, R. (2018). A review of the scientific literature for optimal conditions for mass rearing Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Entomological Science, 53*(4), 434- 454. https://doi.org/10.18474/JES17-67.1

Robinson, W. H. (2005). *Urban insects and arachnids: A handbook of urban entomology*. Cambridge University Press.

Rodríguez-Gómez, D., Loera, O., Saucedo-Castañeda, G., & Viniegra-González, G. (2009). Substrate influence on physiology and virulence of Beauveria bassiana acting on larvae and adults of Tenebrio molitor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25*(3), 513-518.

Rumbos, C. I., Karapanagiotidis, I. T., Mente, E., Psofakis, P., & Athanassiou, C. G. (2020). Evaluation of various commodities for the development of the yellow mealworm (Tenebrio molitor L.). *Scientific Reports, 10*(1), 11224. https://doi.org/10.1038/s41598-020-67363-1

Rumbos, C., Oonincx, D., Karapanagiotidis, I., Vrontaki, M., Gourgouta, M., Asimaki, A., & Athanassiou, C. (2022). Agricultural by-products from Greece as feed for yellow mealworm larvae: Circular economy at a local level. *Journal of Insects as Food and Feed, 8*(1), 9-22. https://doi.org/10.3920/JIFF2021.0044

Sanders, H. O. (1969). *Toxicity of pesticides to the crustacean Gammarus lacustris* (Technical Paper 25). U.S. Bureau of Sport Fisheries and Wildlife, Washington, DC.

Sandhu, S. S., Sharma, A. K., Beniwal, V., Goel, G., Batra, P., Kumar, A., Jaglan, S., Sharma, A. K., & Malhotra, S. (2012). Myco-biocontrol of insect pests: Factors involved, mechanism, and regulation. *Journal of Pathogens, 2012*, 1-10. https://doi.org/10.1155/2012/126819

Santi, L., da Silva, W. O. B., Berger, M., Guimarães, J. A., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2010). Conidial surface proteins of Metarhizium anisopliae: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. Toxicon, 55(4), 874–880.

Santi, L., Silva, W. O., Pinto, A. F., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2010). Metarhizium anisopliae host–pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. Fungal Biology, 114(4), 312–319.

Sattelle, D. (1990). GABA receptors of insects. *Advances in Insect Physiology, 22*, 1-113.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., et al. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 109*(16), 6241-6246.

Schroeckenstein, D. C., Meier-Davis, S., & Bush, R. K. (1990). Occupational sensitivity to Tenebrio molitor (yellow mealworm). *Journal of Allergy and Clinical Immunology, 86*(2), 182-188. https://doi.org/10.1016/ S0091-6749(05)80064-8

Seifert, K. A. (2009). Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources, 9*(1), 83-89.

Senthil Kumar, M., Anandham, R., & Krishnamoorthy, R. (2020). Paecilomyces. In N. Amaresan, M. Senthil Kumar, K. Annapurna, K. Kumar, & A. Sankaranarayanan (Eds.), *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi* (pp. 601-610). Academic Press.

Shah, P. A., & Pell, J. K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology, 61*(5-6), 413-423.

Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G., Handa, N., Kohli, S., Yadav, P., Bali, A., Parihar, R., et al. (2019). Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences, 1*(11), 1446.

Sharma, A., Sharma, S., & Yadav, P. K. (2023). Entomopathogenic fungi and their relevance in sustainable agriculture: A review. *Cogent Food & Agriculture, 9*(1), 2180857.

Sharmeen, J. B., Mahomoodally, F. M., Zengin, G., & Maggi, F. (2021). Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals. *Molecules, 26*(3), 666.

Shin, T. Y., Lee, M. R., Park, S. E., Lee, S. J., Kim, W. J., & Kim, J. S. (2020). Pathogenesis-related genes of entomopathogenic fungi. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 105(4), e21747.

Shin, T. Y., Lee, M. R., Park, S. E., Lee, S. J., Kim, W. J., & Kim, J. S. (2020). Pathogenesis-related genes of entomopathogenic fungi. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 105*(4), e21747. https://doi.org/ 10.1002/arch.21747

Sigel, E., & Steinmann, M. (2012). Structure, function, and modulation of GABA_A receptors. *Journal of Biological Chemistry, 287*(48), 40224–40231.

Silva, A. C. L., Silva, G. A., Abib, P. H. N., Carolino, A. T., & Samuels, R. I. (2020). Endophytic colonization of tomato plants by the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana for controlling the South American tomato pinworm, Tuta absoluta. *CABI Agriculture and Bioscience, 1*(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/ s43170-020-00002-x

Singh, K. D., Mobolade, A. J., Bharali, R., Sahoo, D., & Rajashekar, Y. (2021). Main plant volatiles as stored grain pest management approach: A review. *Journal of Agriculture and Food Research, 4*, 100127.

