

**ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FUNGAL BİYOPREPARATLARIN TİCARİ  
FORMÜLASYONLARINDA KULLANILABİLECEK UV-  
KORUYUCU PİGMENT ÜRETEN FUNGUSLARIN  
İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**Ayşe YENİLMEZ**

**Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Nisan, 2017**

**ERZURUM**

**Her Hakkı Saklıdır**

**T.C.**  
**ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TEZ ONAYI FORMU**

---

**FUNGAL BİYOPREPARATLARIN TİCARİ FORMÜLASYONLARINDA**  
**KULLANILABİLECEK UV-KORUYUCU PİGMENT ÜRETEN FUNGUSLARIN**  
**İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ danışmanlığında, Ayşe YENİLMEZ tarafından hazırlanan bu çalışma 07/04/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak **oy birliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

İmza .....  


Üye: Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

İmza .....  


Üye: Yrd. Doç. Dr. Yağmur ÜNVER

İmza .....  


Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

.....  


**Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ**

**Enstitü Müdürü**

Bu çalışma Erzurum Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: 2015/011

**ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

ETÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “FUNGAL BİYOPREPARATLARIN TİCARİ FORMÜLASYONLARINDA KULLANILABİLECEK UV-KORUYUCU PİGMENT ÜRETEN FUNGUSLARIN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

07/04/2017

*A. Yılmaz*.....

Ayşe YENİLMEZ

# ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

## FUNGAL BİYOPREPARATLARIN TİCARİ FORMÜLASYONLARINDA KULLANILABİLECEK UV-KORUYUCU PİGMENT ÜRETEN FUNGUSLARIN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Ayşe YENİLMEZ

Erzurum Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

Güneş ışığından kaynaklanan ultraviyole radyasyon (UV) entomopatojenik fungusların canlılığını etkileyen en önemli faktördür. Mikrobiyal ajanların doğada kalıcılığını arttırmak için yapılan çoğu uygulamada formüle edilen konidilere UV koruyucular ilave edilir. Bu uygulamalara rağmen, birçok durumda formüle edilen konidilerin alan etkinlikleri zararlıların kontrolü için hala tam olarak yeterli değildir. Bu nedenle pigmentler gibi UV koruyucu yeni doğal ürünlerin keşfine ihtiyaç vardır. Bu amaçla Erzurum'da 1800 m ve üzeri rakımda 20 farklı noktadan toprak örnekleri alındı. Laboratuvarda yapılan izolasyonlarda pigment ürettiği tespit edilen 2 filamentöz fungus ve 6 maya izolatu saflaştırıldı. Yapılan ön seleksiyonda bu pigment üretici funguslar içerisinde sadece A2 ve A3 kodlu maya izolatları pigment ekstrasyonuna yatkın olmasından dolayı seçildi ve pigmentler saflaştırıldı. Ardından bu iki izolata ait pigment örnekleri 0,5 mg/ml, 1 mg/ml ve 2,5 mg/ml olacak şekilde *Beauveria bassiana* spor süspansiyonlarına ilave edildi. Pigment ilave edilen süspansiyonlar 15, 30 ve 60 dakika boyunca UV ışınları ile muamele edildi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda pigment ilavesi bütün denemelerde UV ışınlarına karşı koruma sağlayarak konidi çimlenmesini arttırdı. En iyi sonuçlar A2 izolatına ait pigmentin ilavesi ile elde edildi. PaF04 kodlu *B. bassiana* izolatının 30 dakika UV ile muamelesi sonucu konidi çimlenme oranı %39.58'e düşerken, 0,5 mg/ml konsantrasyonunda A2 pigment ilavesi sonucunda bu oran %99.16 olarak kaydedildi. Bu nedenle A2 pigmentinin antimikrobiyal özelliği, antioksidan aktivitesi ve mayanın moleküler karakterizasyonu gerçekleştirildi. Yapılan çalışmaların sonucunda, pigmentin UV koruyucu özelliğinin yanında antioksidan aktivite gösterdiği belirlendi. Ayrıca gram negatif G(-) ve gram pozitif G(+) bakterilere karşı antibakteriyal özellik gösterirken, antifungal aktivite göstermedi. A2 kodlu izolat, yapılan ITS sekans analizi sonucu *Sporobolomyces roseus* olarak tanımlandı ve KY705066 erişim numarası ile GenBank'a kaydedildi.

2017, 53 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** UV koruyucu, pigment, *B. bassiana*, *Sporobolomyces roseus*

## ABSTRACT

MS Thesis

### THE ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF UV- PROTECTIVE PIGMENT PRODUCING FUNGI FOR USING IN COMMERCIAL FORMULATIONS OF FUNGAL BIOPREPARAT

Ayşe YENİLMEZ

Erzurum Technical University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Molecular Biology and Genetics

Advisor: Asst. Prof. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

The ultraviolet radiation (UV) from sunlight is the most important factor affecting the viability of entomopathogenic fungi. The UV protectants are added to the formulated conidia in most applications to increase the persistence of microbial agents in the environment. However, the field efficiency of the formulated conidia in many cases are still not sufficient to control the pests. So, there is a need for the discovery of new UV protectant products such as pigments. For this purpose, soil samples, 1800m and above altitude in Erzurum, were collected from 20 different points. Isolation studies in the laboratory, 2 filamentous fungi and 6 yeasts were identified that produced pigment. In this preliminary selection, only the A2 and A3-coded yeast isolates from this pigment producer fungus were selected because of their susceptibility to pigment extraction and the pigments purified. The pigment samples of these two isolates were then added to *Beauveria bassiana* spore suspensions as 0.5mg/ml, 1mg/ml and 2.5mg/ml. The suspensions added with pigment were exposed to UV rays for 15, 30 and 60 minutes. In the light of the obtained results, the addition of pigments increased the conidial germination by providing protection against UV rays in all experiments. The best results were obtained by the addition of pigment, which is belonged to the A2 isolate. As a result of exposed to the UV light for 30 minutes of *B. bassiana* isolate, which is coded PaF04, the conidia germination rate decreased to 39.58%, while the addition of A2 pigment at a concentration of 0.5mg/ml was recorded as 99.16%. Therefore, the antimicrobial properties of the A2 pigment, the antioxidant activity and the molecular characterization of the yeast have been realized. As a result of the studies carried out, it was concluded that the pigment exhibits antioxidant activity as well as UV protective properties. In addition, while showing antibacterial properties against G(-) and G(+) bacteria, it did not show antifungal activity. According to the results of ITS sequence analysis, A2-coded isolate was identified as *Sporobolomyces roseus* and deposited with the GenBank database under the accession number KY705066.

2017, 53 pages

**Keywords:** UV protectant, pigment, *B.bassiana*, *Sporobolomyces roseus*

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmalarımın planlanmasından tamamlanmasına kadar çalışmalarımın her aşamasında sonsuz desteği olan, bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, ilgisini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ'ye,

Deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarından ve deneyimlerinden faydalandığım Sayın Arş. Gör. Ayşenur ÖZDEMİR YAZICI'ya,

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi tezimin her aşamasında da yanımda olan ve neşeleri ile bana her zaman moral veren can arkadaşlarım Hande YILMAZ ve Nurşah AYDIN'a,

Çalışmanın yürütülmesi sırasında her türlü desteği sağlayan Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyelerine,

Ve şüphesiz beni yetiştirip bugünlere getiren hayatım boyunca sevgi, ilgi ve desteklerini eksik etmeyen, sıkıntılarımı paylaşan, her zaman sabırlı ve hoşgörülü olan ailemin her bireyine ayrı ayrı, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Erzurum Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu -2015/011 no'lu projenin maddi destekleriyle gerçekleştirilmiştir.

**Ayşe YENİLMEZ**

**Nisan, 2017**

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Biyolojik Mücadele.....	2
1.2. Entomopatojen Funguslar ve Sınıflandırılması .....	2
1.2.1. Entomopatojen fungusların etki mekanizması .....	3
1.2.2. Entomopatojen fungusların güvenilirlikleri .....	5
1.2.3. Entomopatojen fungus preparatları ve üretimi.....	6
1.2.4. Çevre şartlarının etkisi .....	7
1.2.5. Fungal entomopatojenler ve UV ışınları.....	7
1.2.6. Entomopatojen fungusların formülasyonları.....	9
1.2.7. UV koruyucu pigmentler .....	10
1.2.8. Fungal pigmentler .....	14
1.2.9. Güneş ışığının zararlı etkileri ve karotenoidlerin UV koruyucu etkisi .....	15
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM .....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Kullanılan cihazlar.....	20
3.1.2. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar .....	21
3.1.3. Kullanılan besiyerleri ve kimyasallar .....	21
3.2. Yöntem .....	21
3.2.1. Pigment üreten fungusların izolasyonları ve pigment ekstraksiyonu .....	21
3.2.2. Elde edilen pigmentin UV-görünür bölge absorpsiyon ve TLC analizi .....	22
3.2.3. Spor süspansiyonunun hazırlanması.....	23

3.2.4. Spor çimlenmesinin belirlenmesi .....	23
3.2.5. UV radyasyonuna dayanıklılıklarının belirlenmesi.....	23
3.2.6. Pigmentin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi.....	24
3.2.7. Pigmentin <i>B. bassiana</i> 'nın miselyal gelişimine ve spor çimlenmesine etkisi.....	24
3.2.8. Pigmentin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi.....	25
3.2.9. Pigment üreten fungusun moleküler karakterizasyonu.....	26
3.2.10. İstatistiksel analiz .....	27
4. ARASTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	28
4.1. Pigment Üreten Fungusların İzolasyonları ve Pigment Ekstraksiyonu .....	28
4.2. UV-görünür bölge absorpsiyon ve TLC analizinin değerlendirilmesi.....	29
4.3. Spor Çimlenmesinin Değerlendirilmesi .....	30
4.4. UV Radyasyonuna Dayanıklılıklarının Değerlendirilmesi .....	30
4.5. Pigmentin Antimikrobiyal Aktivitesinin Değerlendirilmesi .....	34
4.6. Pigmentin Antioksidan Kapasitesinin Değerlendirilmesi .....	35
4.7. Pigmentin <i>B. bassiana</i> 'nın Miselyal Gelişimine ve Spor Çimlenmesine Etkisinin Değerlendirilmesi.....	36
4.8. Pigment Üreten Fungusun Moleküler Karakterizasyonunun Değerlendirilmesi.....	38
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	40
KAYNAKLAR .....	42
EKLER .....	52
EK 1. <i>Sporobolomyces roseus</i> A2 izolatının ITS1-5.8S-ITS2 bölgesinin birleştirilmiş baz dizisi (GenBank No: KY705066).....	52
ÖZGEÇMİŞ .....	53



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Böcek paraziti fungusların böceklerdeki etki mekanizması .....	4
1.2. Böcek kütikulasının yapısı ve entomopatojen fungusların penetrasyon mekanizması .....	5
1.3. Çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen pigment renkleri .....	12
1.4. UV ışımına maruz kalındığında gerçekleşen olayların şematik gösterimi .....	15
4.1. İzolasyon petri görüntüsü ve izole edilen maya örnekleri .....	28
4.2. Pigment ekstraksiyon deneylerinin gösterimi .....	29
4.3. A2 pigmentine ait UV absorpsiyon spektrumu ve TLC görüntüsü .....	29
4.4. Steril kabin içerisinde UV radyasyonuna maruz bırakılan sporlar .....	30
4.5. Pigmentlerin <i>C. albicans</i> 'a karşı antimikrobiyal aktivite testi .....	34
4.6. Pigmentlerin <i>S. aureus</i> ve <i>P. aeruginosa</i> 'a karşı antimikrobiyal aktivite testi .....	34
4.7. Pigmentlerin <i>E. coli</i> ve <i>E. faecalis</i> 'e karşı antimikrobiyal aktivite testi .....	35
4.8. Pigmentlerin ve askorbik asitin antioksidan aktivite testi ve sonuçları .....	36
4.9. Pigmentin farklı konsantrasyonlarının <i>B. bassiana</i> 'nın miselyal gelişimine etkisi ...	37
4.10. Çoğaltılan 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S bölgesinin bant görüntüsü .....	39

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Pigment üreten mikroorganizmalar ve önerilen biyoaktiviteleri.....	13
3.1. Araştırmalar sırasında kullanılan cihazlar .....	20
4.1. UV uygulamasından sonra sporların canlılık oranı (%) .....	31
4.2. Pigmentin farklı konsantrasyonlarının <i>B.bassiana</i> 'nın miselyal gelişimine etkisi ..	37
4.3. Pigmentin farklı konsantrasyonlarının <i>B.bassiana</i> 'nın spor çimlenmesine etkisi ...	38

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
gr	Gram
l	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
µm	Mikrometre
mm	Milimetre
UV	Ultraviyole

### Kısaltmalar

CDA	Czapek Dox Agar
DMSO	Dimetil Sülfoksit
PDA	Patates Dekstroz Agar
SDA	Sabaroud Dekstroz Agar
MYEA	Malt Yeasts Extract Agar
MHA	Mueller-Hinton Agar
TLC	İnce Tabaka Kromatografi

# 1. GİRİŞ

Son yıllarda pestisitlerin yaygın kullanımına karşı zararlıların oluşturduğu direnç, mücadelede kullanılan pestisitlerin dozunun ve sayısının artmasına sebep olmuş, bu da üretim maliyetini arttırırken diğer yandan da pazara sürülen tarımsal ürünlerin üzerinde insan hayatını tehdit eden pestisit kalıntılarının ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu nedenlerle organik tarıma doğru bir gidişin olduğu günümüzde, zararlılarla mücadelede sürdürülebilir tarım tekniklerine uygun, çevreye ve insan sağlığına duyarlı ürün yetiştirebilmek için yeni alternatiflere ihtiyaç duyulmuştur.

Son yıllarda yapılan çalışmalar en iyi alternatifin biyolojik mücadele olduğunu göstermektedir. Biyolojik mücadelede bakteriler, funguslar, virüsler, nematotlar ve çeşitli avcı böcekler kullanılmaktadır. Her organizma grubunun hedef zararlıya göre değişen bazı avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Özellikle entomopatojen funguslar hedef zararlıya mekanik olarak zarar vermeleri, konidi üretiminin ve uygulamasının kolay olması, memeliler üzerinde toksik etkilerinin bulunmaması gibi nedenlerden dolayı diğerlerinden ayrılırlar. Fakat konidilerin doğal şartlarda devamlılığını sağlamak sorun teşkil etmektedir.

Güneş ışınları entomopatojen fungusların konidilerinin alan şartlarındaki canlılığının azalmasına neden olur. Bu ışınların fungusların doğadaki kalıcılığına etkisi biyopreparatın formülasyonuna ve fungusun türüne göre değişiklik gösterir. Bu nedenle doğal olarak UV'ye toleranslı olan suşların seçilmesi umut vadeden biyolojik kontrol ajanlarının tespitinde önemli bir adım olarak düşünülmektedir.

Diğer yandan, mikrobiyal ajanların alanda kalıcılığını arttırmak için yapılan çoğu uygulamada formüle edilen konidilere UV koruyucular ilave edilir. Bunlar; tinopal, oxybenzone gibi UV koruyucu kimyasalların, UV yansıtıcı bileşiklerin ya da çeşitli formülasyon katkılarının denenmesi şeklinde olmuştur. Bu uygulamalara rağmen, birçok durumda formüle edilen konidilerin alan etkinlikleri, zararlıların kontrolü için hala tam olarak yeterli değildir. Çünkü bu bileşiklerin çoğu UV koruyucu özellik gösterirken, patojenitenin azalmasına neden olmaktadır.

Bunun yanında tamamen doğal yollarla mücadele amaçlanırken, biyopreparatlar içerisinde çeşitli kimyasal katkıların kullanılması da kabul edilebilir bir durum değildir. Bu nedenle pigmentler gibi UV koruyucu yeni doğal ürünlerin keşfine ihtiyaç vardır.

Doğada bakteriler ve funguslar gibi birçok mikroorganizmanın kendisini çeşitli radyasyon türlerinden korumak için metabolitler ürettiği bilinmektedir. Bu metabolitler organik olmalarından dolayı biyoteknolojik uygulamalarda birçok kullanım alanına sahiptir. Mikrobiyal pigmentler bu metabolitlerin başında gelir ve mikroorganizmayı fiziksel veya biyokimyasal yollarla radyasyona karşı korur.

Bu çalışmada biyolojik mücadelenin vazgeçilmez unsuru olan fungusların, arazi şartlarında daha etkin kullanımını mümkün kılmak için ticari formülasyonlarda kullanılacak UV koruyucu pigment üreten fungusların izolasyonu, karakterizasyonu ve saflaştırılan pigmentin çimlenen *Beauveria bassiana* sporlarını UV radyasyona karşı koruması amaçlanmıştır.

### **1.1. Biyolojik Mücadele**

Sürdürülebilir tarım tekniklerine uygun, çevreye ve insan sağlığına duyarlı ürün yetiştirebilmek için üründe kalite yönünden önemli kayıplara neden olan hastalıklar, yabancı otlar ve zararlılara karşı da bilinçli bir mücadele yapmak gerekmektedir. Ürün kayıplarına neden olan bu canlılara karşı, değişik mücadele yöntem ve teknikleri geliştirilmiştir. (Uygun vd. 2010). Bu mücadele çeşitlerinden biri olan biyolojik mücadele, hedef organizmanın popülasyonunu kontrol altına alan veya varlığında hedef organizma popülasyonlarında normalden fazla azalmaya sebep olan avcı, parazit veya patojen organizmalarla yapılan mücadeledir (Debach 1974).

