

*Orijinal araştırma (Original article)*

**Altkültürü yapılan *Beauveria bassiana* izolatlarının *Spodoptera littoralis* üzerindeki etkinliği**

**Adile AKDAŞ<sup>1</sup>, Özlem GÜVEN<sup>2\*</sup>, İsmail KARACA<sup>3</sup>**

**Effects of successive subculturing of *Beauveria bassiana* isolates on *Spodoptera littoralis***

**Abstract:** To maintain the effectiveness of entomopathogenic fungi mass produced as fungal biopesticides, it is important to maintain their virulence during serial in vitro subculturing. Many entomopathogenic fungal species tend to lose their spore production ability and/or virulence when subcultured several time in artificial medium. In this study, the effects of 12 successive in vitro subcultures of four pathogenic strains of *Beauveria bassiana* (BMAUM-E2001, BMAUM-E2003, BMAUM-E6001 and BMAUM-M6001), isolated from soils in Isparta Province, Turkey in 2014, were studied on *Spodoptera littoralis*, an important pest of cotton and vegetable cultivation. In addition, the colony development of each subculture was evaluated on artificial medium. Subcultured forms of all isolates, except BMAUM-E2001, were highly virulent to *S. littoralis* larvae and caused 100% death in 5 days. The mycelial growth of the 1st to 12th subcultures showed a linear increase over time. Even after the 12th subculture, the isolates did not lose their virulence and completed their development and produced spores.

**Key words:** Entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, *Spodoptera littoralis*, Isparta

**Öz:** Fungal biyopestisitlerin kitlesel üretiminde fungusların zararlılara karşı etkili olmalarının yanında in vitro koşullarda devamlı olarak alt kültüre alındıklarında virülanslarını korumaları da oldukça önemlidir. Birçok entomopatojen fungus türü besiyeri ortamında kültüre alındıklarında spor üretimini ya da virülanslarını kaybetme eğilimindedirler. Bu çalışmada Isparta ili ve ilçelerinin topraklarından 2014 yılında izole edilmiş olan *Beauveria bassiana*'ya ait BMAUM-E2001, BMAUM-E2003, BMAUM-E6001 ve BMAUM-M6001 izolatların 12 altkültür formlarının tarımsal ürünlerde önemli ekonomik kayıplara yol açan *Spodoptera littoralis* üzerindeki etkinlikleri araştırılmıştır. Bu çalışmalara ek olarak altkültürlerin koloni gelişimleri yapay besiyeri ortamında değerlendirilmiştir. BMAUM-E2001 izolatu dışındaki tüm izolatların uygulama yapılan altkültür formları *S. littoralis* larvaları üzerinde oldukça virulent oldukları ve 5 günde %100 ölüme neden olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların 1-12. altkültürlerinin miselyum gelişimleri zamana bağlı olarak doğrusal bir eğim göstermiştir. En son yapılan 12. altkültürde bile izolatların virülanslığını kaybetmediği ve besiyeri ortamında gelişimini ve spor üretimini tamamladığı gözlenmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Entomopatojen fungus, *Beauveria bassiana*, *Spodoptera littoralis*, Isparta

<sup>1</sup> Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Isparta/Türkiye

<sup>2</sup> Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kahramanmaraş/ Türkiye