Singh, T. (2004). *Principles and techniques of silkworm seed production*. Discovery Publishing House.

Sinha, K. K., Choudhary, A. K., & Kumari, P. (2016). *Ecofriendly pest management for food security: Entomopathogenic fungi*. Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803265-7.00015-4

Stefanazzi, N., Stadler, T., & Ferrero, A. (2011). Composition and toxic, repellent and feeding deterrent activity of essential oils against the stored-grain pests Tribolium castaneum (Coleoptera: Tenebrionidae) and Sitophilus oryzae (Coleoptera: Curculionidae). *Pest Management Science, 67*(6), 639–646. https:// doi.org/10.1002/ps.2102

Sung, G. H., Hywel-Jones, N. L., Sung, J. M., Luangsa-Ard, J. J., Shrestha, B., & Spatafora, J. W. (2007). Phylogenetic classification of Cordyceps and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology, 57*, 5–59.

Svoboda, K. (2003). Investigation of volatile oil glands of Satureja hortensis L. (summer savory) and phytochemical comparison of different varieties. *International Journal of Aromatherapy, 13*(4), 196–202.

Tanada, Y., & Kaya, H. K. (2012). *Insect pathology* (2nd ed.). Academic Press.

Tseng, M. N., Chung, C. L., & Tzean, S. S. (2014). Mechanisms relevant to the enhanced virulence of a dihydroxynaphthalene-melanin metabolically engineered entomopathogen. PLOS ONE, 9(3), e90473.

Ulusoy, M. (2016). *Entomopatojen fungus Beauveria bassiana (Bals.-Criv.) Vuill sporlarının bazı zararlı böcekler üzerindeki etkisinin incelenmesi* [Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara].

Ulusoy, M. (2022). Entomopatojen Fungusların Sentezlediği Beauverisinin Bazı Tarım Zararlıları Üzerindeki Etkisinin Araştırılması (Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara).

Um, M., Zakaria, D., Galadima, I. B., & Gambo, F. M. (2018). A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pests of field crops. *Journal of Entomology and Zoology Studies, 6*(1), 27-32.

United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. (2017). *World population prospects: The 2017 revision – Key findings* (ST/ESA/SER.A/401) [PDF]. United Nations. Retrieved January 26, 2018, from https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/Files/WPP2017_KeyFindings.pdf

Valero-Jiménez, C. A., Wiegers, H., Zwaan, B. J., Koenraadt, C. J., & van Kan, J. A. (2016). Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana. Journal of Invertebrate Pathology, 133, 41–49.

Vega, F. E., Meyling, N. V., Luangsa-Ard, J. J., & Blackwell, M. (2012). Fungal entomopathogens. In F. E. Vega & H. K. Kaya (Eds.), *Insect Pathology* (2nd ed., pp. 171–220). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/ B978-0-12-384984-7.00006-3

Vega, F. E., Posada, F., Aime, M. C., Pava-Ripoll, M., Infante, F., & Rehner, S. A. (2008). Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control, 46*(1), 72–82. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.008

Vommaro, M. L., Donato, S., Caputo, S., Agostino, R. G., Montali, A., Tettamanti, G., & Giglio, A. (2024). Anatomical changes of Tenebrio molitor and Tribolium castaneum during complete metamorphosis. *Cell and Tissue Research, 396*(1), 19–40. https://doi.org/10.1007/s00441-024-03877-8

Wan, H. (2003). *Molecular biology of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana: Insect-cuticle degrading enzymes and development of a new selection marker for fungal transformation* (Doctoral dissertation, University of Heidelberg, Germany).

Wang, C., Duan, Z., & St. Leger, R. J. (2008). MOS1 osmosensor of Metarhizium anisopliae is required for adaptation to insect host hemolymph. Eukaryotic Cell, 7(2), 302–309.

Wang, H., Ding, J., & Ren, N. (2016). Recent advances in microwave-assisted extraction of trace organic pollutants from food and environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry, 75*, 197–208.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315–322). Academic Press.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315–322). Academic Press.

Wińska, K., Mączka, W., Łyczko, J., Grabarczyk, M., Czubaszek, A., & Szumny, A. (2019). Essential oils as antimicrobial agents – myth or real alternative? *Molecules, 24*(11), 2130.

World Health Organization. (2010). *International code of conduct on the distribution and use of pesticides: Guidelines for the registration of pesticides*. WHO Press.