### **1.2. Entomopatojen Funguslar ve Sınıflandırılması**

Funguslar spor üreten, genellikle hem eşeyli hem de eşeysiz olarak çoğalan, hif olarak bilinen ipliksi, dallanmış somatik yapıya sahip ve tipik olarak hücre duvarı bulunduran ökaryot organizmalardır (Alexopoulos vd. 1996). Entomopatojen funguslar

ise, böceklerde veya çeşitli artropodlarda hastalık meydana getiren veya ölüme sebep olan funguslardır ve böcek kütikulasına tutunma, penetrasyon ve konak içerisinde çoğalmalarıyla tanınırlar (Charnley ve Collins 2007). Entomopatojen funguslar, zararlı eklembacaklılarla mücadelede kullanılan ilk patojen mikroorganizmalardır (Rombach ve Gillespie 1988).

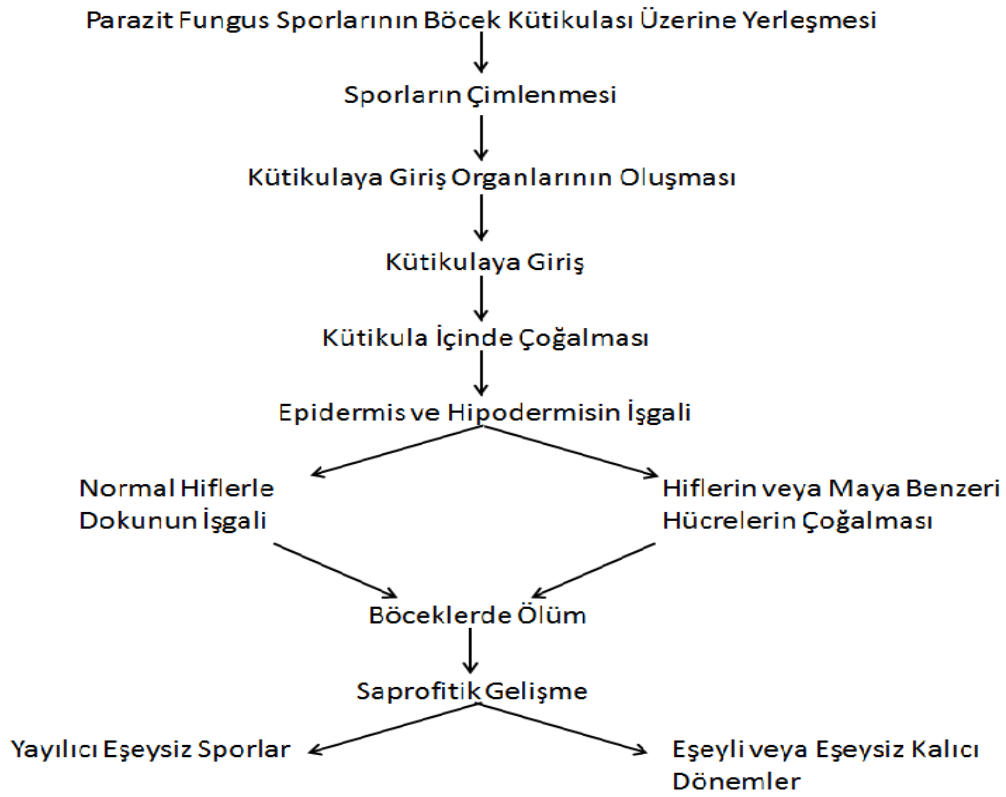
Fungal entomopatojenlerle yapılan mücadele, kimyasal insektisitlere göre daha geç cevap verir. Söz konusu tarımsal ürünlerin ekonomik değeri olduğunda bu istenmeyen bir durumdur. Bu nedenle fungal patojenlerin daha hızlı tesir etmesi için; öldürücü dozun altında kimyasal insektisidlerle karıştırılması (Irigaray vd. 2003) ya da diğer entomopatojenik bir bakteri veya onun toksini ile birlikte kullanılması (Kryukov vd. 2009) gibi bazı stratejiler geliştirilmiştir. Bu stratejilerin temeli, çeşitli streslerle konukçuyu zayıflatarak, fungal patojenin daha hızlı tesir etmesini sağlamaktır (Charnley ve Collins 2007).

Günümüzde 85 cinse ait 700 kadar entomopatojen fungus türü belirlenmiştir. Ancak bunlardan birkaç tanesi potansiyel mikoinsektisit olarak umut verici görülmektedir (Charnley ve Collins 2007). Zygomycota'ya ait Entomophthorales takımı, *Conidiobolus*, *Entomophaga*, *Erynia* ve *Pandora* cinsleri ile yaygın olarak temsil edilir. En yaygın böcek patojenlerini içeren grup ise Ascomycota'ya ait Hypocreales takımıdır. Bu grubun en tanınmış üyeleri olan *Beauveria* ve *Metarhizium* cinsleri bugün birçok mikoinsektisit ana materyalini oluşturmaktadır. Ascomycota'ya ait diğer önemli entomopatojenlerin bulunduğu gruplar; *Nomuraea*, *Lecanicillium*, *Isaria* ve *Aschersonia* cinsleridir (Shah ve Pell 2003; Charnley ve Collins 2007).

### **1.2.1. Entomopatojen fungusların etki mekanizması**

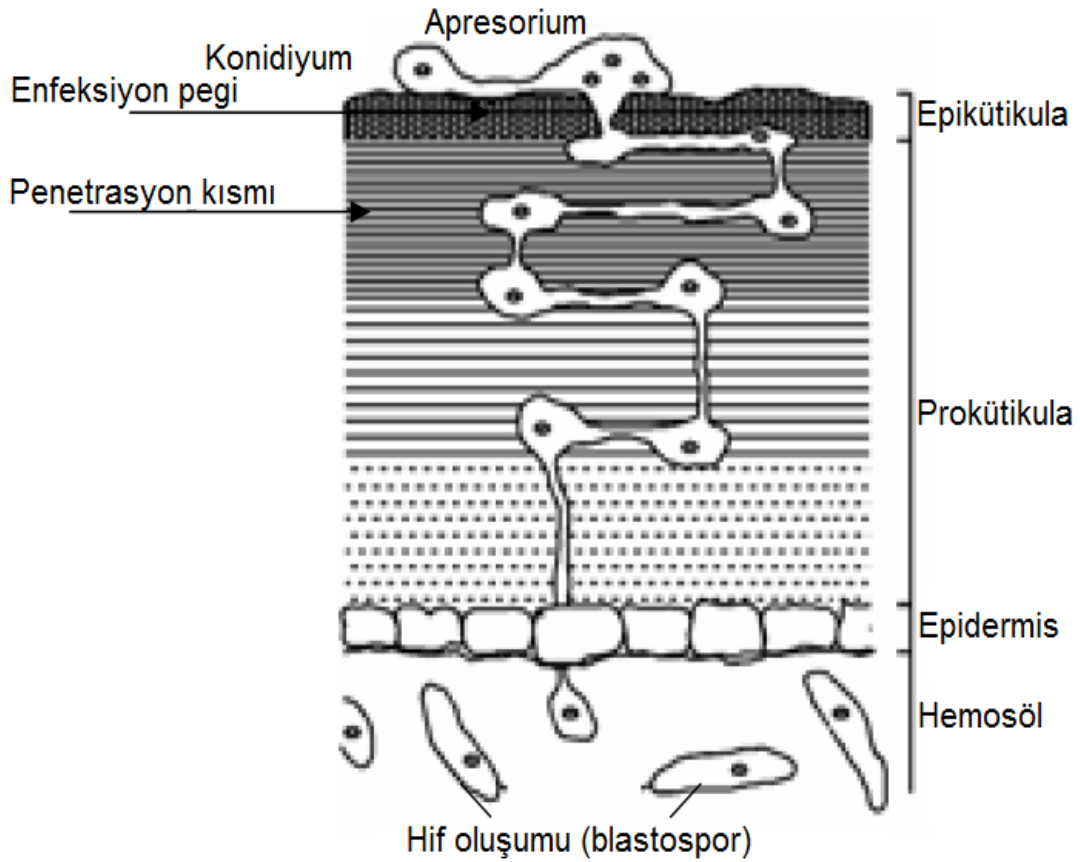
Fungusların böcek kütikulasına doğrudan giriş yapabilme yeteneği ve besin yolu ile alınma zorunluluğunun olmayışı, beslenmenin olmadığı böcek gelişim evrelerinin de enfekte edilebilmesini mümkün kılar. Kütikula konukçunun savunma sisteminde en büyük bariyerdir (Pekrul ve Gula 1979). Kütikulanın yapısal özellikleri ve yüzeyinde ihtiva ettiği enzim inhibitörleri ve antimikrobiyal bileşikler, zayıf patojenlerin kolayca

elemine edilmesini sağlar. Fungusların böceğe giriş yaptığı alanlar solunum boşlukları, segmentler arası boşluklar ve ağız parçaları gibi genelde lokal olarak yüksek nem oranına sahip olması ile spor çimlenmesini kolaylaştıran bölgelerdir (Charnley ve Collins 2007). Konukçu kütikulasına yapılan bu giriş, hem enzimatik hem de apresorium oluşumu vasıtası ile mekanik olarak gerçekleşir (Leger vd. 1988; Charnley ve Leger 1989). Böcek üzerinde çimlenen spor, kütikulayı ve epidermisi geçtikten sonra vücut boşluğunda çoğalır. Bu sırada meydana gelen fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler muhtemelen böceğin ölümü ile sonuçlanır. Fungal hifler hayat döngüsünü tamamlamak için tekrar konukçu kadavrasından dışarı doğru hareket eder ve hava ile karşılaştığında sporulasyon başlar (Charnley ve Leger 1989). Bu sporulasyonun rengi ve oluşturulan üreme yapıları çoğu zaman fungusun cinsini belirlemede ipuçları verir (Sundarababu 1985). Aynı zamanda oluşan bu sporlar hastalığın yayılmasına da katkıda bulunur (Charnley ve Collins 2007). Şekil 1.1 entomopatojen fungusların böceklerdeki etki mekanizmasını şematize olarak açıklamaktadır.



Şekil 1.1. Böcek paraziti fungusların böceklerdeki etki mekanizması (Erkılıç ve Uygun, 1993)

Şekil 1.2 ise fungal konidinin konukçu içerisindeki penetrasyon şeklini açıklamaktadır. Konidinin konukçu kütikulasına tutunması fungal enfeksiyonun hem ilk aşaması hemde en önemli kısmını oluşturmaktadır. Konidinin konukçu integumentine teması enfeksiyonun konidial evresi için gerekli olan düz ve ince silindirik yapıdaki çubuklar tarafından oluşturulan non-spesifik kuvvetler vasıtasıyla gerçekleşir.



Şekil 1.2. Böcek kütikulasının yapısı ve entomopatojen fungusların penetrasyon mekanizması (Clarkson ve Charnley, 1996)

### 1.2.2. Entomopatojen fungusların güvenilirlikleri

Mikotoksinler, fungusların ürettiği toksinlerdir ve bu toksinlerin büyük çoğunluğu filamentli funguslar olan küfler tarafından üretilir (Vurro 2007). Funguslar ürettikleri toksinlerle kendi yaşama şanslarını arttırmaya çalışırlar. Birçok durumda entomopatojen fungus, öldürdüğü konukçusunun üzerinde saprofitik bir mikroorganizmanın



gelişmesine izin vermez, bunu ise ürettiği sekonder metabolitlerle sağlar. Diğer taraftan fungusların ürettiği bu toksinler bazen tek başlarına bile konukçunun ölümüne sebep olabilirler. Bazı toksinler de funguslarla beslenen organizmalara uzaklaştırıcı etki yaparlar (Goettel vd. 2001; Vey vd. 2001; Vurro 2007; Örtücü vd. 2010). Bazı araştırmacılar, entomopatojen fungus toksinlerini yeni biyolojik insektisitlerin kaynağı olarak görmektedir (Seger vd. 2005). Diğer yandan gıda güvenliği konusunda yapılan araştırmalarda bu toksinlerin gıda zincirine geçtiğine dair bir kayıt bulunmamaktadır (Vey vd. 2001; Charnley ve Collins 2007). Ayrıca *B. brongniartii* ile yapılan bir çalışmada bu fungusun toksini olan oosporein toksininin bazik şartlarda hızla bozulduğu, uçucu olmadığı için soluma ile alınmadığı ve en önemlisi çeşme suyu ile yıkandığında ürünlerin üzerinden uzaklaştırılabileceği vurgulanmıştır (Seger vd. 2005).

### **1.2.3. Entomopatojen fungus preparatları ve üretimi**

Dünyada 21 farklı ülkede entomopatojen fungus orjinli biyoinspektisit üretimi yapılmaktadır. Fakat bu üretimler toplamda 3 veya 4 farklı uluslararası şirketin elinde olup, yerel üretim yapan az sayıda ülke bulunmaktadır. Genelde ticari mikoinsektisitler tek bir fungus izolatu içerir. Fakat Vertikal adlı üründe olduğu gibi aynı fungusun iki ayrı izolatu ya da Meta-ven ve Bassi adlı ürünlerde olduğu gibi iki farklı entomopatojen fungus karıştırılarak da sunulabilir (Charnley ve Collins 2007).

Mikoinsektisitlerin kitle üretiminde ilk basamak, etkili strainlerin seçimi ve uygun maliyetli üretim metodlarının geliştirilmesidir (Talwar 2005). Çoğu entomopatojen fungusun büyüme gereksinimleri yetersiz tanımlanmıştır. Bu bilgi kitle üretimi için temeldir. Entomopatojen funguslar; oksijen, su, karbon ve azot kaynağı, büyüme faktörleri ile mineralleri içeren ilave elementlere ihtiyaç duyar. Üretimin çoğu katı substratlar üzerinde ya da iki fazlı olarak yapılmaktadır. Fakat Vertalec ve Vertiblast ürünlerinde olduğu gibi blastospor üretimi söz konusu olduğunda sıvı fermantasyon kullanılır (Gao ve Liu 2009).

#### 1.2.4. Çevre şartlarının etkisi

Funguslar, spor formunda ya da miselyum formunda toprakta canlılıklarını sürdürebilir. Funguslar için bir rezervuar görevi gören toprağın sıcaklığı, pH'sı, su ve organik madde içeriği fungusların canlılığını etkileyen faktörlerdendir (Charnley ve Collins 2007). Bunun yanında konidilerin doğal koşullarda kalıcılığı, su aktivitesi, sıcaklık (Hallsworth ve Magan, 1999) ve UV ışınları (Morley- Davies vd. 1995) gibi bir çok çevresel faktörden etkilenir. Sıcaklık, nem ve güneş ışığı gibi abiyotik faktörler, enfeksiyonun oluşup oluşmaması üzerinde etkilidir. Çimlenme ve sporulasyon özellikle neme bağlıdır (Getzin 1961; Allen vd. 1971).

Abiyotik faktörler arasında güneşten gelen radyasyon DNA, biyozarlar, RNA ve ribozomlar gibi hücre moleküllerine zarar vererek entomopatojen funguslara karşı çok zararlı olduğu düşünülmektedir (Engelberg vd. 1994; Griffiths vd. 1998; Braga vd. 2001). Radyasyon toleransı hasarı önleyen, azaltan ya da onaran savunma mekanizmalarını içeren karışık bir mekanizmadır (Chelico vd. 2006). Güneş ışığının UV-B bileşeni DNA'da primidin dimerlerinin oluşmasını teşvik ederek mutasyona veya transkripsiyonda hatalara neden olur (Ignoffo vd. 1977; Friedberg vd. 1995; Griffiths vd. 1998). UV-A ise reaktif oksijen türlerinin üretilmesine neden olur (Griffiths vd. 1998).

#### 1.2.5. Fungal entomopatojenler ve UV ışınları

Genelde entomopatojen fungus konidilerinin sıcak ve tropikal bölgelerde yazın öğle güneşine birkaç saat maruz kalması tamamen inaktive olmaları için yeterlidir (Fernandes vd. 2007). UV radyasyonun diğer bir etkisi ise çimlenmenin gecikmesi olarak gösterilmiştir (Moore vd. 1993; Braga vd. 2001). UV, konidi çimlenmesini ve çim tüpü oluşumunun erken evrelerini etkiler (Alves ve Lecuona 1998). Bell (1974) göre, *B. bassiana* 3 saat direkt güneş ışığına maruz kaldığında onun enfeksiyon yeteneği kaybolur. Yao ve ark. (2010), *B. bassiana* ve *M. anisopliae*'nin en toleranslı izolatlarının bile bir gün güneş ışığına maruz kaldığında hayatta kalmayacağını belirtmişlerdir. Güçlü güneş ışınlarına maruz kalınan durumlarda gerçekleşen bu inaktivasyon ve

çimlenme gecikmesi biyoinsektisit olarak kullanılan bu organizmaların verimliliğini azaltır (Braga vd. 2002).

Güneş ışınları içerisinde özellikle UV-A ve UV-B fungal üreme yapılarının üzerindeki en büyük öldürücü faktördür ve mikoinsektisidlerin doğal ortamda kalıcı olamamasından sorumludur. UV-A ışınları (320–400 nm) güneşten gelen toplam UV ışınlarının yaklaşık %95'ini oluşturur ve konidi ölümleri ve çimlenmenin gecikmesinden sorumludur (Braga vd. 2001a). Fakat UV-B ışınlarının (280–320 nm) daha zararlı olduğu kabul edilir (Moore vd. 1993). UV-B ışınları direkt olarak entomopatojen fungusların konidilerinin alan şartlarındaki canlılığının azalması ile ilişkilidir (Fargues vd. 1997). UV-B radyasyona dayanıklı izolatların seçilmesi ve biyopreparatların formülasyonlarına UV koruyucuların eklenmesi yoluyla entomopatojenlerin doğal şartlardaki kalıcılığını ve hedef zararlılara karşı etkinliğini arttırmak mümkün olabilir (Fargues vd. 1996). Bu nedenle çoğu çalışma genel olarak UV-B zararının iyileştirilmesi üzerine odaklanmış (Jaronski 2010) ve entomopatojen fungus konidilerinin yapay veya doğal UV ışık kaynaklarına doğrudan maruziyetinin etkileri araştırılmıştır (Edgington vd. 2000; Morley-Davies vd. 1995).