<sup>3</sup> Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Isparta/Türkiye

\* Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: ozlemk@ksu.edu.tr,

ORCID ID: 0000-0001-5577-5725; 0000-0002-1775-8323; 0000-0002-0975-789X

Alınış (Received): 26.04.2020

Kabul edilmiş (Accepted): 09.10.2020

## Giriş

Tarımda zararlı böceklere karşı birçok mücadele yöntemi bulunmasına rağmen, kolay uygulanabilmesi ve çabuk etki göstermesinden dolayı üreticiler daha çok kimyasal mücadeleyi tercih etmektedirler. Zararlıya karşı kullanılan ilaçlar ve doz uygulamalarında yapılan artış hem çevreye zarar vermekte hem de bu ilaçlara karşı direncin artmasına neden olmaktadır (Saidy et al., 1989; Delen et al., 2005). Kimyasal mücadelenin ortaya çıkardığı olumsuz etkilerden ve ürünler üzerinde oluşturduğu kalıntı problemlerinden dolayı, alternatif mücadele yöntemlerine gereksinim gün geçtikçe artmaktadır (Aroiee et al., 2005). Biyolojik mücadele kapsamında predatörlerden, parazitoidlerden ve entomopatojen mikroorganizmalardan (funguslar, bakteriler, virüsler, nematotlar, protozoalar vb.) yararlanılmaktadır. Entomopatojen funguslar özellikle böcek zararlılarına karşı kullanılmasını hedef alan birçok çalışmaya konu olmuş ve bunlardan bazıları biyolojik mücadele kapsamında ruhsatlandırılmıştır (Kılınçer et al., 2010; Er, 2013).

Biyolojik mücadelede kullanılacak mikrobiyal kontrol etmenlerinin etkinliğinin yüksek olması, öncelikle uygulama yapılacak ülkenin veya bölgenin doğal koşullarına uyum sağlamış türlerden oluşması gerekmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda, entomopatojen fungusların uygulama yapılacak bölgeden izole edilmiş olması başka ülke veya bölgeden temin edilen diğer entomopatojen fungus türlerine göre daha iyi sonuçlar verdiği belirlenmiştir (Beron & Diaz, 2005).

Türkiye’de entomopatojen fungusların zararlı böcek popülasyonlarında neden olduğu hastalıkların araştırılmasında, etkilerinin artırılmasında ve zararlıların kontrolünde mikrobiyal insektisit olarak kullanılmasında çok az gelişme sağlanmıştır. Bölgesel olarak ülkemizde tarımsal arazilerde entomopatojen fungus çeşitliliği (Er et al., 2008; Er & Mart, 2009; Sevim et al., 2009; Er, 2013; Koz & Güven, 2014; İzgi & Güven, 2014; Baydar et al., 2015) ve bunların zararlılar üzerine etkinliklerinin araştırılması ile ilgili bazı çalışmalar bulunmaktadır (Sevim et al., 2009; Güven et al., 2014; Öztürk et al., 2015; Güven et al., 2015; Baydar et al., 2015; Cırbın et al., 2017).

Entomopatojen fungusların tarımsal ürünlerde toksik kalıntı bırakmamaları, yararlı böceklere ve hedef dışı canlılara zararlı olmamalarından dolayı mikrobiyal insektisit olarak kullanılmasında tercih edilen en önemli özellikleridir (Zimmermann, 2007). Entomopatojen funguslar zararlı böcek popülasyonunun entegre mücadelesinde doğal düşmanlara zarar vermediği için entegre mücadele kapsamında oldukça önemli potansiyele sahiptirler (Inglis, 2001). Ancak entomopatojen funguslar kimyasal insektisitler kadar kısa sürede etkili olmadıkları için kimyasal mücadelenin tamamen yerini almaları uzak bir ihtimaldir. Bundan dolayı mikrobiyal insektisit olarak seçilecek fungusların pestisit toleransları yüksek olmalı ve ürün yetiştirme sisteminde canlı kalabilmelidir.

Funguslar, yapay besi ortamında art arda alt kültüre alındığında virülanslığını kaybetmekte ve morfolojik yapılarında değişimler olmaktadır. Bu durumu tanımlamak için fenotipik dejenerasyon, fenotipik instabilite, fenotipik bozulma, ikili fenomen, tuzlanma ve zayıflama (İbrahim et al., 2002; Ryan et al., 2002) gibi