Wraight, S. P., & Carruthers, R. I. (1999). Production, delivery, and use of mycoinsecticides for control of insect pests on field crops. In F. R. Hall & J. J. Menn (Eds.), *Biopesticides: Use and Delivery* (pp. 233–269). Humana Press.

Xiao, G., Ying, S. H., Zheng, P., Wang, Z. L., Zhang, S., Xie, X. Q., & Wang, C. (2012). Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in Beauveria bassiana. *Scientific Reports, 2*, 483.

Yu, H., Xu, J., Wang, X., Ma, Y., Yu, D., Fei, D., Zhang, S., & Wang, W. (2017). Identification of four ATP-binding cassette transporter genes in Cnaphalocrocis medinalis and their expression in response to insecticide treatment. *Journal of Insect Science, 17*(3), 44.

Zanuncio, J. C., et al. (2016). Toxic effects of the neem oil (Azadirachta indica) formulation on the stink bug predator, Podisus nigrispinus (Heteroptera: Pentatomidae). *Scientific Reports, 6*, 30261. https:// doi.org/10.1038/srep30261

Zapata, N., & Smagghe, G. (2010). Repellency and toxicity of essential oils from the leaves and bark of Laurelia sempervirens and Drimys winteri against Tribolium castaneum. *Industrial Crops and Products, 32*(3), 405–410. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.06.005

Zhang, W. (2018). Global pesticide use: Profile, trend, cost/benefit and more. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences, 8*(1), 1–27.

Zimmermann, G. (1986). The Galleria bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology, 102*(1–5), 213–215.

Zunzunegui, I., Martín-García, J., Santamaría, Ó., & Poveda, J. (2024). Analysis of yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) frass as a resource for a sustainable agriculture in the current context of insect farming industry growth. Journal of Cleaner Production, 142608.

EKLER

EK 1 DİZİLENEN GEN BÖLGELERİ

EK 1 – DİZİLENEN GEN BÖLGELERİ

ITS Gen Bölgesi

***Beauveria bassiana* CBF-2 küçük alt birim ribozomal RNA geni (kısmi dizi); internal transcribed spacer 1, 5.8S ribozomal RNA geni ve internal transcribed spacer 2 (ITS2).**

AAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTTCAACTCC
CTAACCCTTCTGTGAACCTACCTATCGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCCAGCC
CGGACGCGGACTGGACCAGCGGCCCGCCGGGGACCTCAAACTCTTGTATTC
CAGCATCTTCTGAATACGCCGCAAGGCAAAACAAATGAATCAAAACTTTCA
ACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGAT
AAGTAATGTGAATTGCAGAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA
TTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACC
CTCGACCTCCCCTTGGGGAGGTCGGCGTTGGGGACCGGCAGCACACCGCCG
GCCCTGAAATGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCTGCGCAGTAATAC
AGCTCGCACCGGGACCCCGACGCGGCCACGCCGTAAAACACCCAACTTCTG
AACGTGACCTCGAATCACGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT
AAGCGGAGGA

***Metarhizium robertsii* CBF-7 küçük alt birim ribozomal RNA geni (kısmi dizi); internal transcribed spacer 1 ve 5.8S ribozomal RNA geni.**

GGAAGTAAAATCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCAT
TACCGAGTTATCCAACTCCCAACCCCTGTGAATTATACCTTTAATTGTTGCTT
CGGCGGGACTTCGCGCCCGCCGGGGACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAA
GTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTC
TTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAA
TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAG
TATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTACGCCCCTCAAGTCCCCTG
TGGACTTGGTGTTGGGGATCGGCGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCT
TAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTCTGCGCAGTAGTAAAACAC
TCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAAAACCCCCCAACTTTTT
ATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA
TAAGCGGAGGA

EF1-α Gen Bölgesi

Beauveria bassiana **CBF-2 translasyon uzama faktörü 1 alfa (elongation factor 1 alpha) geni, kısmi kodlayan dizi (cds).**