*B. bassiana*'nın etkin kullanımı konidilerin canlı kalma ve hedef zararlıyı enfekte yeteneğine bağlıdır (Inglis vd. 1997a). Ayrıca alan uygulamalarında konidi canlılığının korunması ve sürekliliği entomopatojenik fungusların etkililiğini etkileyen kritik faktörlerdir (Thompson vd. 2006). Güneş ışınlarının entomopatojen fungusların doğadaki kalıcılığına etkisi biyopreparatın formülasyona (Alves vd. 1998; Edgington vd. 2000) ve fungusun türüne (Ignoffo ve Garcia 1994) göre değişiklik gösterir. UV-B ışınlarından korunmayı sağlamak için *B. bassiana* formülasyonları gereklidir. Böylece konidilerin canlılığı ve etkinliği arttırılabilir (Posadas vd. 2012). Bu nedenle, formülasyonlarda fotokoruyucu ajanların kullanımı gibi koruyucu önlemler gereklidir (Edgington vd. 2000; Reddy vd. 2008).

### 1.2.6. Entomopatojen fungusların formülasyonları

Funguslar UV'ye duyarlıdır. Formülasyonlar fungal entomopatojenlerin doğal koşullar altında başarılı olmasında önemli rol oynar. Güneş ışığının zararlı etkilerinden dolayı mikrobiyal kontrol ajanlarının arazideki kalıcılığı azalır. Bu nedenle çiftçiler mikrobiyal kontrol ajanının arazideki popülasyonunun sürekliliğini sağlamak için art arda uygulama yapmak zorunda kalabilir ve bu durum fazladan iş gücü ve maliyet getirir. Arazi şartlarında konidilerin canlılığını devam ettirmek için, UV radyasyondan koruyucu formülasyonlara sahip biyopreparatların kullanımı iyi bir alternatiftir (Jones, K.A. ve Burges, H.D. 1998; Batista vd. 1998). Bu nedenle biyopreparat üreticileri çeşitli UV koruyucu özellikte katkılarla formülasyonları geliştirmektedirler (Edgington vd. 2000; Leland ve Behle 2005).

Entomopatojenleri içeren biyopreparatlar genelde ıslanabilir toz formunda ya da yağlı süspansiyonlar halinde hazırlanır (Faria ve Wraight 2007). Islanabilir toz formülasyonlar kurutulmuş fungal üreme yapılarından hazırlanır, suda süspansiyon edilir ve bu süspansiyon uygulama için kullanılır. Her iki çeşit süspansiyon da tipik olarak sprey şeklinde uygulanır. Yağ tabanlı formülasyonların kullanımı bazı durumlarda bitki üzerinde fitotoksik etkilere neden olabildiğinden (Hoy 2008) çoğu durumda ıslanabilir toz formülasyonlar avantajlı olabilir (Jackson vd. 2010). Ayrıca *Beauveria spp.* konidileri sulu formülasyonlara göre yağlı formülasyonlarda canlılığını daha uzun süre koruyabilir (Bateman vd. 1992). Şu anda mevcut olan ticari biyopreparatlar arasında yaklaşık %25'i yağlı formülasyonlardan, kalan %75'i ise herhangi bir katkı maddesi içermeyen ürünlerden oluşmaktadır (Faria ve Wraight 2007; Michereff vd. 2009).

UV'ye dayanıklılığın artırılmasında yapılan çalışmalar, çeşitli yüzey aktif maddelerin, UV koruyucu kimyasalların ya da çeşitli formülasyon katkılarının denenmesi şeklinde olmuştur (Lee vd. 2006; Hedimbi vd. 2008). Alternatif olarak enkapsülasyon yöntemi ile hazırlanan formülasyonlarda ise formülasyonlar jelatin, nişasta, selüloz ya da sodyum alginat içerisinde tutuklanmış mikroorganizmalardan hazırlanır (Burges 1998). Her bir partikül yüzlerce konidi içerir ve direkt kullanıma hazır olduğu için herhangi bir sıvıda süspansiyon etmeye gerek duyulmadan toprağa, hedef

zararlıya ve hatta bitkiler üzerine bile uygulanabilir (Burges 1998). Kullanılan diğer katkılar ise çeşitli yönlerden UV'ye karşı dayanıklılık sağlar. Örneğin, kil partikülleri güneş ışığı engelleyici olarak davranır ve UV ışınlarına maruz kalan konidiler için koruma sağlar. Kilin bu engelleyici etkisi yağın absorsiyon özelliği ile birlikte konidi canlılığını önemli ölçüde artırır. Optik yansıtıcı katkı ise UV ışığı soğurucu özellik göstermektedir. Tinopal gibi bileşenlerde UV-B radyasyonunu absorbe ederek korumaya katkıda bulunur. (Inglis vd. 1995a; Thompson vd. 2006).

### **1.2.7. UV koruyucu pigmentler**

Renk maddeleri, bitkisel, hayvansal, inorganik ya da mikrobiyal bir kaynaktan elde edilen ekstraksiyon, izolasyon, sentez veya benzeri işlemlerle yapılan boya, pigment veya diğer maddelerdir. Gıda, ilaç, kozmetik veya insan vücudunda uygulandığında ya da eklendiğinde renk (tek başına veya reaksiyon yoluyla) karakteristik bir özelliğe sahiptir (Anonymous, 1995). Renk verme özelliğine sahip pekçok madde molekül yapılarındaki farklılıklar nedeniyle farklı fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özelliklere sahiptirler ve bu özellikler onların hangi tip ürünlerde ve hangi amaçla ne şekilde kullanılacaklarını belirlemektedir (Sajilata vd. 2008).

Renk, genellikle duyular tarafından algılanan önemli bir bileşendir. Yapay renklerin toksisitesine karşı artan bilinçlenme ile pigmentlerin doğal kaynaklardan üretilmesi için talep artmıştır. Doğal renkler genellikle meyve, sebze, kök gibi bitkisel kaynaklardan elde edilir. Biyolojik kökeni nedeniyle "biyo renkler" denir. Doğal renklere gıda, ilaç, kozmetik, tekstil ve boya sanayinde artan bir talep vardır.

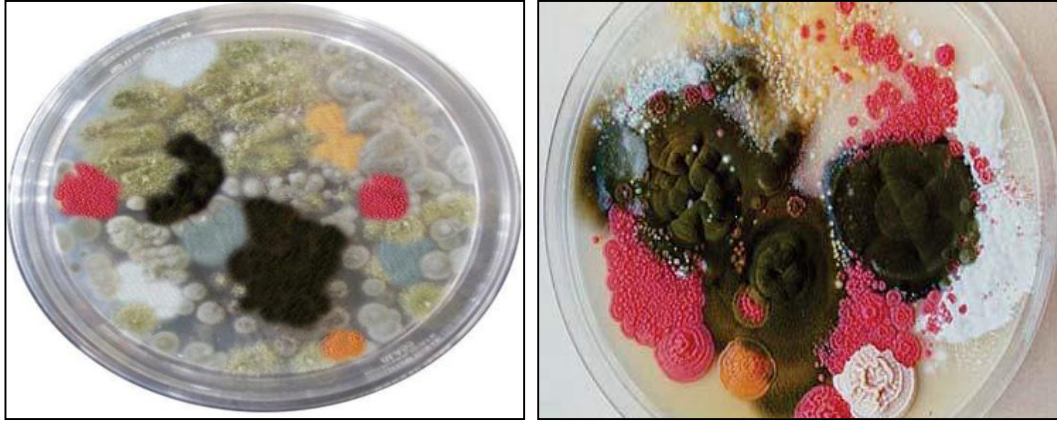
Mikrobiyal pigmentler, hiçbir mevsimsel üretim sorunu göstermediğinden ve yüksek verimlilik sağlamaları nedeniyle bitki veya hayvanlardan elde edilen doğal renk katkı maddeleri için umut verici bir alternatiftir. Pigment üreten mikroorganizmalar; doğada yaygın olarak bulunan maya, küf, bakteri ve mikro alglerdir (Goswami vd. 2010).

Doğal pigmentler iki ana kaynaktan, bitki ve mikroorganizmalardan elde edilebilir. Bitkilerden elde edilen doğal pigmentlerin değişken ışık, ısı ya da pH'ya karşı stabil olmaması, suda çözünmesi ve yıl boyunca elde edilememesi gibi birçok dezavantaja sahiptirler. Mikroorganizmalardan üretilen pigmentler daha stabil ve işlem basamaklarında daha sistematik olması nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Hava koşullarından bağımsız, ucuz kültür ortamlarında mikroorganizmaların kolay ve hızlı gelişmesi mikroorganizmalardan pigment üretiminde avantaj sağlamıştır. Böylece, mikrobiyal pigment üretimi çeşitli endüstriyel uygulamaları için gelişen araştırma alanlarından biri olmuştur (Venil ve Lakshmanaperumalsamy, 2009).

Laboratuvar çalışmalarında üretilen birçok patojenik mikroorganizmanın ortak özelliklerinden bir tanesi de kolonilerinin sahip olduğu renklerden kolay ayırt edilebiliyor olmasıdır. Pigmentasyon çeşitli renk tonlarındadır ve muhtemel klinik tanılarda renkten faydalanılır. Mikrobiyal pigment üretiminde son zamanlardaki biyokimyasal ve genetik tabanlı ilerlemeler, bazen renklerin seçici ışık absorbansı tarafından yansıyan ışığın renkleri değiştirmesini ortaya koyar. Çoğu durumda, mikrobiyal pigmentler bağışıklık sistemi tarafından veya sitotoksik veya teşvik edici özellik göstermeleri ile patojenlerin hastalık yapmasına katkıda bulunur (Liu ve Nizet, 2009).

Mikroorganizmalar, antibiyotikler, enzimler, vitaminler, tekstür ajanları gibi moleküllerin üretimi amacıyla uzun süreden bu yana kullanılmaktadır. Renk maddeleri, bitki veya mikroorganizma gibi biyolojik kaynaklardan elde edildiği zaman doğal olarak kabul edilir. Mikrobiyal pigmentlerin birçoğu sadece renklendirici ajan olarak kullanılmaz bunun yanı sıra bu pigmentler anti-kanser, anti-oksidan, anti-inflamatuar, anti-mikrobiyal ve anti-UV özelliğede sahiptirler. Günümüzde gıda, kozmetik veya tekstil uygulamalarında kullanılmak üzere bazı mikrobiyal pigmentlerin sanayi bazında üretimleri yapılmaktadır. Doğada renk bakımından zengin ve pigment üreten mikroorganizmalar (küfler, mayalar ve bakteriler) oldukça yaygındır. Mikroorganizmalar karotenoidler, melaninler, flavinler, kinonlar, prodigiosinler ve özellikle monaskinler, viyolaseyin veya indigo gibi çeşitli pigmentleri sentezlemektedir (Venil ve Lakshmanaperumalsamy, 2009).

Avrupa’da mikroorganizmalar kullanılarak pigment üretiminde ilk başarılı çalışma, *Blakeslea* küfünden  $\beta$ -karoten elde edilmesiyle sağlanmıştır. Bu yeni kaynak 1995’te Avrupa Gıda Katkı Maddeleri listesinde yer almıştır. AB Sağlık ve Tüketiciyi Koruma Dairesi, bu yolla sentezlenen  $\beta$ -karoteni kimyasal yollarla üretilene eşdeğer kabul etmiştir ve bu nedenle renklendirici olarak kullanımına izin vermiştir (Dufosse vd. 2005).



Şekil 1.3. Çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen pigment renkleri

Doğada birçok bakteri, alg, küf ve mayanın yapısında  $\beta$ -karoten bulunmaktadır. Biyoteknolojik olarak en çok çalışma *Phycomyces blakeleeanus* (Mucoraceae) ve *Blakeslea trispora* (Choanopheraceae) üzerinde yapılmıştır. Bunun yanında *Mucor mucedo*, *Ustilago violaceae*, *Neurospora crassa*, *Fusarium aquaeductum*, *Choanophora cucurbitarum* küfleri, *Rhodotorula* mayaları, *Dunalinella salina* ve *Dunalinella bardawill* mikroalglerinin de  $\beta$ -karoten sentezlediği belirtilmiştir.

Farklı mikroorganizmalar tarafından sentezlenen bazı pigmentler ve bu pigmentlerin sahip olduğu biyoaktiviteleri Çizelge 1.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 1.1. Pigment üreten mikroorganizmalar ve önerilen biyoaktiviteleri

<b>Pigment</b>	<b>Renk</b>	<b>Mikroorganizma</b>	<b>Aktivite</b>	<b>Referans</b>
Astaxanthin	Pembe-Kırmızı	<i>Haematococcus pluviialis</i>	Anti-oksidan, UV-koruyucu	Reyes vd. 1996
Canthaxanthin	Turuncu	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	Anti-oksidan, Anti-kanser	Chew vd. 1998
Undecylprodigiosin	Kırmızı	<i>Streptomyces spp.</i>	Anti-bakterial, Anti-oksidatif, UV-koruyucu	Stankovi c vd. 2012
Xanthomonadin	Sarı	<i>Xanthomonas oryzae</i>	UV-koruyucu	Rajagopal vd. 1997
Ankaflavin	Sarı	<i>Monascus spp.</i>	Anti-tümör, Anti-inflamatuvar	Hsu vd. 2011
Riboflavin	Sarı	<i>Ashbya gossypi</i>	Anti-kanser, Anti-oksidan, Kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu	Hong vd. 2008
β-karoten	Sarı-Turuncu	<i>Mucor, Neurospora crassa</i>	Anti-kanser, Anti-oksidan	Costa vd. 2005 Dufossé 2009
Astaxanthin	Kırmızı	<i>Phaffia rhodozyma, Xanthophyllomyces</i>	Anti-oksidan, UV-koruyucu	Ramirez vd. 2000 Flores Cotera ve Sanchez 2001
Melanin	Siyah	<i>Saccharomyces, Neoformans</i>	UV-koruyucu	Vinarov vd. 2003
Likopen	Kırmızı	<i>Fusarium Sporotrichioides, Blakeslea trispora</i>	Anti-kanser, Anti-oksidan	Giovannucci vd. 2002



### 1.2.8. Fungal pigmentler

Dünya üzerindeki çoğu fungus biyoüretim için bir potansiyele sahiptir ve organizmaların özellikle de insan sağlığı üzerindeki öneminin bilinmesiyle birlikte, fungal pigmentlerin üretimi üzerine odaklanmış araştırmalar hızla yaygınlaşmaktadır.

Pigmentler stres koşulları altında (besin kaynaklarının azalması, çevre koşullarının kötüleşmesi vb.) miselyum tarafından üretilen ikincil metabolitler olarak kabul edilir. Pigmentler fungusları; güneş ışığının ve UV-radyasyonun zararlı etkilerine karşı ve bakteri ve böcek saldırılarına karşı koruyabilir. Funguslardaki pigmentasyon fungusların alkali ile muamele edilmesine ve kültür yaşına bağlı olarak değişebilir.

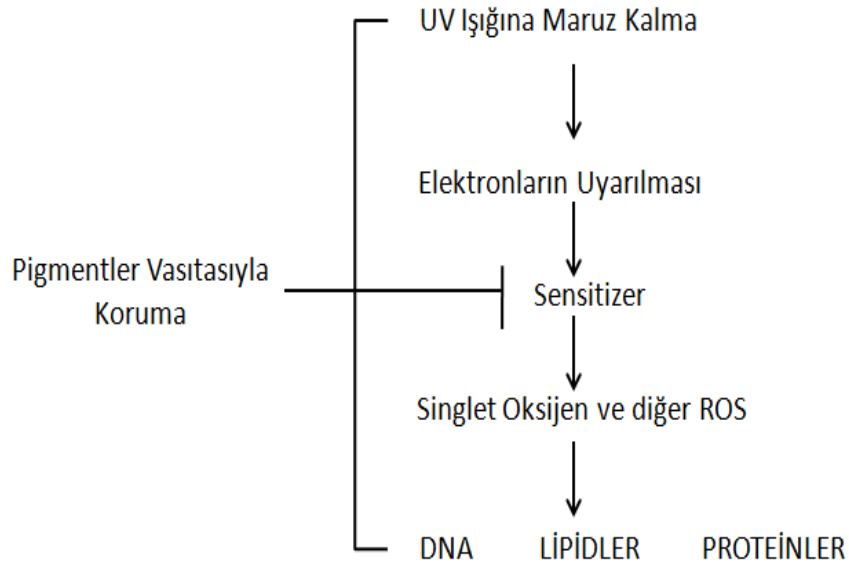
En yaygın fungal pigmentler karotenoidler (turuncu kırmızı), melaninler (koyu kahverengi pigmentler), likopen (koyu kırmızı) ve ksantofillerdir ve bu pigmentlerin varlığı fungusların yaşam süresi ve spor direncini arttırmak açısından önemlidir.