çeşitli terimler kullanılmıştır. Funguslarda meydana gelen morfolojik değişiklikler renk değişimi ve büyüme formunun yanı sıra sporülasyonun azalmasını içerir (Wang et al., 2005). Entomopatojen fungusların spor verimliliğinde veya virülansında meydana gelecek olan değişimler özellikle biyolojik mücadele etmenlerini üreten firmalar için oldukça büyük sorun teşkil etmektedir. Spor verimliliğini ve virülansını kaybetmiş bir ticari ürünün piyasadaki satışını olumsuz etkileyecektir (Butt et al., 2006). Virülansda zayıflama entomopatojenlerin tüm önemli taksonlarında gözlenmiştir. Her izolatın virülansındaki azalma oranı farklılık göstermektedir. Bazı izolatlar, tek veya üç kere (Nagaich, 1973) alt kültüre alındıktan sonra değişim gösterirken bazıları ise 10-12 defa alt kültüre alındıktan sonra virülansda belirgin bir düşüş gözlemlenmiştir (Morrow et al., 1989; Hajek et al., 1990). Bunun tersine birçok çalışmada birçok alt kültüre alınan izolatların virülansında herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Hall, 1980; Brownbridge et al., 2001).

Türkiye’de zararlı böceklerin mücadelesinde kullanılan entomopatojen fungus preparatları yurtdışı menşeli ürünler olup yerel olarak elde edilen hiçbir fungus izolatu ruhsatlandırılıp ticarileştirilmemiştir. Bu konuda yasal bazı engellerin olmasının yanında entomopatojen fungusların etkinliği ve mikrobiyal insektisit olarak potansiyelinin araştırılmasına yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır. Pamuk yaprak kurdu, *Spodoptera littoralis* oldukça geniş coğrafik alanlara yayılmış ve yaklaşık 87 bitki türünde zararları tespit edilmiş önemli bir zararlıdır (Anonim, 2008). Bu zararlıya karşı kullanılan kimyasal ilaçların doz uygulamalarında yapılan artış hem çevreye zarar vermekte hem de bu ilaçlara karşı direnci arttırmaktadır (Saidy et al, 1989). Isparta ili Eğirdir ve Merkez ilçesinden örneklenen topraklardan izole edilen ve ön patojenite testi sonucu (Baydar et al., 2015) virülansı yüksek bulunan *Beauveria bassiana* ve *Metarhizium anisopliae* izolatlarının etkinlikleri *S. littoralis*’e karşı denenmiş ve *B. bassiana* izolatlarının oldukça etkili olduğu bulunmuştur (Cırbın et al., 2017). Bu çalışma kapsamında, etkinliği önceki çalışmalarda belirlenen *B. bassiana*’ya (Baydar et al., 2015; Cırbın et al., 2017) ait olan 4 farklı izolatın art arda alt kültüre alınmaları sonucunda *S. littoralis* üzerindeki virülanslığı ve yapay besiyeri ortamında koloni gelişimi araştırılmıştır.

## Materyal ve yöntem

Isparta il merkezi ve çevre ilçelerinden örneklenen topraklardan “*Galleria* tuzak metodu” (Zimmermann, 1986) kullanılarak izole edilen ve ön patojenite testi sonucu patojenitesi yüksek bulunan (Baydar et al., 2016; Cırbın et al., 2017) izolatlar kullanılmıştır (Çizelge 1). Entomopatojen fungusların tür teşhisi, görüntülü ışık mikroskopu ve diseksiyon mikroskopu yardımı ile çeşitli kaynaklar (Samson, 1974; Samson et al, 1988; Goettel & Inglis, 1997; Humber, 1997) kullanılarak yapılmıştır. Denemede kullanılan entomopatojen fungusların türü, izolat adları ve elde edilme tarihleri Çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. Denemede kullanılan entomopatojen fungus izolatları

Table 1. Entomopathogenic fungi isolates used in this study

No	Entomopatojen fungus türü	İzolat adı	Bölge	Tarih
1.	<i>Beauveria bassiana</i>	BMAUM-E2001	Eğirdir	09.01.2014
2.	<i>Beauveria bassiana</i>	BMAUM-E2003	Eğirdir	09.01.2014
3.	<i>Beauveria bassiana</i>	BMAUM-E6001	Eğirdir	09.01.2014
4.	<i>Beauveria bassiana</i>	BMAUM-M6001	Merkez	15.09.2014

### **Pamuk Yaprak Kurdu, *Spodoptera littoralis*'in Üretimi**

Ankara Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı'ndan getirilen böceklerin pupa dönemleri karanlık ortamda içerisinde yapay besiyeri (su, askorbik asit, sorbik asit, methyl p-hydroxy benzoat, yeast ve agar) bulunan plastik küvetlere alınmıştır. Böceğin kitle üretimi 25±1°C sıcaklık, %60±5 orantılı nem ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık koşullara ayarlanmış iklim kabininde yürütülmüştür. Denemelerde *S. littoralis*'in üçüncü larva dönemleri kullanılmıştır.