TTGGTAAGGAAGACAAGACTCACATCAACGTCGTCGTTATCGGGTGCGTTT
AACGCTGAACGCCTTCGACCTCGACGAGCAATAAATACTGACCACCAGACA
GCCACGTCGATTCCGGCAAGTCTACCACCGTAAGTTTTTTCAACGGTCGAGT
GGCTTTTGAGCTCTCGAACCAGCAATCTTCCGCCTCGCCGGTACCTGAGAGC
AAAGAGCTAACTCATGTATACAGACTGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTG
GTATTGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGCATAGTATCCA
ACTCTTTTCTACTGTCAAATGGACCTTGATCGCTTGCTGCGCAATTTTTTTT
TCGTCGTATCGCGCTGGCCACCAGCACTCACTACCCCTCCTCGCTGCGGCAA
AAATTTTCAGTGCCTTATCAATTCAGTGGGGCCAGTGAGAGTACCCCGCCAC
CTTGTCGCAAGCTTTCCCCTCATCTATTAGGTCGAAGCAGCAGAAGAAGAG
ATATCGCGTGCACTCAGCCAACAGATCGCTAACCTACCGTCTACAGGAAGC
CGCTGAACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTATGCCTGGGTTCTTGACAAGCTC
AAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATTGATATCGCTCTCTGGAAGTTC
GAGACTCCCAAGTACCACGTCACCGTCATTGATGCTCCCGGTCACCGTGATT
TCATCAAGAACATGATTACTGGTACTTCCCAGGCCGATTGCGCTATTCTCAT
CATCGCCGCCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCA
GACCCGTGAGCACGCTCTGCTCGCCTTCACCCTCGGTGTCAAGCAGCTCATT
GTTGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCCGAGGCCCGTTACCAG
GAAATCATCAAGGAGACTTCCAGCTTCATCAAGAAGGTTGGCTACAACCCT
AAGGCTGTTGCTTTCGTCCCCATCTCCGGTTTCAACGGCGACAACATGCTTG
AGCCCTCCAGCAACTGCCCCTGGTACAAGGGTTGGGAGAAGGAGACTAAGG
CTGGCAAGTCTACTGGCAAGACCCTTCTCGAGGCCATCGACGCCATTGAGC
CCCCCAAGCGTCCTACCGACAAGCCTCTCCGTCTTCCCCTCCAGGATGTTTA
CAAGATCGGTGGTATCGGAACGGTG

Metarhizium robertsii **CBF-7 translasyon uzama faktörü 1 alfa (elongation factor 1 alpha) geni, kısmi kodlayan dizi (cds).**

TCACATCAACGTGGTCGTTATCGTAACCTCGCCTGCCTCCACTTCGAACCTT
GTAGAAGCTGTTTACTGACTTGCTTGTCGTAGGGGTATGTTTCGGAGCCTAC
ACTCTTCGCCGTCCCGAGTTTGTGATAACTGACTGGTCCTCACAGCCACGTC
GACTCCGGCAAGTCTACCACCACTGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTA
TCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGCCAAACCACTCCGA
TTAATGATCTTTATTGTTTGGCGATGAACATTATTGAGTTTCCCGCTGCCTGT
CGGCCATTACCCCTCACTGTGACACGAAAATTTTCGCGGGGCCTTATCTTGG
ACTTTGGTGGGGCACCATACCCCGCCAGCTGTCGAGGGTGTCTCTGTGTGTC
TCTGGCTGTTGAAACCACAATATTGTCGTTGCTTTCAGAGGAAAAAACGTGA

AACTAATTTGGATCGCTGTATAGGAAGCCGCTGAACTCGGCAAGGGTTCCTT
CAAGTACGCATGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTAT
CACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACC
GTCATTGGTATGTCGACTTGCGCAAACTGACCGCATACTTTTCTCCTAAATT
GAATGCTAATGCCCCTCGCACAGATGCTCCCGGTCACCGTGACTTTATCAAG
AACATGATCACTGGTACTTCCCAGGCTGACTGCGCTATTCTCATTATCGCTG
CCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGACCCGTG
AGCACGCTCTCCTCGCCTACACCCTGGGTGTCAAGCAGCTCATTGTCGCCAT
CAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCCGAGGCCCGTTACCAGGAAATCAT
CAAGGAGACTTCCAACTTCATCAAGAAGGTCGGCTACAACCCCAAGACCGT
CGCCTTCGTCCCCATCTCCGGTTTCCACGGTGACAACATGCTTCAGGCCTCC
ACCAACTGCCCCTGGTACAAGGGTTGGGAGAAGGAGACCAAGGCTGGCAA
GTCCACCGGCAAGACCCTCCTCGAGGCCATTGACGCCATTGAGCCCCCCAA
GCGTCCCACCGACAAGCCCCTCCGTCTTCCCCTCCAGGATGTGTACAAGATT
GGCGGTATTGGAACTGTCCCTGTC

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Cevdet Barış BEYAZGÜL
Doğum Yeri ve Tarihi : Antakya, 03.04.2000
Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu
Lise : Hüseyin Özbuğday Anadolu Lisesi
Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik
Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik

Çalıştığı Kurum/Kurumlar : Burgen Genetik Hastalıkları Değerlendirme Merkezi, Arma Ltd. Şti., Asterion Medikal, İncekaralar Tıbbi Cihazlar Ticaret A.Ş.

İletişim (e-posta) : cevdetbeyazguly@gmail.com

Yayınları : -