Temel besin kaynaklarının azalması durumunda fungus miselyumları kötü şartlarda hayatta kalmak için bu pigmentleri üretir. Fungus türleri birkaç farklı pigment karışımını bünyesinde barındırabilir, örneğin karotenoidler:  $\beta$ -karoten (turuncu),  $\gamma$ -karoten (kırmızımsı turuncu), likopen (koyu kırmızı) olarak bulunabilir. Bunlara ek olarak ksantofiller de baskın olabilir. Karotenoidler, fungus miselyumlarını zararlı güneş ışığı ve UV ışığından koruyabilir. Öte yandan, spor ve hif duvarlarında bulunan melanin ve sporopollenin gibi pigmentlerde radyasyon ve kuraklığa karşı koruma sağlayarak fungusun yaşam süresini uzatabilir.

Radyasyona karşı daha dirençli olan pigmentli sporların türü ve miktarı yükseklik, enlem, mevsim ve diğer yerel faktörlere bağlıdır. Harki vd. (1997) yaptıkları çalışmada, *Tuber melanosporum*'un doğal ve sentetik pigmentleri aynı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olmalarına rağmen pigmentin nitrojen öncülleri ve diskolorasyon zamanında önemli bir değişikliğin olduğu gözlemlenmiştir.

Melanin biyoloji dünyasında birçok fonksiyona sahip olağanüstü bir pigmenttir. Melanin kötü çevresel koşullarda fungusların hayatta kalmaları için mücadele yeteneğini artırır. Melanin fungusların UV ışık, iyonize radyasyon ve oksitleyici ajanlarla baş edebilmesinde yardımcı olur. BALB/c fareleri üzerinde yapılan son araştırmalarda melanin tüketiminin deney hayvanlarında canlı kalma süresini uzattığı ve radyasyona maruz bırakıldığında oluşan etkileri azalttığı görülmüştür (Kunwar vd. 2012). Yapılan bir başka çalışmada ise, *Gliocephalotrichum* 'dan elde edilen melaninin radioprotektör olarak rol oynadığı kanıtlanmıştır.

### 1.2.9. Güneş ışığının zararlı etkileri ve karotenoidlerin UV koruyucu etkisi



Şekil 1.4. UV ışığına maruz kalındığında gerçekleşen olayların şematik gösterimi

Güneş ışığına maruz kalındığında çeşitli biyokimyasal olaylar gerçekleşir. Uygun dalga boyundaki bir ışık uygun bir kromofor ile ekileşir. Bu kromofor doğrudan hasar görebilir veya sonraki reaksiyonlar için bir fotosensitör olarak işlev görür. Foto-oksidatif süreçler, ışığa maruz kalan tüm dokularda bulunan oksijen varlığında başlatılır. Bu süreç sonunda oluşan reaktif oksijen türevleri biyolojik moleküllere zarar vererek onların fonksiyonlarını zayıflatır.

Cilt üzerinde görülen güneş yanığı güneş ışığına aşırı maruz kalındığında görülen en yaygın hücresel bir cevaptır. Cildin bu kızarıklığı inflamatuvar yollarının uyarılmasından kaynaklanır ki bunu bazen ağrılı kabarcıklar ve ikinci dereceden yanıklar takip edebilir. UV-B ışığı, tipik bir güneş yanığının ana nedenidir.

Epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen sonuçlara ilaveten *in vivo* ve *in vitro* çalışmalardan elde edilen sonuçlarla birlikte pigmentlerin ışığa karşı bir koruma sağladığı kanıtlanmıştır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Son yıllarda entompatojen fungusların UV ışınlarına dayanımlarının artırılması üzerine araştırmalar yoğunluk kazanmıştır. Bu konu üzerinde yapılan bazı araştırmalar aşağıda özetlenmiştir.

Inglis vd. (1995a), suda ve yağda çözünür birkaç UV koruyucuyu laboratuvar testlerinde değerlendirmiş ve tanımlamıştır. Umut verici koruyucular dış ortamda test edildiğinde korumanın derecesi büyük oranda düşüş göstermiş olmasına rağmen %25 ila %37 oranlarında koruyucu etki tespit edilmiştir. Bu çalışmada araştırmacılar tinopal gibi su ile uyumlu optik yansıtıcının ve kil ilavesinin *B. bassiana* konidilerinin doğal koşullardaki kalıcılığını arttırdığını göstermiştir.

Fargues vd. (1996), *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *M. flavoviride* ve *Paecilomyces fumosoroseus* türleri üzerinde UV radyasyonun etkisini değerlendirmek için toz halindeki konidileri 1, 2, 4 ve 8 saat boyunca UV ışınına maruz bırakmışlardır. Sonuçta, 1 saatlik maruz kalma süresi ile *B. bassiana*'nın *M. anisopliae*'ye kıyasla UV radyasyona daha dirençli olduğunu ortaya koymuşlardır.

Alves vd. (1998), yerfıstığı yağının 4 ve 6 saat UV-B radyasyon uygulamasından sonra *Metarhizium anisopliae* konidilerinin etkili bir şekilde korunduğunu bulmuşlardır. Inglis vd. (1996), ayçiçek yağında hazırlanan *B. bassiana* konidilerinin sulu formülasyona göre UV uygulaması altında çekirge nimflerine karşı daha etkili olduğunu göstermişlerdir. Benzer etkiyi Leemon ve Jonsson (2008), kanola yağında süspanse edilmiş konidiler ile gözlemlemişlerdir.

Edgington vd. (2000), güneş ışığı ya da UV ışığına maruz kalan *B. bassiana* konidilerinin hızlı bir şekilde inaktive olduğunu bulmuştur. Ancak UV koruyucu maddelerin eklenmesiyle bu inaktivasyon azaltılabileceğini vurgulamışlardır.

Leland vd. (2004), *B. bassiana* sporlarını hem suda çözünür hem de çözünmeyen formdaki lignin polimeri ile sprey kurutma tekniği kullanarak kaplamıştır. Bu sporlar

hem suda hemde yağda süspanse edilerek solar radyasyonun spor canlılığına ve *Lygus lineolaris* karşı olan patojenitesine etkileri araştırılmıştır. Kontrol olarak kaplanmamış sporlar kullanılmıştır. Bu çalışmada da elde edilen formülasyon UV ye karşı iyi bir koruma sağlarken, patojeniteyi olumsuz etkilemiştir.

Leland vd. (2005), *B. bassiana* konidilerini spreyci kurutma tekniğini kullanarak lignin polimerine tutuklamış ve 4 ile 48 saat arasındaki UV uygulamalarında konidilerin UV hasarından korunduğunu tespit etmişlerdir. Fakat bu formülasyon fungusun patojenitesinde 10 kat azalmaya sebep olmuştur.

Thompson vd. (2006), farklı UV koruyucu özellikte katkıların *B. bassiana* konidilerinin çimlenmeleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Bu koruyuculardan optik yansıtıcı özelliği gösteren katkı ve magnezyum silikat kil katkısı yağlı formülasyona eklendiği zaman konidi canlılığını önemli bir şekilde arttırmıştır. Kullanılan kil partikülleri güneş ışığını bloklayıcı bir özellik gösterirken, optik yansıtıcı katkı ise UV ışığı soğurucu özellik göstermektedir. Araştırmacılar yağlı formülasyonda bu katkı maddelerinin ilavesi ile konidi canlılığında yaklaşık %10 oranında bir artış gözlemlemişlerdir.

Hedimbi vd. (2008), *M. anisopliae* konidilerini %3 oranında iki ticari güneş koruyucu ilavesi ile hem sulu hem de yağlı formülasyonlar halinde hazırlanmış ve 5 saate kadar yapay UV kaynağına maruz bırakmışlardır. 5 saatin sonunda yağlı formülasyonlarda kontrole göre 10 kat çimlenmede artış gözlemlemişlerdir. Ayrıca yazarlar katkıların konidi canlılığını etkilemediklerini ve konidilerin *Rhipicephalus evertsi* larvalarına karşı patojenitelerini düşürmediğini vurgulamışlardır.

Reddy vd. (2008), *B. bassiana* konidilerinin tinopal sayesinde UV ışınlarından önemli oranda korunabileceğini göstermiştir. Araştırmacılar konidilerin doğal güneş ışığına maruz bırakıldığı durumda tinopal sayesinde LT50 değerinin %26 oranında arttığını ifade etmişlerdir.

Costa vd. (2012), *Clonostachys rosea* üzerinde UV radyasyonun etkisini çalışmışlar ve konidial çimlenmenin UV ışınımı ile ters orantılı olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca araştırmacılar en yüksek çimlenmeyi en düşük UV dozlarında gözlemlemiş ve UV duyarlılığının izolatlar arasında değişim gösterdiğini vurgulamışlardır.

Posadas vd. (2012), *Rhipicephalus microplus*'a karşı virülanslıkları için seçilen 6 *B. bassiana* izolatına ait konidilerin UV-B'ye karşı doğal toleranslarını ve yağ ile diğer katkıların UV koruyucu özelliklerini değerlendirmişlerdir. Sonuçta izolatların doğal toleransları arasında yüksek çeşitliliğe raslamışlardır. Bununla birlikte ayçiçeği, mısır ve soya yağlarının en etkili UV-B koruyucular olduklarını vurgulamışlardır.

Rodrigues vd. (2016), *B. bassiana* ve *M. anisopliae* entomopatojen funguslarının serbest haldeki ve sodyum alginat ile tutuklanmış konidilerinin UV radyasyona dayanımlarını ve *Diatraea saccharalis*'e karşı patojenitlerini araştırmışlardır. Sonuçta serbest haldeki konidilerin çimlenme oranları 5 dakikalık UV uygulaması sonucu, *B. bassiana* için %94'ten %52 ye, *M. anisopliae* için %96'dan %54'e düşmüştür. Tutuklanmış konidilerin UV radyasyona karşı büyük ölçüde korunduğu ve uygulama sonrası canlı kalabildikleri görülmüştür. Ayrıca *B. bassiana*'nın tutuklanmış konidileri *Diatraea saccharalis*'e karşı %79.6 ölüme neden olurken; *M. anisopliae*'nin patojenitesi %10 olarak kaydedilmiştir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan cihazlar

Tez çalışması boyunca kullanılan cihazlar aşağıda Çizelge 3.1’de kullanım amaçları ile birlikte listelenmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırmalar sırasında kullanılan cihazlar

Makine ve Teçhizat	Kullanım Amaçları
PZR Cihazı (QIAGEN)	ITS bölgesinin çoğaltılmasında
Jel Görüntüleme Cihazı (BIO-RAD)	Çoğaltılan bölgenin görüntülenmesinde
Soğutmalı Kuru Blok (BIOER)	DNA izolasyonunda
Yatay Elektroforez Sistemi (BIO-RAD)	Genomik DNA’nın ve PZR ürünlerinin yürütülmesinde
Analitik Terazi (SHIMADZU / ATX-224)	Çözeltilerin hazırlanmasında
İnkübatör (MEMMERT IN55)	Mikroorganizmaların izolasyon ve saflaştırılmasında
Mikrodalga Fırın (ARÇELİK)	Agaroz jelin hazırlanmasında
Rotary evaporatör	Pigment saflaştırma basamaklarında
Çalkalamalı inkübatör (LABART / ZWY-2102C)	Pigment üretimi aşamasında
Soğutmalı Santrifüj (HETTICH / 320R)	Pigment saflaştırma basamaklarında
UV-Visible Spektrofotometre (THERMO)	DNA miktarının ölçümünde
Homojenizatör (QAGEN / TISSUELYSERLT)	DNA izolasyonunda
Mikroskop (CARL ZEİSS)	Fungusların incelenmesi ve spor sayımında
Otoklav (HMC Hirayama Hiclava HV-110, JAPONYA)	Sterilizasyon işlemlerinde
pH metre (OHAUS)	Besiyeri ve diğer çözeltilerin hazırlanmasında
Saf Su Cihazı (NÜVE NS 112)	Besiyeri ve diğer çözeltilerin hazırlanmasında çözücü olarak kullanılacak distile suyun temininde
Mikrobiyolojik Emniyet Kabini (ESCO/AC2-4E1)	Mikrobiyolojik işlemlerin aseptik şartlarda gerçekleştirilebilmesinde

### 3.1.2. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

Tez çalışmasında *Pristiphora abietina* larvalarından izole edilerek kültüre alınmış PAF04 koleksiyon numaralı *B. bassiana* izolatu (GenBank Erişim Num. KT962854.1) kullanılmıştır. Bu izolatu özelliği çeşitli takımlardan zararlılara karşı entomopatojenik etkiye sahip olmalarıdır (Örtücü ve İskender 2017). Ayrıca pigmentin anti bakteriyel etkilerini araştırmak için, iki Gram-pozitif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) ve iki Gram-negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) bakteri ile birlikte antifungal etkisinin araştırılması için ise *Candida albicans* ATCC 90028 suşu kullanılmıştır.

### 3.1.3. Kullanılan besiyerleri ve kimyasallar

Fungusların izolasyon, saflaştırma, teşhis ve yetiştirme işlemleri sırasında kullanılan czapek dox agar, patates dekstrozu agar (PDA), Rose Bengal Kloremfenikol Agar (RBCA), sabouraud-2% dekstrozu agar besiyerleri, dekstrozu, agar ve Tween 80 Merck (Almanya); mineral tuzlar ve moleküler sarf malzeme Sigma (Almanya) firmasından sağlanmıştır. Kullanıma hazır olan dehidre besiyerleri üretici firmanın önerdiği şekilde hazırlanmıştır. Malt yeast extract broth besiyeri (MYEB) ise litrede 10 gr glikoz, 5 gr pepton, 3 gr yeast extract ve 3 gr malt extract saf suda çözülmüş ve pH'sı 6.2'ye ayarlandıktan sonra otoklavda steril edilerek hazırlanmıştır.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Pigment üreten fungusların izolasyonları ve pigment ekstraksiyonu

Örnekleme bölgesi olarak hem güneş alma saati açısından hem de rakım olarak Türkiye ortalamasının üzerinde olmasından dolayı Erzurum ili seçilmiştir. Bu iki parametre pigment üreten ve UV ışınlarına dayanıklı olan organizmaların izolasyonu için önemlidir (Pagano ve Dhar 2015). Bu nedenle Erzurum Merkez'de 1800 metre ve üzeri rakıma sahip bölgelerden yüzey toprakları alınarak, steril polietilen torbalara konuldu. Ardından laboratuvara getirilen toprak örneklerinden hazırlanan dilisyonlar bakterilerin



gelişimini inhibe eden ve fungusların gelişimini sınırlayarak saflaştırılmalarını kolaylaştıran RBCA ve PDA'ya yayma plak yöntemi ile ekildi. Petriler 10 gün süre ile incelenerek, pigment oluşturduğu gözlenen filamentöz fungus ve mayalar arka arkaya yapılan pasajlar sonucu saflaştırıldı.

İzole edilerek saflaştırılan pigment üretici funguslardan pigment ekstraksiyonu Peterson vd. (1954) tarif ettiği metot modifiye edilerek gerçekleştirildi. Kısaca, elde edilen izolatlar 100 ml MYEB (Yadav ve Prabha 2014) besi ortamında 3 ila 7 gün süre boyunca inkübe edildi. Ardından kültür santrifüj edilerek süpernatant atıldı, pelet homojenizatörde 30 dakika boyunca muamele edilip, hücrelerin parçalanarak pigmentin açığa çıkması sağlandı. Elde edilen hücre homojenizatının üzerine 20 ml aseton eklenerek vortekslendi ve tekrar santrifüj edildi. Aseton fraksiyonu ayırma hunisine aktarıldı ve üzerine tekrar 20 ml aseton eklenerek çalkalandı. Ardından 25 ml petrol eteri ilave edilerek karıştırıldı ve üzerine 25 ml su eklendi. Bir süre çalkalandıktan sonra, petrol eterini içeren üst faz yeni bir tüpe alındı ve rotary evaporatörde 50°C petrol eteri uçuruldu ve elde edilen pigmentler DMSO'da çözüldü.

### **3.2.2. Elde edilen pigmentin UV-görünür bölge absorpsiyon ve TLC analizi**

Pigmentin fizikokimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla UV-görünür bölge absorpsiyon analizi gerçekleştirildi. Pigmentin (40 mg/ml, DMSO içerisinde çözüldürülmüş) UV-görünür bölge absorpsiyon analizi 400-700 nm dalga boyu aralığında UV-Visible Spektrofotometre (Thermo) cihazı kullanılarak yapıldı. Ayrıca ekstrakte edilen pigmentin saflığı ince tabaka kromatografisinde (TLC) doğrulandı. Bu amaçla, sabit faz olarak silika jel yüklü tabakalar (Merck, Almanya); hareketli faz olarak da heksan/etil asetat (95:5 v/v) kullanıldı. Pigment örneği 4×7 cm olacak şekilde hazırlanmış silika jel yüklü plakalarının üzerine otomatik pipet ile (1 µl) damlatıldı. Örnek kurduktan sonra kapalı bir kapta bulunan hareketli fazı içeren çözücü içerisine konuldu ve çözücünün sabit faz üzerinde yürütülmesi sağlandı. Ardından iyodin buharına maruz bırakılan TLC plakalar üzerinde bulunan spotlar görüntülendi.

### 3.2.3. Spor süspansiyonun hazırlanması

Çalışmada kullanılacak *B. bassiana* izolatları, %2 maya ekstraktı eklenmiş SDA içeren 9 cm çapındaki petrilere ekilerek, 25 °C’de iki hafta inkübasyondan sonra petrilere % 0.02 Tween 80’le hazırlanmış steril sudan 5 ml ilave edilip, steril öze ile dikkatli bir şekilde kazınarak sporlar hasat edildi. Daha sonra buradan alınan süspansiyon 4 katlı gazlı bezden süzülüp, hif parçalarından arındırılarak spor süspansiyonu elde edildi. Süspansiyonun spor sayısı Neubauer Hemositometrede sayılıp, gerekli seyreltmeler yapılarak, mililitrede  $1 \times 10^7$  spor olacak şekilde süspansiyonlar hazırlandı (Eken ve Hayat 2009). Hazırlanan süspansiyonlar aynı gün içerisinde kullanılmaya kadar +4°C de saklandı (Safavi vd. 2010).