### **Entomopatojen fungusların üretimi**

*Beauveria bassiana*'nın BMAUM-E2001, BMAUM-E2003, BMAUM-E6001 ve BMAUM-M6001 izolatları *Galleria mellonella* larvalarına enfekte edilmiştir. *Galleria mellonella* larvaları üzerinde spore üreten izolatlar Sabouraud Glukoz Agar (SGA) besi ortamına inoküle edilerek kültüre alınmış ve alınan bu kültür formu 1. altkültür olarak adlandırılmıştır. Spor inokülasyonundan 15 gün sonra herhangi bir kontaminasyon içermeyen 1. altkültür formundan 2. altkültür formu için yeni SGA'lı ortama spor ekimi yapılmış ve bu işleme 12. altkültür formu oluşana kadar devam edilmiştir. Tüm izolatların her bir altkültürü için en az beş adet SGA'lı Petri kabı (90x15 mm) kullanılmıştır. Ekim yapılan Petri kapları karanlık ortamda 25±1°C sıcaklıkta yetiştirilmiş ve 4°C sıcaklıkta saklanmıştır.

### **Entomopatojen fungusların gelişiminin incelenmesi**

Her fungus izolatının 1-12 altkültür formları hazırlandıktan sonra steril edilmiş kürdan ile bu altkültürlerden alınan sporlar, içerisinde SGA besiyeri bulunan Petri kabına (90x15 mm) kürdanın uç kısmı değiştirilerek inoküle edilmiş ve 24 saat aralıklar ile kolonilerin çapları (mm) ölçülmüştür. Genelde tam dairesel gelişim sağlamayan kolonilerden birkaç yerden çap ölçümleri yapılmış ve bunların ortalama değerleri kullanılmıştır. Her bir izolat ve altkültür için dört adet Petri kabı kullanılmış ve her bir petri kabına beş adet spor inokülasyonu yapılmıştır. Toplamında her bir izolat için 20 adet miselyum kolonisinin ölçümleri yapılmıştır. Miselyum gelişimlerinin ölçümleri yedi gün sonunda sonlandırılmıştır.

### Denemelerin Kurulması

Art arda altkültürleri alınan entomopatojen fungus izolatlarının *S. littoralis* üzerinde etkinliğinin ve virülanslığının belirlenmesi için yapılan biyoassay denemeleri Agar yüzeyi biyoassay yöntemi ile kurulmuştur. Ekimi yapılan alt kültürlerden toplanan sporlar 20 ml %0.03 Tween 80'li su ile karıştırılarak stok solüsyonu hazırlanmış ve bu solüsyondan seyreltme yapılarak konsantrasyon belirlenmiştir. İçerisinde 10-13 ml %2 agar konulmuş Petri kaplarının (90x15 mm) yüzeyinde 1000 spor/mm<sup>2</sup> olacak şekilde hesaplamalar yapıldıktan sonra hazırlanan spor süspansiyonundan 200 µl eklenerek, drigalski spatülü ile tüm agarlı yüzeye yayılmıştır. Kontrol grubu için %0.03 Tween 80'li su kullanılmıştır. Altı tekerrürlü olarak hazırlanan Petri kaplarına beş adet üçüncü dönem larvalar bırakılmıştır. Funguslu agar yüzeyinde 24 saat bırakılan böcekler, içerisinde kurutma kâğıdı ve hazır besin bulunan petri kaplarına aktarılmıştır. Denemelerdeki larva ölümleri ve fungus enfeksiyonları 10 gün boyunca günlük olarak kontrol edilmiştir. Biyoassay denemeleri entomopatojen fungus izolatlarının altkültür formlarının miselyum gelişimleri, sector oluşumu ve renk değişikliği değerlendirilerek (Ansari and Butt, 2011) diğer altkültür formlarını temsilen 1., 5., 8. ve 12. alt kültürleri ile yapılmıştır. Denemeler, 25±1 °C sıcaklık, %60 orantılı nem, 16 saat aydınlık, sekiz saat karanlık koşullara ayarlanmış iklim odalarında yürütülmüştür.

### Verilerin değerlendirilmesi

Çalışma sonucunda her fungus izolatının 12 altkültürünün ayrı ayrı zamana bağlı olarak gelişmeleri arasındaki farklar JMP (Ver. 9) programı yardımı ile hesaplanmıştır. Yine her bir altkültürün zamana bağlı gelişmesi ile ilgili ortalamalar Tukey (p≤0.01) çoklu karşılaştırma testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Ayrıca her fungus izolatının, 12 farklı altkültürünün zamana bağlı olarak gelişmesi Excel (Ver. 14) programı kullanılarak regresyon grafikleri ile gösterilmiştir. Bunların yanı sıra alt kültür formlarının zararlı üzerindeki etkilerin belirlenmesinde SPSS (ver. 17; P<0.01) programı kullanılmış olup, buradaki ortalamaların karşılaştırılmasında yine Tukey (p≤0.01) çoklu karşılaştırma testinden yararlanılmıştır. İlave olarak izolatların zararlı üzerindeki yüzde (%) etkilerinin hesaplanmasında Abbott formülü kullanılmıştır (Abbott, 1925).

### Bulgular ve tartışma

*Beauveria bassiana* izolatlarından hazırlanan 1-12 altkültür formlarının miselyum gelişimleri yedi gün süre ile ölçülmüş ve sonuçlarda diğer altkültür formlarını temsilen 1., 5., 8. ve 12. altkültürlerin miselyum gelişimleri verilmiştir.

*Beauveria bassiana* BMAUM-E2001 izolatında bir ile yedi günler arasında her altkültürün miselyum gelişiminde istatistiki olarak fark gözlenmiştir. Miselyum gelişimi günlere bağlı olarak oldukça hızlı gerçekleşmiş ve yedinci günde miselyum ölçümleri tamamlanmıştır (Çizelge 2). BMAUM-E2001 izolatından hazırlanan 1-12 altkültür formlarının miselyum gelişimi zamana bağlı olarak doğrusal bir eğim

*Beauveria bassiana* izolatlarının altkültür formlarının etkinlikleri

göstermiştir. Bu izolatın 1. altkültürden 12. altkültüre kadar miselyum gelişimi günlere göre değerlendirildiğinde istatistiki olarak fark gözlenmiştir. Miselyum gelişimi, yedinci günde 1. altkültürden 11. altkültüre doğru artış göstermiş fakat 12. altkültürde bu değer düşmüştür (Çizelge 2).

Çizelge 2. *Beauveria bassiana* BMAUM-E2001 izolatından hazırlanan 1-12 altkültür formlarının günlere bağlı olarak miselyum gelişimleri (ortalama±standart hata)

Table 2. Mycelium development of 1-12 subculture forms of *Beauveria bassiana* BMAUM-E2001 isolate depending on the days (mean ± standard error)

Alt kültür	Miselyum koloni gelişimi <sup>a</sup> [Çap (mm)]						
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	4. Gün	5. Gün	6. Gün	7. Gün
1	1.1±0.1 gA	2.4±0.4 fA	3.7±0.3 eA	5.1±0.3 dA	6.8±0.2 cA	8.4±0.3 bA	9.5±0.4 aA
5	2.5±0.3 gB	3.5±0.4 fB	5.0±0.4 eB	6.7±0.3 dB	8.4±0.2 cB	10.3±0.3 bB	12.0±0.8 aB
8	2.6±0.2 gB	4.2±0.1 fC	5.8±0.3 eC	7.4±0.4 dC	11.4±0.5 cC	13.7±0.6 bC	15.5±0.4 aD
12	1.9±0.2 fC	3.2±0.2 fB	5.1±0.5 eB	6.9±0.4 dBC	8.9±0.8 cBC	10.6±0.6 bB	13.3±1.0 aC