### 3.2.4. Spor çimlenmesinin belirlenmesi

Hazırlanan spor süspansiyonlarından 0.1 ml alınarak SDA besiyeri üzerine Dirigalski özesi yardımıyla yayıldı ve 24 saat 25°C’de inkübasyona bırakıldı. Ardından mikroskop altında 400X büyütmede üç farklı mikroskop alanında sayım yapıldı. Spor boyu kadar çimlenme tüpü oluşturan sporlar çimlenmiş kabul edildi (Safavi vd. 2010). Çimlenme yüzdesi aşağıda verilen formüle göre hesaplandı (Lomer vd. 1998).

$$\% \text{ çimlenme} = [a/(a+b)] \times 100$$

a; çimlenen spor sayısı

b; çimlenmeyen spor sayısı

### 3.2.5. UV radyasyonuna dayanıklılıklarının belirlenmesi

*B. bassiana* izolatlarının  $1 \times 10^7$  spor/ml konsantrasyonda hazırlanan spor süspansiyonlarından 1 ml alınarak 24 kuyucuklu eliza plaklarına aktarıldı, üzerine ml’de 0,5 mg, 1 mg ve 2,5 mg olacak şekilde pigment eklendi. Plakların kapakları açılarak UV lambası altında (Philips 35 W) 30 cm mesafeden 15, 30 ve 60 dakika boyunca UV’ye maruz bırakıldı. Kontrol grubu alüminyum folyo ile kaplanarak UV’den korundu. Uygulamadan sonra petri kutuları 25°C’de 24 saat boyunca karanlıkta inkübasyona

birakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda her bir kuyucuktan alınan süspansiyonlar lam üzerine yayılarak mikroskop altında incelendi. Çimlenen ve çimlenmeyen sporlar sayılarak canlılık oranı Lee vd. (2006)'ya göre aşağıda verilen formülle hesaplandı.

$$\% \text{ Canlılık oranı} = (St / Sc) \times 100$$

Sc; UV uygulanmayan kontrol grubundaki çimlenen spor sayısının ortalaması

St; UV uygulanan deney grubunda çimlenen spor sayısının ortalaması

### **3.2.6. Pigmentin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi**

UV koruyucu özelliği belirlenen pigmentin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi için disk difüzyon metodu kullanıldı (Bauer vd. 1966). Bu amaçla tıbbi ve farmakolojik önemleri dikkate alınarak iki Gram-pozitif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), iki Gram-negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) bakteri suşu ile *Candida albicans* ATCC 90028 seçildi. Bakteriyel ve fungal stok kültürler sırasıyla Mueller-Hinton Agar (MHA) ve Sabouraud %2 Dextrose Agar (SDA) besi yerlerinde 37°C'de bir gece inkübe edildi. Elde edilen pigment 0,5 mg, 1 mg ve 2,5 mg olacak şekilde dimetil sülfoksit (DMSO) de çözüldü ve şırınga ucu filtreden geçirilerek steril edildi. Bu solüsyonlar steril boş disklere emdirildikten sonra kurumaya bırakıldı. Negatif kontrol olarak DMSO, pozitif kontrol olarak ampisilin antibiyotiği disklere emdirildi. Ardından diskler daha önceden test organizmalarının yayma ekimlerinin yapıldığı petrilere yerleştirilerek inkübasyona bırakıldı. Bakteriler için 24 saat, fungus için 48 saat sonra disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonları milimetre cinsinden ölçülerek kaydedildi.

### **3.2.7. Pigmentin *B. bassiana*'nın miselyal gelişimine ve spor çimlenmesine etkisi**

UV koruyucu etkisi olan pigmentin ticari formülasyonlarda kullanılabilmesi için *B. bassiana*'nın miselyal gelişimine ve spor çimlenmesine negatif etkisinin bulunmaması gerekmektedir. Bu amaçla UV uygulamasında kullanılan miktarlarda 0,5 mg, 1 mg ve 2,5 mg pigment DMSO da çözülerek PDA besi ortamı üzerine yayılarak

steril kabin içerisinde kuruyana kadar bekletildi. Ardından *B. bassiana* izolatlarının iki haftalık kültürlerinden mantar delici iğne ile alınan 6 mm çapındaki disk üst yüzeyi besi ortamına gelecek şekilde pigment ilave edilen petrilere yerleştirildi. Petriler 25°C’de bir hafta inkübasyona bırakıldıktan sonra koloni çapları milimetre cinsinden ölçülerek, miselyal gelişime etki yüzde inhibisyon olarak aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

$$(R2-R1)/R2 \times 100 \text{ (Royse ve Ries, 1978),}$$

Burada R1: *B. bassiana*’nın, pigment uygulaması yapılan petride gösterdiği maksimum büyümenin yarıçapının milimetre cinsinden ölçümü, R2 ise pigment içermeyen ortamda, maksimum R1 değerinin ölçüldüğü andaki gelişimidir.

Pigmentin spor çimlenmesine olan etkilerini araştırmak için ise yine 0,5 mg, 1 mg ve 2,5 mg pigment DMSO da çözülerek PDA besi ortamı üzerine yayılarak steril kabin içerisinde kuruyana kadar bekletildi. Spor süspansiyonlarından 0.1 ml alınarak bu besiyeri üzerine Dirigalski özesi yardımıyla yayıldı ve 24 saat 25°C’de inkübasyona bırakıldı. Ardından mikroskop altında 400X büyütmede üç farklı mikroskop alanında sayım yapıldı. Hesaplamalar 3.2.3. spor çimlenmesinin belirlenmesi başlığı altında bahsedildiği şekilde yapıldı.

### **3.2.8. Pigmentin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi**

Toplam antioksidan kapasitesi (TAS) ticari olarak bulunan kit (Rel Assay Diagnostics®) ile belirlendi. Bu deney kısaca şu şekilde yapıldı. 30 µl pigment örneği 48 kuyulu plak üzerine alındı. 48’lik wellplate’in her kuyucuğuna 500 µl reagent 1 solüsyonundan (Assay Buffer) ilave edilerek 660 nm’de ilk absorbansı okundu. Daha sonra aynı kuyucuklara 75 µl reagent 2 (Prochromogen solution) solüsyonu eklendi. 5 dakika 37°C’deki inkübasyonun ardından 660 nm de ikinci kez ölçüm değeri alındı. Aynı işlemler standart (1 mmol/L) ve su için de yapılarak sonuçlar hesaplandı.

Hesaplama;

A1= Birinci Absorbans değeri

A2= İkinci absorbans değeri

$$A2-A1 = \Delta Abs$$

$$\text{Sonuçlar} = [(\Delta Abs \text{ H}_2\text{O}) - (\Delta Abs \text{ Örnek})] / [(\Delta Abs \text{ H}_2\text{O}) - (\Delta Abs \text{ Standart})]$$

### 3.2.9. Pigment üreten fungusun moleküler karakterizasyonu

UV koruyucu etkisi belirlenen ve *B. bassiana* izolatlarının gelişimini inhibisyona uğratmayan pigment üretici mayaların moleküler karakterizasyonu 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S bölgesi hedeflenerek gerçekleştirildi. Pigment üretici mayalar, 50 ml patates dextrose broth (PDB) besiyerinde 25°C de, 100 rpm de, 48 saat geliştirildi. İnkübasyon süresinin sonunda elde edilen yaklaşık 200 mg taze biyokütle, homojenizasyona tabi tutulduktan sonra UltraClean® Microbial DNA İsolation Kiti ile firma tarafından sağlanan protokole göre DNA ekstraksiyonu yapıldı. İzole edilen DNA'lar bütünlüğü ve saflığı açısından %0,8'lik agaroz jelde 75 V'da 60 dakika boyunca yürütülerek değerlendirildi.

Ardından mikrofungusların moleküler tanılamasında yaygın olarak kullanılan ITS1-5.8s-ITS2 ribozomal DNA bölgesini hedef alan ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG 3') ve ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White vd. 1990) primerleri kullanılarak çoğaltım yapıldı. Bu amaçla, ITS bölgesinin amplifikasyonu için, her iki primerden 2 µl, 5 µl 10x Taq buffer ve 2.5 U (0.5 µl) Taq DNA polimeraz, 2 µl dNTP, 3 µl magnezyum klorür, 4.5 µl kalıp DNA ve 31 µl steril dH<sub>2</sub>O ile son hacim 50 µl olacak şekilde tamamlandı. PCR döngüsü; başlangıç denatürasyonu için 95°C'de 2 dakika, denatürasyon için 94°C'de 1 dakika, bağlanma safhası için 55°C'de 2 dk, uzama için 72°C de 3 dakika 35 döngü olarak ve son uzama ise 72°C'de 10 dakika olarak programlandı.

PCR ürünleri %1 lik agaroz jelde, 1X TAE tamponu içinde DNA markırı ile 80 V'da 50 dakika boyunca yürütülerek değerlendirildikten sonra PureLink™ Quick PCR purification kit ile saflaştırılarak ticari bir firma (Thermo Fisher Scientific) aracılığıyla her iki primer ile DNA dizi analizi yaptırıldı. Elde edilen sekans verileri BioEdit programı ile birleştirildikten sonra BLASTN 2.2.26+ programı kullanılarak,

GenBank'ta ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (Zhang vd. 2000) olan türlerle karşılaştırılarak ve sekans verilerinin girişi gerekleştrildi.

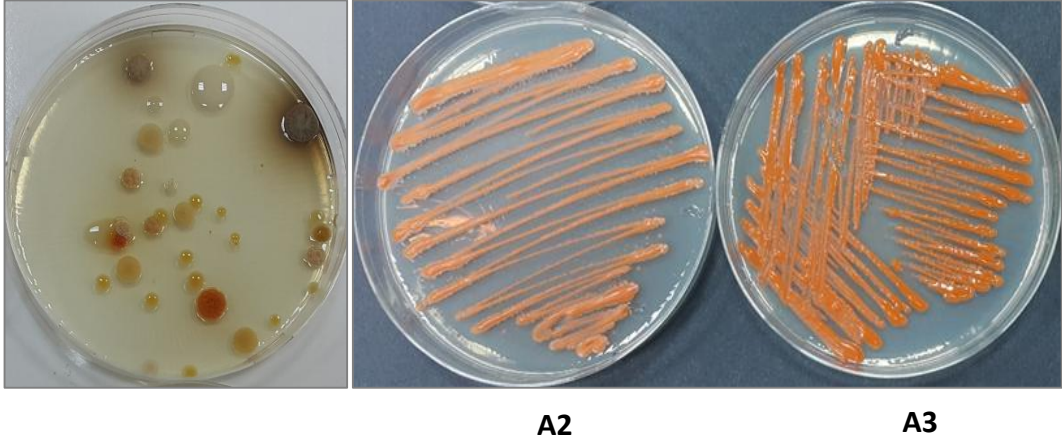
### **3.2.10. İstatistiksel analiz**

Tez çalışmasında yapılan bütün deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Elde edilen verilerin istatistiksel olarak önemli olup olmadıkları, SPSS 15 paket programı kullanılarak, 0.05 önem seviyesinde One Way ANOVA testi ile belirlendi.

## 4. ARASTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

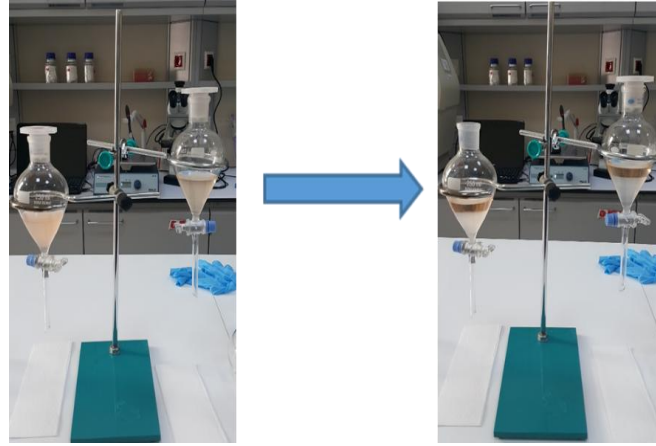
### 4.1. Pigment Üreten Fungusların İzolasyonları ve Pigment Ekstraksiyonu

Tez çalışması kapsamında Erzurum Merkez’de 1800 metre ve üzeri rakıma sahip 20 adet noktadan yüzey toprakları alınarak, steril polietilen torbalara konuldu. Ardından laboratuvara getirilen toprak örneklerinden hazırlanan dilisyonlar bakterilerin gelişimini inhibe eden ve fungusların gelişimini sınırlayarak saflaştırılmalarını kolaylaştıran RBCA ve PDA besiyerlerine yayma plak yöntemi ile ekildi. Petriler 10 gün süre ile incelendi ve pigment ürettiği gözlenen koloniler saflaştırıldı. İzolasyonlar sonunda 2 filamentöz fungus ile 6 maya örneği saflaştırıldı. Elde edilen bu 8 izolat bir sonraki denemeye alınmadan önce organik pigmentlerin ekstraksiyonunda yaygın kullanılan etil asetat, 0,1 N HCl, 0,1 N HCl:Aseton (1:1), Aseton (% 99’luk), petrol eteri ve DMSO ile muamele edilerek, pigmentin saflaştırılabilirliği değerlendirildi. Bu aşamada A2 ve A3 kodlu maya izolatlarının basit ve ekonomik bir şekilde pigmentlerini çözücüye aktardığı görüldüğü için çalışmanın bir sonraki basamakları bu izolatlarla yürütüldü.



Şekil 4.1. İzolasyon petri görüntüsü ve izole edilen maya örnekleri

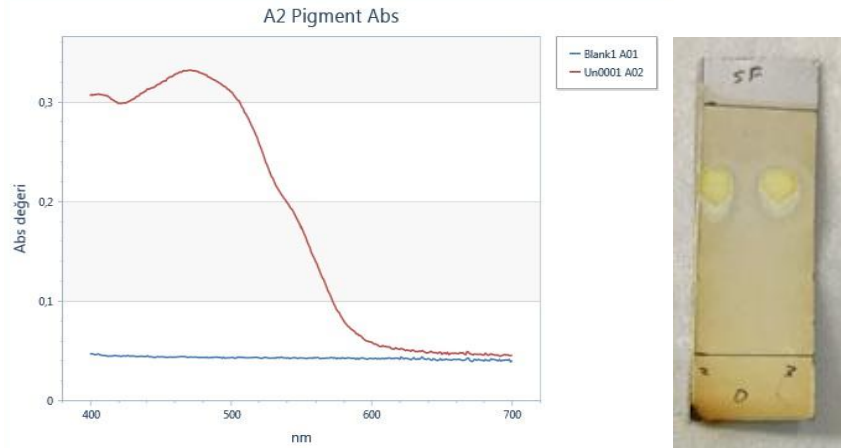
A2 ve A3 kodlu maya izolatlarında pigment ekstraksiyonu Peterson vd. (1954), tarif ettiği metot modifiye edilerek gerçekleştirildi. Elde edilen pigmentler rotary evaporatörde 50°C’de yoğunlaştırıldı ve DMSO’da çözüldü. Hazırlanan pigment solüsyonu +4°C’de buzdolabında renkli bir şişede saklandı.



Şekil 4.2. Pigment ekstraksiyon deneylerinin gösterimi

#### 4.2. UV-görünür bölge absorpsiyon ve TLC analizinin değerlendirilmesi

Mevcut tez çalışmasında, saflaştırılan pigmentlerin fizikokimyasal karakterizasyonu için UV-görünür bölge absorpsiyon analizi ile ince tabaka kromatografi (TLC) analizi yapılmış ve analiz sonuçları Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. A2 pigmentine ait UV absorpsiyon spektrumu ve TLC görüntüsü

Şekil 4.3'deki UV-vis absorpsiyon analizi, izole edilen A2 pigmentini 471 nm dalga boyunda karakteristik bir absorpsiyon pikine sahip olduğunu göstermektedir. TLC görüntüsüne bakıldığında ise, UV absorpsiyon analizini destekler nitelikte her iki pigmentin de tek spot oluşturduğu görülmektedir. Elde edilen verilere göre



ekstraksiyonu yapılan pigmentlerin saf olduğu kanısına varılmıştır. Ayrıca hem pigmentlerin gösterdiği dalga boyu pikleri hemde TLC’de belirlenen Rf değeri dikkate alındığında literatürdeki  $\beta$ -karotenlere (Davoli ve Weber 2002) ait verilerle uyum göstermektedir.

#### **4.3. Spor Çimlenmesinin Değerlendirilmesi**

Deneylerden önce uygulanacak spor süspansiyonunun %95 ve üzeri çimlenme oranına sahip olması beklenir. Daha düşük değerler söz konusu olduğunda, elde edilen veriler, uygulanan konsantrasyonları temsil etmez. Bu nedenle uygulamalar sırasında kullanılan spor süspansiyonlarının çimlenme yetenekleri araştırılmış ve hazırlanan bütün spor süspansiyonlarının %95 ve üzeri çimlenme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir.

#### **4.4. UV Radyasyonuna Dayanıklılıklarının Değerlendirilmesi**

UV radyasyon uygulaması için Şekil 4.4’de verilen deney düzeneği hazırlandı. Deneyler sırasında kabin içerisindeki sıcaklık  $24\pm 1^\circ\text{C}$  olarak ölçüldü.



Şekil 4.4. Steril kabin içerisinde UV radyasyonuna maruz bırakılan sporlar

Spor süspansiyonu uygulanan eliza plakaları 15, 30 ve 60 dakika arasında değişen sürelerde UV radyasyonuna maruz bırakıldıktan 24 saat sonra yapılan sayım sonucu elde edilen veriler, Lee vd. (2006) tarafından teklif edilen formüle göre hesaplanarak Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. UV uygulamasından sonra sporların canlılık oranı (%)\*

<i>PaF04</i>		<i>0 dakika</i>	<i>15 dakika</i>	<i>30 dakika</i>	<i>60 dakika</i>
<i>kontrol (0 mg/ml)</i>		77,41±2 <sup>cA</sup>	40,47±3,15 <sup>cB</sup>	39,58±1,5 <sup>bB</sup>	41,12±1,9 <sup>bB</sup>
A2	0,5 mg/ml	100 <sup>aA</sup>	100 <sup>aA</sup>	99,16±0,5 <sup>aA</sup>	86,13±2 <sup>aB</sup>
	1 mg/ml	96,15±2 <sup>aA</sup>	100 <sup>aA</sup>	98,25±1 <sup>aA</sup>	88,15±3,48 <sup>aB</sup>
	2,5 mg /ml	97,39±2,5 <sup>aA</sup>	93,82±2,31 <sup>bA</sup>	95,13±5,5 <sup>aA</sup>	82,2±4,45 <sup>aB</sup>
A3	0,5 mg/ml	83,51±10,2 <sup>bA</sup>	14,28±8,36 <sup>dB</sup>	15,12±0,5 <sup>cB</sup>	-
	1 mg/ml	82,5±4,12 <sup>bA</sup>	19,38±3,15 <sup>dB</sup>	-	-
	2,5 mg /ml	88,07±3,6 <sup>bA</sup>	20,77±5,23 <sup>dB</sup>	-	-

\*Aynı sütunda ve aynı satırda aynı küçük harfler ve aynı büyük harfler ile gösterilen değerler arasındaki fark, istatistiksel olarak önemli değildir (p≤0,05).

Alan uygulamaları sırasında fungus sporları çeşitli bitki parçaları veya toprakta doğrudan güneş ışığına maruz kalabilmektedir (Braga vd. 2001). Güneşten gelen UV radyasyon ise, sporların canlılıklarını kaybetmesine ya da çimlenme süresinin uzmasına neden olur (Fernandes vd. 2007). Güçlü güneş ışınlarına maruz kalınan durumlarda gerçekleşen spor canlılığının azalışı, biyoinsektisit olarak kullanılan bu organizmaların verimliliğini azaltır (Braga vd. 2002). Çizelge 4.1. incelendiğinde, PaF04 izolata ait kontrol grubundaki konidilerin maruz kaldıkları UV radyasyon süresi ile orantılı olarak canlılığının azaldığı görülmektedir. Kontrol grubunda pigment ilavesiz çimlenme oranı, radyasyon uygulaması olmadan (0 dakika) %77,41 olarak kaydedilmiştir. Elde edilen bu çimlenme oranı SDA besiyerinde elde edilen %95 ve üzeri değerlerden oldukça düşüktür. Bu azalış çimlenme ölçümlerinin alındığı deneylerin farklılığından kaynaklanmaktadır. %95 ve üzeri değerler SDA besiyeri üzerinde uygun havalandırmanın mümkün olduğu şartlarda elde edilirken, %77,41 değeri ise eliza plakalarında tween 80 ilave edilmiş steril fizyolojik su içerisinde elde edilmiştir. Bu

nedene verilerdeki azalış deneysel farklılıklardan ötürü normal karşılanmıştır. Bununla birlikte aynı şartlarda pigment ilave edilerek gerçekleştirilen (0 dakika) deneylerin tümünde çimlenme oranları %82,5 ile %100 arasında değişerek pigment uygulanmayan kontrol grubundan yüksek ve istatistiki açıdan önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Bu durum UV uygulamasından bağımsız bir şekilde pigmentin sulu süspansiyonlarda çimlenmeyi teşvik ettiğini göstermektedir. Pigment ilavesiz kontrol grubunun 15, 30 ve 60 dakika UV uygulaması sonuçları ise 0 dakikaya göre dramatik bir biçimde azalarak %39,58 - %41,12 oranlarına kadar düşmüştür. İlginç bir şekilde bu üç farklı UV uygulamasına ait sonuçlar kendi aralarında değerlendirildiklerinde istatistiki açıdan fark yoktur ( $p<0.05$ ). Rodrigues vd. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada ise, *B. bassiana* konidilerinin çimlenme oranı 5 dakikalık UV uygulaması sonucu, %94'ten %52'ye düşmüştür. Bilindiği üzere radyasyon toleransı hasarı önleyen, azaltan ya da onaran savunma mekanizmalarını içeren karışık bir mekanizmadır (Chelico vd. 2006) ayrıca türlere göre de değişiklik göstermektedir (Fargues vd. 1996; Costa vd. 2012).

A2 ve A3 izolatlarına ait pigmentlerin tüm uygulamalarda UV radyasyon uygulaması sonucu, sporların canlılık oranları arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir ( $p<0.05$ ). Pigmentler kendi aralarında karşılaştırıldığında ise, 15 dakika UV radyasyonuna maruz bırakılan 0,5 mg/ml konsantrasyonda A2 kodlu izolata ait pigmentin eklendiği spor süspansiyonu 24 saat sonra %100 çimlenme oranına sahipken, aynı konsantrasyonda A3 izolatına ait pigmentin eklendiği süspansiyon ise %14,28 çimlenme oranı göstermiştir. Aradaki bu farklılık, biyolojik mücadelede kullanılabilir potansiyele sahip fungusların UV toleranslarının arttırılmasında katkı maddelerinin ne derece önemli olabildiğini gözler önüne sermektedir.

Ayrıca A3 kodlu izolata ait pigment uygulamasının sonuçlarına göre özellikle 60 dakika UV uygulaması sonucu *B. bassiana* sporlarının tamamen inhibe olduğu görülmektedir. Bu durum muhtemelen bu izolata ait pigmentin zamanla ya da UV etkisiyle etkinliğini yitirdiğini göstermektedir.

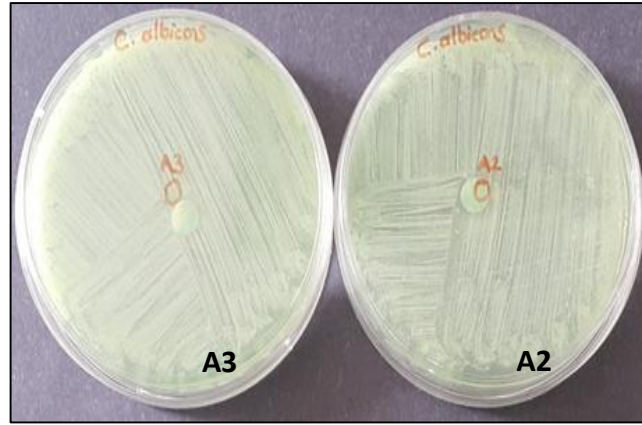
A2 kodlu izolata ait pigmentin ilavesi ile en iyi sonuçlar elde edilmiştir. PaF04 kodlu *B. bassiana* izolatı 30 dakika UV muamelesi sonucunda konidi çimlenme oranı

%39.58'e düşerken; 0,5 mg/ml konsantrasyonunda A2 pigment ilavesi ile bu oran %99.16 olarak kaydedilmiştir. Çimlenme yüzdesindeki bu ~2,5 kat artış biyolojik mücadele ajanlarının alan uygulamalarında en büyük sorunu teşkil eden UV inhibisyonunun iyileştirilmesinde çok umut verici sonuçlar ortaya koymaktadır. Bu nedenle çalışmaların sonraki basamaklarında A2 kodlu pigment ve bu pigmenti üreten maya izolatu ile devam edilmiştir.

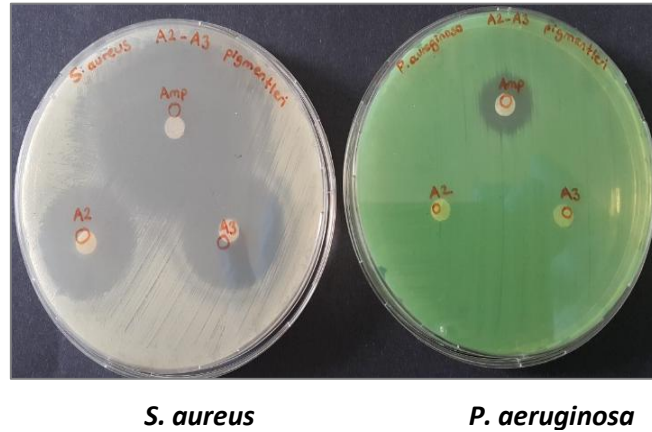
Bir çok araştırmacı entomopatojenlerin doğal şartlardaki kalıcılığını sağlamak ve hedef zararlılara karşı etkinliğini arttırmak için biyopreparatların formülasyonlarına UV koruyucuların eklenmesi önermektedir (Fargues vd. 1996; Edgington vd. 2000; Reddy vd. 2008; Posadas vd. 2012). Bu doğrultuda UV'ye dayanıklılığın artırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda, Inglis vd. (1995a), tinopal gibi su ile uyumlu optik yansıtıcının ve kil ilavesi ile *B. bassiana* konidilerinin doğal koşullardaki kalıcılığını %25 ila %37 oranlarında arttırmıştır. Reddy vd. (2008), *B. bassiana* konidilerinin tinopal sayesinde konidilerin doğal güneş ışığına maruz bırakıldığı durumda LT50 değerinin %26 oranında arttığını ifade etmişlerdir. Thompson vd. (2006) ise, optik yansıtıcı özelliği gösteren katkı ve magnezyum silikat kil katkısı yağlı formülasyona eklendiği zaman *B. bassiana* konidi canlılığında yaklaşık %10 oranında bir artış gözlemlemişlerdir. Sunulan bu tez çalışmasında ise özellikle 30 dakikalık UV uygulaması sonucu A2 kodlu pigmentin ilavesi ile spor çimlenmesi yaklaşık %60 (~2,5 kat ) arttırılmıştır. Yukarıda verilen çalışmalar ile sunulan tez çalışması arasındaki temel farklılıklar laboratuvarda gerçekleştirilen UV uygulaması ile güneş ışınlarına maruz bırakılma ve UV koruyucunun yapısı ya da menşeidir. Bilindiği gibi güneş ışınları UV-A, UV-B ve UV-C bileşenlerini içerir. UV-A ışınları (320–400 nm) güneşten gelen toplam UV ışınlarının yaklaşık %95'ini oluşturur ve konidi ölümleri ile çimlenmenin gecikmesinden sorumludur (Braga vd. 2001a). Tez çalışmasında uygulanan UV kaynağı lamba 254 nm (UV-C) dalga boyunda ışın yapmaktadır. Bu yönüyle elde edilen %60'lık koruyuculuk, doğal şartlarda ya da solar simülatörle yapılacak deneylerde muhtemelen düşüş gösterecektir. Fakat ikinci temel farklılık olan UV koruyucunun menşei konusunda, kimyasal kullanılan diğer çalışmalara göre organik tabanlı bir koruyucu kullanılması açısından bu çalışma üstünlük göstermektedir.

#### 4.5. Pigmentin Antimikrobiyal Aktivitesinin Değerlendirilmesi

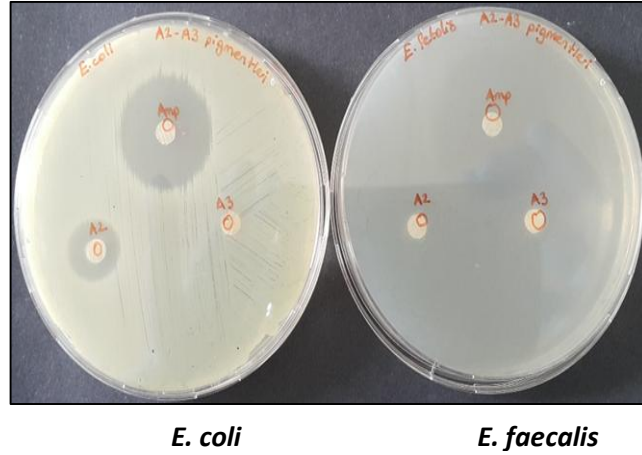
Biyolojik mücadelede kullanılan bazı organizmaların ürettiği pigmentler gösterdikleri antimikrobiyal etkilerle hedef zararlının intestinal florasını baskılayabilir. Bu baskılama entomopatojen tarafından enfekte edilen zararlıya karşı ikinci bir stres faktörü oluşturup, ölümü hızlandırır (Amin vd. 2010). Bu nedenle UV koruyucu olarak kullanılması önerilen A2 kodlu izolata ait pigmentin patojeniteye destek olabilecek antimikrobiyal özellikleri de araştırıldı.



Şekil 4.5. Pigmentlerin *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal aktivite testi



Şekil 4.6. Pigmentlerin *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'a karşı antimikrobiyal aktivite testi



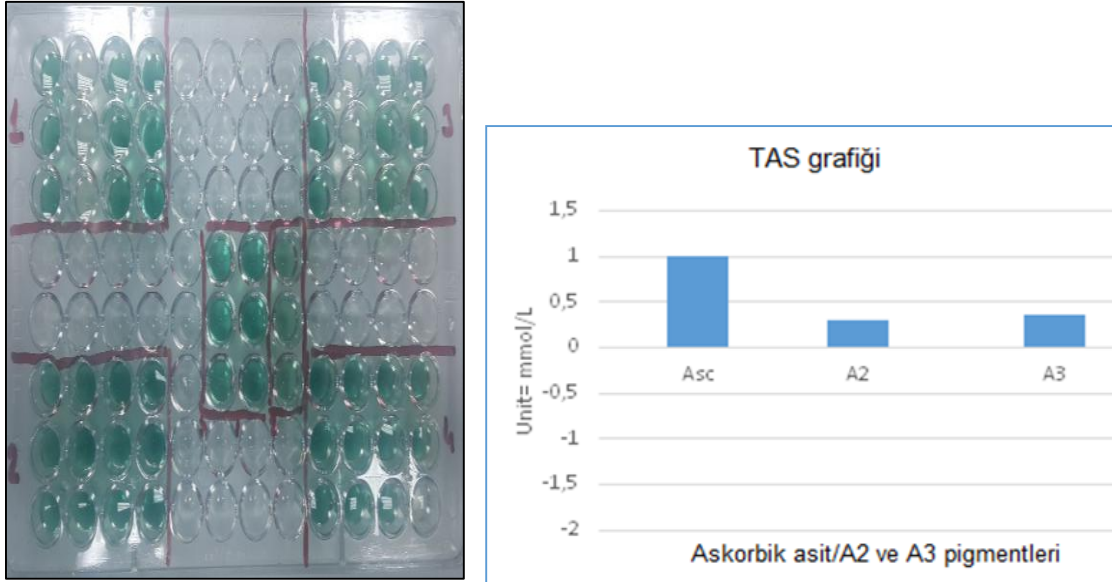
Şekil 4.7. Pigmentlerin *E. coli* ve *E. faecalis*'e karşı antimikrobiyal aktivite testi

A2 kodlu izolata ait pigmentin disk difüzyon metodu ile belirlenen aktivite sonuçlarına göre, pigment *C. albicans*'a karşı anti fungal özellik göstermedi. Bunun yanında gram pozitif *E. faecalis* ve gram negatif *P. aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel özellik göstermezken; gram pozitif *S. aureus* ve gram negatif *E. coli*'ye karşı antibakteriyel özellik gösterdi. Bakteriler için 24 saat sonra ölçülen inhibisyon zonları dikkate alındığında pozitif kontrol olarak kullanılan ampisilin 26 mm zon oluştururken A2'ye ait pigment *E. coli*'ye karşı 14 mm zon oluşturdu. Diğer taraftan *S. aureus*'a karşı ampisilin 55 mm zon oluştururken, A2'ye ait pigment 28 mm zon oluşumuna neden oldu. Mikrobiyal pigmentlerin bir çoğunun anti-UV özelliğinin yanında anti-kanser, anti-oksidan ve anti-mikrobiyal özelliğe de sahip olduğu bilinmektedir (Venil ve Lakshmanaperumalsamy, 2009). Stankovic vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada *Streptomyces* cinsine ait bakterilerden elde edilen kırmızı karotenin UV-koruyucu özelliğinin yanında antibakteriyel özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Pigmentin sahip olduğu bu özellik entomopatojenin öldürme hızını (Amin vd. 2010) arttırarak, biyolojik mücadele ajanına ek özellikler katar.

#### 4.6. Pigmentin Antioksidan Kapasitesinin Değerlendirilmesi

Toplam antioksidan kapasitesi ticari olarak bulunan Rel Assay Diagnostics® kiti ile belirlendi. Şekil 4.8 incelendiğinde, pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asite kıyasla A2 pigmentinin görece az olmakla birlikte antioksidan etkisinde olduğu

gözlemlendi. Abiyotik faktörler arasında güneşten gelen radyasyon reaktif oksijen türlerinin üretilmesine neden olur (Griffiths vd. 1998). Bu süreç sonunda oluşan reaktif oksijen türevleri biyolojik moleküllere zarar vererek onların fonksiyonlarını zayıflatır. Antioksidanlar ise bu reaktif oksijen türlerini süpürerek UV kaynaklı hasarın önüne geçebilir. Bir çalışmada melanin pigmentinin UV ışık, iyonize radyasyon ve oksitleyici ajanlarla baş edebilmesinde yardımcı olduğu bildirilmiştir (Kunwar vd. 2012). Bu durumda anti-UV aktivite ve antioksidan özellik arasında bir bağlantı kurulabilir. Nitekim yapılan çalışmalarda Astaxanthin (Reyes vd. 1996; Ramirez vd. 2000; Flores Cotera ve Sanchez 2001) ve Undecylprodigosin (Stankovic vd. 2012) pigmentlerinin de anti-UV aktivitelerinin yanı sıra antioksidant aktivite gösterdikleri belirlenmiştir.