<sup>a</sup> Farklı küçük harf içeren satırlardaki ortalamalar arasında Tukey testine göre istatistiki olarak önemli bir fark vardır (n=20, P>0.05). Farklı büyük harf içeren sütunlardaki ortalamalar arasında Tukey testine göre istatistiki olarak önemli bir fark vardır (n=20, P>0.05).

*Beauveria bassiana*'nın diğer izolatlarında da aynı şekilde her bir altkültürde günlere bağlı olarak miselyum gelişiminde doğrusal bir büyüme gözlenmiş ve günler arasında miselyum gelişimi bakımından istatistiki olarak fark bulunmuştur. Günlere bağlı olarak miselyum gelişimi ve miselyum kolonilerinin çap (mm) ölçümlerine göre gelişimi *B. bassiana* BMAUM-E2003 izolatı için Çizelge 3'de, *B. bassiana* BMAUM-E6001 izolatı için çizelge 4'de, *B. bassiana* BMAUM-M6001 izolatı için Çizelge 5'de verilmiştir.

*Beauveria bassiana* izolatlarının 1., 5., 8. ve 12. altkültür formları *S. littoralis* larvalarını enfekte etmiş ve ölü larvalar üzerinde miselyum ve spor gelişimi gözlenmiştir. *Beauveria bassiana* BMAUM-E2001 izolatı 1. altkültür formunun *S. littoralis* larvaları üzerindeki etkisi altıncı günde %16.7 oranı ile oldukça düşük olarak gözlenmesinin (Çizelge 6) yanında 5., 8. ve 12. altkültür formlarında altıncı günde sırası ile %93.3, %83.3 ve %100 oranında ölüme neden olarak (Çizelge 6) diğer izolatlar ile istatistiki olarak aynı bulunmuştur. Diğer *B. bassiana* izolatları BMAUM-E2003 (Çizelge 7), BMAUM-E6001 (Çizelge 8), BMAUM-M6001 (Çizelge 9) 1. altkültür formunda dördüncü günde %100 ölüme neden olarak oldukça etkili bulunmuşlardır. Bu izolatların 5., 8. ve 12. altkültür formlarında %100 ölümler beşinci günde gözlenmiştir (Çizelge 7, 8, 9).

Çizelge 3. *Beauveria bassiana* BMAUM-E2003 izolatından hazırlanan 1-12 altkültür formlarının günlere bağlı olarak miselyum gelişimleri (ortalama ± standart hata)Table 3. Mycelium development of 1-12 subculture forms of *Beauveria bassiana* BMAUM-E2031 isolate depending on the days (mean ± standard error)

Alt kültür	Miselyum koloni gelişimi <sup>a</sup> [Çap (mm)]						
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	4. Gün	5. Gün	6. Gün	7. Gün
1	1.5±0.2	3.9±0.1	6.1±0.2	8.7±0.4	11.0±0.4	15.7±0.4	20.4±1.5
	fA	efB	deA	cdA	cA	bB	aB
5	1.2±0.1	3.3±0.1	5.8±0.4	8.5±0.6	11.6±0.9	14.8±0.9	17.9±0.9
	fA	efA	deA	dA	cA	bB	aB
8	1.3±0.2	3.2±0.2	5.7±0.5	7.6±0.5	9.7±0.7	11.6±0.7	13.2±0.5
	eA	eA	dA	cdA	bcA	abA	aA
12	2.4±0.3	3.9±0.3	5.6±0.2	7.9±0.2	10.5±0.4	12.5±0.3	17.4±0.9
	gB	fB	eA	dA	cA	bA	aB

<sup>a</sup> Farklı küçük harf içeren satırlardaki ortalamalar arasında Tukey testine göre istatistikî olarak önemli bir fark vardır (n=20, P>0.05). Farklı büyük harf içeren sütunlardaki ortalamalar arasında Tukey testine göre istatistikî olarak önemli bir fark vardır (n=20, P>0.05).