Şekil 4.8. Pigmentlerin ve askorbik asitin antioksidan aktivite testi ve sonuçları

#### 4.7. Pigmentin *B. bassiana*'nın Miselyal Gelişimine ve Spor Çimlenmesine Etkisinin Değerlendirilmesi

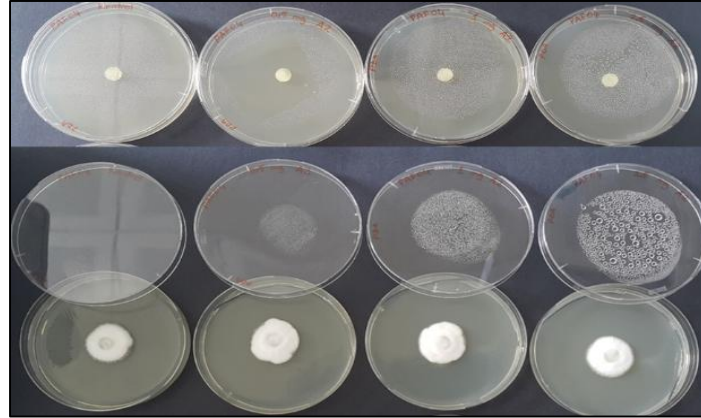
UV koruyucu etkisi olan pigmentin ticari formülasyonlarda kullanılabilmesi için *B. bassiana*'nın miselyal gelişimine ve spor çimlenmesine negatif etkisinin bulunmaması gerekmektedir. Bu amaçla 0,5 mg, 1 mg ve 2,5 mg pigment DMSO da çözülerek PDA besi ortamı üzerine yayılarak steril kabin içerisinde kuruması beklendi. Ardından *B. bassiana* izolatlarının iki haftalık kültürlerinden mantar delici iğne ile

alınan 6 mm çapındaki disk üst yüzeyi besi ortamına gelecek şekilde pigment ilave edilen petrilere yerleştirildi. Petriler 25°C’de bir hafta inkübasyona bırakıldıktan sonra koloni çapları milimetre cinsinden ölçülerek, miselyal gelişimine etkisi yüzde inhibisyon olarak hesaplandı.

Çizelge 4.2. Pigmentin farklı konsantrasyonlarının *B.bassiana*’nın miselyal gelişimine etkisi \*

	PaF04		
	Yarı çap (mm)	% inhibisyon	% çimlenme
<b>0 mg (kontrol)</b>	15a	0a	100
<b>0,5 mg</b>	15a	0a	100
<b>1 mg</b>	14a	6,66b	100
<b>2,5 mg</b>	14a	6,66b	100

\*Aynı sütunda aynı harfler ile gösterilen değerler arasındaki fark, istatistiksel olarak önemli değildir ( $p \leq 0,05$ ).



Şekil 4.9. Pigmentin farklı konsantrasyonlarının *B.bassiana*’nın miselyal gelişimine etkisi

Elde edilen verilere göre 0,5 mg/ml pigment uygulaması miselyal gelişimin inhibisyonuna neden olmadı, fakat 1 mg/ml ve 2,5 mg/ml pigment uygulamaları ise %6,66 oranında miselyal gelişimi inhibe etti. UV uygulamaları da dikkate alındığında ticari formülasyonlarda 0,5 mg/ml pigment uygulaması anlamlı bulundu.

Pigmentin spor çimlenmesine olan etkilerini araştırmak için ise yine 0,5 mg, 1 mg ve 2,5 mg pigment DMSO da çözülerek PDA besi ortamı üzerine yayılarak steril kabin



içerisinde kuruyana kadar bekletildi. Spor süspansiyonlarından 0.1 ml alınarak bu besiyeri üzerine Dirigalski özesi yardımıyla yayıldı ve 24 saat 25°C'de inkübasyona bırakıldı. Ardından mikroskop altında 400X büyütmede üç farklı mikroskop alanında sayım yapıldı. Spor çimlenme etkisi yüzde inhibisyon olarak hesaplandı.

Çizelge 4.3. Pigmentin farklı konsantrasyonlarının *B.bassiana*'nın spor çimlenmesine etkisi \*

	<b>PaF04</b>	
	<b>Sporların çimlenmesi (%)</b>	<b>% inhibisyon</b>
<b>0 mg (kontrol)</b>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
<b>0,5 mg</b>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
<b>1 mg</b>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
<b>2,5 mg</b>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>

\* Aynı sütunda aynı harfler ile gösterilen değerler arasındaki fark, istatistiksel olarak önemli değildir (p≤0,05).

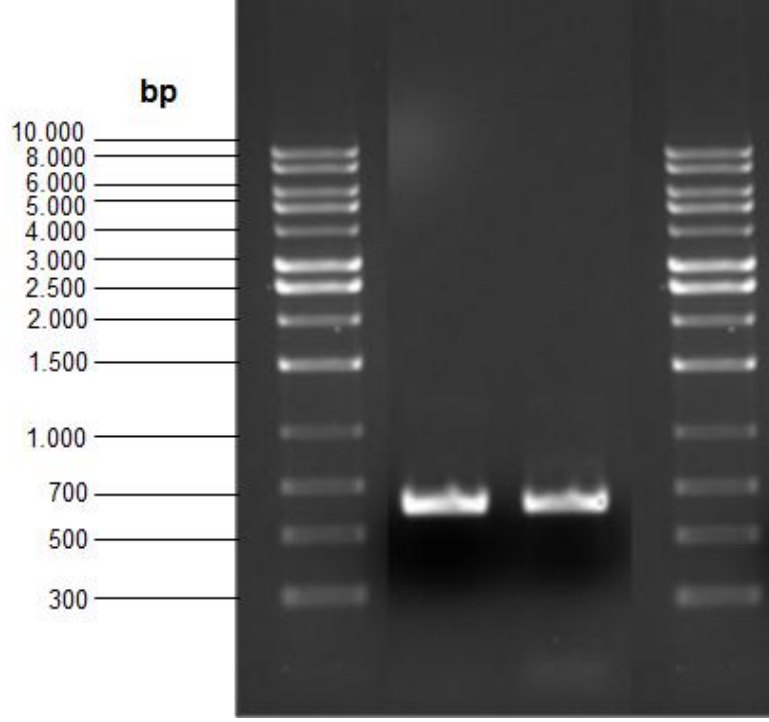
Elde edilen verilere göre pigment uygulanması (0,5 mg, 1 mg ve 2.5 mg) spor çimlenmesinin inhibisyonuna neden olmadı. UV uygulamaları da dikkate alındığında ticari formülasyonlarda pigment uygulanmasının spor çimlenmesi üzerinde negatif bir etkisinin söz konusu olmadığı anlaşıldı.

Bu iki deneyde 0,5mg pigment konsantrasyonunda katı kültürden elde edilen çimlenme ve miselyal gelişim inhibisyonunun olmaması “4.4. UV Radyasyonuna Dayanıklılıklarının Değerlendirilmesi” başlığında tartışıldığı üzere, pigmentin UV uygulamasından bağımsız bir şekilde sulu süspansiyonlarda çimlenmeyi teşvik ettiği fikri ile çelişmemektedir.

#### **4.8. Pigment Üreten Fungusun Moleküler Karakterizasyonunun Değerlendirilmesi**

UV koruyucu etkisi belirlenen ve *B. bassiana* izolatlarının gelişimini inhibisyona uğratmayan pigment üretici A2 kodlu izolatın moleküler karakterizasyonu 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S bölgesi hedeflenerek gerçekleştirildi. Bu amaçla elde edilen Genomik DNA, ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG 3') ve ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White vd. 1990) primerleri kullanılarak hedef

bölge çoğaltıldı. PCR ürünü %1 lik 1 x TAE tamponu içinde DNA markırı ile 80 V'da 50 dakika boyunca yürütülerek doğrulandı (Şekil 4.8).



Şekil 4.10. Çoğaltılan 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S bölgesinin bant görüntüsü

Doğrulan PCR ürünü PureLink™ Quick PCR Purification Kit ile saflaştırılarak ticari bir firma aracılığıyla her iki primer ile çift yönlü olarak okutuldu. Elde edilen sekans verileri BioEdit programı ile birleştirildikten sonra BLASTN 2.2.26+ programı kullanılarak, GenBank'ta olan türlerle karşılaştırıldı (Zhang vd. 2000). A2 kodlu izolat yapılan ITS sekans analizine ait karşılaştırma sonuçlarının mikroskobik incelemelerle desteklenmesi ile *Sporobolomyces roseus* olarak tanımlandı ve GenBank'a KY705066 erişim numarası ile kaydedildi.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Güneş ışığından kaynaklanan UV radyasyon sera ve tarla koşullarındaki zararlıların kontrolü için güneşe maruz kalan yerlere (örneğin, yapraklar) uygulanan entomopatojenik fungusların canlılığını etkileyen muhtemelen en zararlı çevresel faktördür. Bu durumun üstesinden gelmeyi amaçlayan mevcut durumdaki çalışmalar ya UV'ye karşı doğal bir toleransı olan izolatların veya suşların seçimine ya da solar radyasyonu absorblayan ya da bloke eden UV koruyucu maddelerin eklenmesi ile konidilerin yeniden formüle edilmesine odaklanmaktadır.

UV-toleranslı suşların veya izolatların seçilmesi basit bir olgu değildir. Fungusların hemen hepsi UV'ye karşı az ya da çok tolerans sergilemektedirler, fakat UV'ye karşı olan bu tolerans türler arasında ve tür içerisinde çok fazla çeşitlilik göstermektedir. Ortaya çıkan bu çeşitlilik izolatların farklı çevresel koşullara karşı doğal adaptasyonunu yansıtabilir. UV'ye karşı önemli derecede doğal toleransı olan izolatların seçilmesi etkili biyolojik kontrol ajanlarının geliştirilme aşamasındaki en önemli adımlardan birisi olarak kabul edilir.

Diğer yandan, entomopatojenik fungusların UV'den korunmasını sağlamak için konidilerin formüle edilmesi de düşünülen bir diğer yaklaşım stratejisidir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda, suya dayalı olan formülasyonlarla karşılaştırıldığında yağ tabanlı olarak formüle edilen konidilerin UV'ye karşı olan toleransında önemli derecede bir artış sağlandığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, konidial formülasyona UV koruyucu ajanların eklenmesi ile birlikte entomopatojenik funguslar üzerindeki UV radyasyonunun negatif etkilerinin kayda değer bir ölçüde azaltılabildiği günümüz literatüründe vurgulanmaktadır.

Bu uygulamalara rağmen birçok durumda oluşturulan formülasyonlar, konidilerin alan etkinliklerinin ve patojenitelerinin düşmesine neden olmaktadır. Bunun yanında tamamen doğal yollarla mücadele amaçlanırken, biyopreparatlar içerisinde çeşitli kimyasal katkıların kullanılması da kabul edilebilir bir durum değildir. Bu nedenle pigmentler gibi UV koruyucu yeni doğal ürünlerin keşfine ihtiyaç vardır.

Bu bilgiler ışığında mevcut tez çalışmasında, iyi bilinen bir entomopatojen fungus olan *B. bassiana*'nın ticari biyopreparatlarını güneşin zararlı etkilerinden koruyabilecek bir pigment ortaya konuldu. UV uygulamaları sonucu kontrole göre ~2,5 kat koruma sağlayan bu pigmentin moleküler çalışmalar neticesinde *S. roseus* tarafından üretildiği tespit edildi. Ayrıca bu tez çalışmasından elde edilen UV-görünür bölge absorpsiyon analiz sonucuna göre bu pigmentin karotenoid grubu olduğu belirlendi. Fakat yinede bu pigmentte bulunan karotenoid çeşitlerinin hangileri olduğuna ilişkin ileri karakterizasyon çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Bundan sonraki çalışmalarda bu pigmentin tez çalışmasında önerilen 0,5 mg/ml konsantrasyonda laboratuvar ve arazi koşullarında patojenite testleri yapılmalıdır. Ayrıca pigmentin çeşitli çevresel şartlarda stabilitesi araştırılarak, endüstriyel boyuttaki üretiminde kültür şartlarının optimizasyonunun yapılması da önerilmektedir.

Doğa koşullarında zararlıların biyolojik olarak kontrol edilmesine yönelik günümüze kadar birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, entomopatojenik fungusların UV toleransını etkileyen koşullar ve çözümleri ile ilgili keşfedilecek daha birçok şeyin var olduğu unutulmamalıdır. Mevcut tez kapsamında elde edilen bulgulara dayanarak, UV koruyucu özelliği olan bu pigmentin bundan sonraki çalışmalarda nanoteknolojinin de kullanılması ile birlikte fungal ajanların biyolojik aktivitesini arttırarak endüstriyel boyutlardaki üretiminde yeni bir yaklaşımın da önerilebileceği kanaatindeyiz.

## KAYNAKLAR

- Albayrak İskender, N., Ortucu, S., Aksu, Y., Saral, A., 2017. Isolation, characterization and pathogenicity of fungi from *Pristiphora abietina* (Hymenoptera: Tenthredinidae). *Fresenius Environmental Bulletin*, 26(1a): 628–633.
- Alexopoulos, C., C., Mims & M., Blackwell, 1996. *Introductory Mycology* (Wiley & Sons, New York).
- Allen, G.E., Greene, G.L. and Whitcomb, W.H., 1971. An epizootic of *Spicario rileyi* on the velvet beat caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* in Florida. *Florida Entomologist*, 54, 189-191.
- Alves, S.B. and Lecuona, R.E., 1998. Epizootiology Applied to the Microbial Control of Insects. In: Alves, S.B., Ed., *Controle Microbiano de Insetos*, 2nd Edition, Fealq, Piracicaba, 97-170.
- Bateman, R.P., Godonou, I., Kpindu, D., Lomer, C.J. and Paraiso, A., 1992. Development of a novel field bioassay technique for assessing mycoinsecticide ULV formulations. In C.J. Lomer and C. Prior, (Eds.), *Biological control of locust grasshoppers*. CAB International, UK, pp: 255-262.
- Batista, F., Alves, A., Alves, S.B., Pereira, L.F.A., R.M. and Augusto, N.T., 1998. Formulation of Entomopathogens. In: Alves, S.B., Ed., *Controle Microbiano de Insetos*, 2nd Edition, Fealq, Piracicaba, 917-965.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., 1966. Turck M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. *Am J Clin Pathol*, 36:493–6.
- Bell, J.V. 1974. Mycoses. In: Cantwell, G.E., Ed., *Insect Diseases*, Marcel Dekker Inc., New York, 185-236.
- Braga, G., Flint, S.D., Miller, C.D., Anderson, A.J., Roberts, D.W. 2001a. Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochem Photobiol* 74(5):734–739.
- Braga, G.U.L., Flint, S.D., Miller, C.D., Anderson, A.J., Roberts, D.W. 2001b. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S. *Journal of Invertebrate Pathology* 78: 98-108.

- Braga, G.U.L., Rangel, D.E.N., Flint, S.D., Miller, C.D., Anderson, A.J., Roberts, D.W., 2002. Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. *Mycologia* 94, 912–920.
- Burges, H.D., 1998. *Formulation of Microbial Pesticides*. Springer, Dordrecht.
- Charnley, A.K. and Collins, S.A., 2007. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships* (2nd edition), Eds: Kubicek, C.P. and Druzhinina, I. S., Springer-Verlag, Berlin, 159-187.
- Charnley, A.K. and Leger, R.J., 1989. The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*, Eds: Cole, G.T. and Kock, H.C., Plenum Press, New York, 267-286.
- Chelico, L., Haughian, J. L., Khachatourians, G.G., 2006. Nucleotide excision repair and photoreactivation in the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Beauveria nivea*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces farinosus* and *Verticillium lecanii*. *Journal of Applied Microbiology* 100: 964-972.
- Chew B.P., Park, J.S., Wong, M.W., Wong, T.S., 1998. A comparison of the anticancer activities of dietary beta-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice in vivo. *Anticancer Res* 19(3A):1849–1853.
- Clarkson, J. M. and Charnley, A. K. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology* 4: 197-203.
- Costa, F.T.M., Justo, G.Z., Dura'n N, Nogueira, P.A., Lopes, S.C.P., 2005. The use of violacein in its free and encapsulated form in polymeric systems against malaria. *Brazilian Patent PIBr* 2005, 056399–0.
- Costa, L.B., Rangel, D.E.N., Morandi, M.A.B. and Bettiol, W., 2012. Impact of UV-B Radiation on *Clonostachys ro-sea* Germination and Growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 2497-2504.
- Deacon, J.W., 1983. *Microbial Control of Pests and Diseases*. Van. Nostrand. New York. Pp.43.
- DeBach, P., 1974. *Biological control by natural enemies*. Cambridge University Press.

- Dufossé, L., 2009. Microbial and microalgal carotenoids as colourants and supplements. In *Carotenoids* Birkhäuser Basel 83–98.
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, M.S., Philippe Blanc, P., Murthy, C.N.K., Ravishankar, A.G., 2005. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology* 16 (2005) 389–406.
- Edgington, S., Segura, H., De La Rosa, W. and Williams, T., 2000. Photoprotection of *Beauveria bassiana*: Testing Simple Formulations for Control of the Coffee Berry Borer. *Integrated Journal of Pest Management*, 46, 169-176.
- Eken, C., Hayat, R., 2009. Preliminary evaluation of *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries in laboratory conditions, as a potential candidate for biocontrol of *Tetranychus urticae* Koch. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(3): 489–492.
- Engelberg, D., Klein, C., Martinetto, H., Struhl, K., Karin, M. 1994. The UV response involving the Ras signaling pathway and AP-1 transcription factors is conserved between yeast and mammals. *Cell* 77: 381-390.
- Erkiliç, L. ve Uygun, N., 1993. Entomopatojen fungusların biyolojik mücadelede kullanılma olanakları. *Türk. Entomol. Der.*, 17(2), 117-128.
- Éverton K.K. Fernandes, Drauzio E.N. Rangel, Áurea M.L. Moraes, Vânia R.E.P. Bittencourt, Donald W. Roberts., 2007. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates, *Journal of Invertebrate Pathology*, Volume 96, Issue 3, Pages 237-243.
- Fargues, J., Goettel, M.S., Smits, N., Ouedraogo, A., Vidal, C., Lacey, L.A., Lomer, C.J. and Rougier, M., 1996. Variability in Susceptibility to Simulated Sunlight of *Conidia* among Isolates of Entomopathogenic Hyphomycetes. *Mycopathologia*, 135, 171-181.
- Fargues, J., Goettel, M.S., Smits, N., Ouedraogo, A., Vidal, C., Lacey, L.A., Lomer, C.J., Rougier, M., 1996. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. *Mycopathologia* 135, 171–181.

- Fargues, J., Rougier, M., Goujet, R., Smits, N., Coustere, C., Itier, B., 1997. Inactivation of conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by nearultraviolet (UVB and UVA) and visible radiation. *J. Invertebr. Pathol.* 69, 70–78.
- Faria, M.R. and Wraight, S.P., 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A Comprehensive List with Worldwide Coverage and International Classification of Formulation Types. *Biological Control*, 43, 237-256.
- Fernandes, E.K.K., Rangel, D.E.N., Moraes, A.M.L., Bittencourt, V.R.E.P. and Roberts, D.W., 2007. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. *J. Invert. Pathol.*, 96, 237-243.
- Flores-Cotera, L.B., Sanchez, S., 2001. Copper but not iron limitation increases astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in a chemically defined medium. *Biotechnol Lett* 23:793–797.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., 1995. DNA Repair and Mutagenesis. American Society for Microbiology, Washington.
- Gao, L. and Liu, X.Z., 2009. A novel two-step cultivation method to optimize carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio for sporulation of biocontrol fungi. *Folia. Microbiol.*, 54(2), 142-146.
- Getzin, L.W., 1961. *Spicaria rileyi* an entomogenous fungus of Trichoplusiani. *Journal of Insect Pathology*, 3, 2-10.
- Giovannucci, E., Rimm, E.B., Liu, Y., Stampfer, M.J., Willett, W.C., 2002. A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 94(5):391–398.
- Goettel, M.S., Hajek, A.E., Siegel, J.P. and Evans, H.C., 2001. Safety of fungal biocontrol agents. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential.* Eds: Butt, T.M., Jackson, C. and Magan, N., CABI International, Wallingford, 347-376.
- Goswami, G., Chaudhuri, S., Dutta, D., 2010. Effect of pH and temperature on pigment production from an isolated bacterium. Department of Biotechnology, National Institute of Technology, Durgapur Durgapur - 713209, West Bengal, India.
- Griffiths, H.R., Mistry, P., Herbert, K.E., Lunec, J., 1998. Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 35: 189-237.



- Griffiths, H.R., Mistry, P., Herbert, K.E., Lunec, J., 1998. Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 35, 189–237.
- Hallsworth, J.E., Magan, N., 1999. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *J. Invert. Pathol.* 74, 261–266.
- Harki, E., Talou, T., and Dargen, R., 1997. Purification, characterisation and analysis of melanin extracted from *Tuber melanosporum* Vitt. *Food Chem.* 58:69–73.
- Hedimbi, M., Kaaya, G.P., Singh, S., Chimwamurombe, P.M., Gindin, G., Glazer, I., Samish, M., 2008. Protection of *Metarhizium anisopliae* conidia from ultraviolet radiation and their pathogenicity to *Rhipicephalus evertsi evertsi* ticks. *Exp Appl Acarol*, 46:149–156.
- Hong, M.Y., Seeram, N.P., Zhang, Y., Heber, D., 2008. Anticancer effects of Chinese red yeast rice versus monacolin K alone on colon cancer cells. *J Nutr Biochem* 19(7):448–458.
- Hoy, M.A., 2008 Acaricides and Miticides In: Capinera JL (ed) *Encyclopedia of entomology* 2nd ed. Springer Science Media BV, 3:9–21.
- Hsu, L.C., Hsu, Y.W., Liang, Y.H., Kuo, Y.H., Pan, T.M., 2011. Anti-tumor and anti-inflammatory properties of ankaflavin and monaphilone A from *Monascus purpureus* NTU 568. *J Agri Food Chem* 59(4):1124–1130.
- Ignoffo, C.M. and Garcia, C., 1994. Antioxidant and Oxidative Enzyme Effects on the Inactivation of Inclusion Bodies of the *Heliothis* Baculovirus by Simulated Sunlight-UV. *Environmental Entomology*, 23, 1025-1029.
- Ignoffo, C.M., Hostetter, D.L., Sikorowski, P.P., Sutter, G., Brooks, W.M., 1977. Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus, and protozoan by an ultraviolet light source. *Environ. Entomol.* 6, 411–415.
- Inglis, G.D., Goettel, M.S., Johnson, D.L., 1995a. Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Biol. Control* 5, 581–590.
- Inglis, G.D., Johnson, D.L. and Goettel, M.S., 1996. An oil-bait bioassay method used to test the efficacy of *Beauveria bassiana* against grasshoppers. *J. Invertebr. Pathol.*, 67: 312-315.

- Inglis, G.D., Johnson, D.L., Goettel, M.S., 1995b. Effects of stimulated rain on the persistence of *Beauveria bassiana* conidia on leaves of alfalfa and wheat. *Biocontrol Sci. Technol.* 5, 365–369.
- Inglis, G.D., Johnson, D.L., Goettel, M.S., 1997a. Field and laboratory evaluation of two conidial batches of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin against grasshoppers. *Can. Entomol.* 129 (1), 171–186.
- Irigaray F.J.S.C., Marco-Mancebon, V. and Perez-Moreno, I., 2003. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and its compatibility with triflumuron: effects on the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Biol Control* 26, 168-173.
- Jackson, M.A., Dunlap, C.A., Jaronski, S., 2010. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl*, 55, pp. 129–145
- Jaques, R.P., 1970. Tests on Protectants for Foliar Deposits of a Polyhedrosis Virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 17, 9-16.
- Jaronski, S.T., 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *BioControl*, 55, 159-185.
- Jones, K.A. and Burges, H.D., 1998. Technology of Formulation and Application. In: Burges, H.D., Ed., *Formulation of Microbial Pesticides—Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments*, Kluwer Academic, Dordrecht, 7-30.
- Kryukov, V.Y., Khodyrev, V.P., Yaroslavtseva, O.N., Kamenova, A.S., Duisembekov, B.A. and Glupov, V.V., 2009. Synergistic action of entomopathogenic hyphomycetes and the bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* in the infection of Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 45 (5), 511-516.
- Kunwar, A., Adhikary, B., Jayakumar, S., Barik, A., Chattopadhyay, S., Raghukumar, S., and Priyadarsini, K.I., 2012. Melanin, a promising radioprotector: mechanisms of actions in a mice model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 264:202–211.

- Lee, J.Y., Kang, S.W., Yoon, C.S., Kim, J.J., Choi, D.R. and Kim, S.W., 2006. *Verticillium lecanii* spore formulation using UV protectant and wetting agent and the biocontrol of cotton aphids. *Biotechnol Lett.*, 28, 1041-1045.
- Leemon, D.M. and Jonsson, N.N., 2008. Laboratory studies on Australian isolate of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 97: 40-49.
- Leger, R.J., Charmley, A.K. and Cooper, R.M., 1988. Production of polyphenol pigments and phenoloxidase by the entomopathogen, *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 53, 211-215.
- Leland, J.E. and Behle, R.W., 2005. Coating *Beauveria bassiana* with Lignin for Protection from Solar Radiation and Effects on Pathogenicity to *Lygus lineolaris* (Heteroptera: Miridae). *Biocontrol Science and Technology*, 15, 309-320.
- Leland, J.E., Stoneville, M.S., Behle, R.W. and Peoria, I.L., 2004. Formulation of Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana*, with Resistance to UV Degradation for Control of Tarnished Plant Bug, *Lygus lineolaris*. Beltwilde Cotton Conference, San Antonio, 5-9 January 2004, 1800-1808.
- Liu, G.Y., Nizet, V., 2009. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends in Microbiology*, Vol.17 No.9, 0966-842X/\$.
- Lomer, C.J., Langewald, J. and Affa, P., 1998. *Green Muscle: Manuel d'utilisation*. Lubilosa 18, Cotonou.
- Michereff Filho, M., Faria, M., Wraight, S.P. and Silva, K.F.A.S., 2009. Micoinsecticides and Micoacaricides in Brasil: As We Are after Four Decades? *Arquivos do Instituto Biológico*, 76, 769-779.
- Moore, D., Bridge, P.D., Higgins, P.M., Bateman, R.P., Prior, C., 1993. Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. *Ann Appl Environ Biol* 122:605–616
- Morley-Davies, J., Moore, D., Prior, C., 1995. Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated light and a range of temperatures. *Mycol. Res.* 100 (1), 31–38.

- Örtücü, S., Algur, Ö.F. ve Aydoğan, M.N., 2010. Entomopatojen Fungus Toksinlerinin İnsektisidal Etkileri. 1. Ulusal Palandöken Toksikoloji Sempozyumu, 28-30 Mayıs 2010, Erzurum.
- Örtücü, S , Albayrak İskender, N . 2017. Determination of control potentials and enzyme activities Of *Beauveria bassiana* (BALS.) VULL. isolates against *Tetranychus urticae* KOCH (ACARI: TETRANYCHIDAE). Trakya University Journal of Natural Sciences, 0-0. DOI: 10.23902/trkjnat.285656
- Pekrul, S. and Grula, E.A., 1979. Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. Journal of Invertebrates Pathology, 34, 228-247.
- Peterson, W.J., Bell, T.A., Etchells, J.L., Smart Jr, W.W.G., 1954. A procedure for demonstrating the presence of carotenoid pigments in yeasts. J Bacteriol, 67(6): 708–713.
- Posadas, J.B., Angulo, L.M., Mini, J.I., Lecuona, R.E., 2012. Natural Tolerance to UV-B and Assessment of Photoprotectants in Conidia of Six Native Isolates of *Beauveria bassiana* (Bals-Criv) Vuillemin. World Applied Sciences Journal, 20 (7): 1024-1030.
- Rajagopal, L., Sundari, C.S., Balasubramanian, D., Sonti, R.V., 1997. The bacterial pigment Xanthomonadin offers protection against photodamage. FEBS Lett 415:125–128.
- Ramirez, I., Nunez, M.L., Valdivia, R., 2000. Increased astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant grown on date juice from *Yucca fillifera*. J Ind Microbiol Biotechnol 24:187–190.
- Reddy, N.P, Khan, P.A.A., Devi, K.U., Victor, J.S., Sharma, H.C., 2008. Assessment of the suitability of Tinopal as an enhancing adjuvant in formulations of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. Pest Manag Sci 64:909–915.
- Reyes, F.G., Valim, M.F., Vercesi, A.E., 1996. Effect of organic synthetic food colours on mitochondrial respiration. Food Addit Contam 13(1):5–11.
- Rodrigues, I.M.W., Forim, M.R., da Silva, M.F.G.F., Fernandes, J.B., Filho, A.B., 2016. Effect of Ultraviolet Radiation on Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium*

- anisopliae, Pure and Encapsulated, and Bio-Insecticide Action on *Diatraea saccharalis*. *Advances in Entomology*, 4, 151-162.
- Rombach, M. C. and Gilespe, A.T., 1988. Entomogenous Hyphomycetes for Insect and Mite Control on Greenhouse Crops. *Biocontrol News and Information*, 9, 7-18.
- Royse, J.D. and M.S. Ries,. 1978. The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathology*, 68:603-607.
- Safavi, S.A., Kharrazi, A., Rasouljan, G.R., Bandani, A.R., 2010. Virulence of some isolates of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 12(1): 13–21.
- Sajilata, M.G., Singhal, R.S., Kamat, M.Y., 2008. The Carotenoid Pigment Zeaxanthin-A Review. Institute of Food Technologists. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol.7, 29-49.
- Seger, C., Erlebach, D., Stuppner, H., Griesser, U.J. and Strasser, H., 2005. Physicochemical properties of oosporein, the major secreted metabolite of the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*. *Helv. Chim. Acta.*, 88, 802-810.
- Shah, P.A. and Pell, J.K., 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61, 413-423.
- Shapiro, M., Poh Agin, P. and Bell, R. (1983) Ultraviolet Protectants of the Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae) Nuclearpolyhedrosis Virus. *Environmental Entomology*, 12, 982-985.
- Stankovic, N., Radulovic, V., Petkovic, M., Vuckovic, I., Jadranin, M., Vasiljevic, B., Nikodinovic-Runic, J., 2012. *Streptomyces* sp. JS520 produces exceptionally high quantities of undecylprodigiosin with antibacterial, antioxidative, and UV-protective properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 96(5):1217–1231.
- Sundarababu, P.C., 1985, *Metarhizium* and *Beauveria* infection in insects. *Microbial Control and Pest Management*, Ed: Jayaraj, S., Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, 130-132.
- Talwar, B.H., 2005. Isolation and characterization of entomopathogenic fungi and their effectiveness. Ph.D. Thesis, In *Agricultural Entomology*, Department of Agricultural Microbiology, Dharwad.

- Thompson, S.R., Brandenburg, R.L., Arends, J.J., 2006. Impact of moisture and UV degradation on *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin conidial viability in turfgrass. *Biological Control*, 39: 401–407.
- Uygun, N., Ulusoy, M.R. ve Satar, S., 2010. Biyolojik mücadele. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 1, 1-14.
- Venil, C.K., Lakshmanaperumalsamy, P., 2009. An Insightful Overview on Microbial Pigment, Prodigiosin. *Electronic Journal of Biology*, Vol. 5(3): 49-61.
- Vey, A., Hoagland, R.E. and Butt, T.M., 2001,. Toxic Metabolites of Fungal Biocontrol Agents. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. Eds: Butt, T.M., Jackson, C. and Magan, N., CABI International, Wallingford, 311-346.
- Vinarov, A., Robucheva, Z., Sidorenko, T., Dirina, E., 2003. Microbial biosynthesis and making of pigment melanin. *Commun Agric Appl Biol Sci* 68:325–326.
- Vurro, M., 2007. Benefits and risks of using fungal toxins in biological control strategies. *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, Eds: Vurro, M. and Gressel, J., Springer, 53-74.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and Direct Sequencing of fungal Ribosomal RNA Genes For Phylogenetics. *Genetics and Evolution*, 315-322.
- Yadav, K.S. and Prabha, R., 2014. Extraction of Pigments from *Rhodotorula* Species of Dairy Environment. *Indian Journal of Science and Technology*, Vol 7(12), 1973–1977.
- Yao, S., Ying, S., Feng, M., Hatting, J.L., 2010. In vitro and in vivo responses of fungal biocontrol agents to gradient doses of UV-B and UV-A irradiation. *BioControl*, 55: 413-422.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wanger, L., Miller, W., 2000. A greedy algorithm for DNA Sequences. *J Comput Biol*, 7(1-2), 203-214.

## EKLER

**EK 1. *Sporobolomyces roseus* A2 izolatının ITS1-5.8S-ITS2 bölgesinin birleştirilmiş baz dizisi (GenBank No: KY705066)**

TGTCCATTTAACTTGGAACCCGACCTTCTCACATCTAACCCCTGTGCATCTGT  
ATTTAATGGCGAGCAATTTTCGAATTGTGAGCCATTTCACTTTATAAACACT  
AGTCTATGAATGTAAAATTTTTATAACAATAAAAACTTTCAACAACGGATCT  
CTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGA  
ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCTCTCTG  
GTATTCCGGAGAGCATGTCTGTTTGAGTGTCATGAATTCTTCAACCCAACTG  
TTTCTTGTAACAGCTGGTGTTTGGATTCTGAGCGCTGCTGGCTTCGTGCCT  
AGCTCGTTCGTAATACATCAGCATCCCTAATAACAAGTTTGGATTGACTTGGC  
GTAATAGACTATTCGCTAAGGATTCAATGTTCTGCATTGAGCCAACCTTAGTT  
AAGGAAGCTTCTAATTGAAAAGTCTACCTTTATATTAATCTCAAATCAGGC  
AGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA

## ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Bingöl'de doğdu. İlköğretim, ortaokul ve lise eğitimini Erzurum'da tamamladı. 2007 yılında Atatürk Üniversitesi Kâzım Karabekir Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği bölümünü kazandı ve 2012 yılında dereceyle lisans eğitimini tamamladı. 2015 yılında Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.