Çizelge 4. *Beauveria bassiana* BMAUM-E6001 izolatından hazırlanan 1-12 altkültür formlarının günlere bağlı olarak miselyum gelişimleri (ortalama ± standart hata)Table 4. Mycelium development of 1-12 subculture forms of *Beauveria bassiana* BMAUM-E6001 isolate depending on the days (mean ± standard error)

Alt kültür	Miselyum koloni gelişimi <sup>a</sup> [Çap (mm)]						
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	4. Gün	5. Gün	6. Gün	7. Gün
1	2.1±0.2	4.1±0.3	8.7±0.4	11.4±0.6	14.7±0.4	17.8±0.4	21.4±0.6
	gA	fA	eB	dB	cC	bB	aB
5	2.5±0.2	4.9±0.5	7.0±0.2	9.6±0.2	13.1±0.4	17.6±0.4	20.2±0.4
	gA	fA	eA	dA	cB	bB	aB
8	2.5±0.4	4.1±0.5	6.2±0.5	8.9.0±0.3	12.0±0.2	15.9±0.2	18.3±0.2
	gA	fA	eA	dA	cA	bA	aA
12	2.8±0.3	4.9±0.2	8.3±0.3	11.2±0.7	15.2±0.3	18.2±0.4	20.3±0.3
	gA	fA	eB	dB	cC	bB	aB

\* Farklı küçük harf içeren satırlardaki ortalamalar arasında Tukey testine göre istatistikî olarak önemli bir fark vardır (n=20, P>0.05). Farklı büyük harf içeren sütunlardaki ortalamalar arasında Tukey testine göre istatistikî olarak önemli bir fark vardır (n=20, P>0.05).

*Beauveria bassiana* izolatlarının altkültür formlarının etkinlikleri

Çizelge 5. *Beauveria bassiana* BMAUM-M6001 izolatından hazırlanan 1-12 altkültür formlarının günlere bağlı olarak miselyum gelişimleri (ortalama ± standart hata)  
Table 5. Mycelium development of 1-12 subculture forms of *Beauveria bassiana* BMAUM-M6001 isolate depending on the days (mean ± standard error)

Alt kültür	Miselyum koloni gelişimi <sup>a</sup> [Çap (mm)]						
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	4. Gün	5. Gün	6. Gün	7. Gün
1	3.0±0.3 gB	5.6±0.3 fA	7.6±0.1 eB	9.7±0.1 dA	12.6±0.1 cA	17.3±0.1 bB	20.1±0.1 aB
5	3.6±0.1 gC	5.8±0.1 fB	7.9±0.4 eB	11.1±0.5 dB	14.8±0.6 cB	17.1±0.5 bB	19.4±0.7 aAB
8	1.5±0.2 gA	5.6±0.3 fA	7.9±0.3 eB	10.6±0.2 dB	14.5±0.8 cB	17.0±0.9 bB	19.6±0.6 aAB
12	3.0±0.2 gB	4.8±0.4 fA	6.4±0.4 eA	8.7±0.4 dA	11.5±0.2 cA	14.4±0.6 9 bA	17.8±0.8 aA

\* Farklı küçük harf içeren satırlardaki ortalamalar arasında Tukey testine göre istatistikî olarak önemli bir fark vardır (n=20, P>0.05). Farklı büyük harf içeren sütunlardaki ortalamalar arasında Tukey testine göre istatistikî olarak önemli bir fark vardır (n=20, P>0.05).

Çizelge 6. *Beauveria bassiana* BMAUM-E2001 izolatının 1., 5., 8. ve 12. altkültür formlarının *Spodoptera littoralis* larvalarına farklı günlerdeki etkileri (Spor konsantrasyonu 1000 spor/mm<sup>2</sup>)

Table 6. The effects of the *Beauveria bassiana* BMAUM-E2001 1<sup>st</sup>, 5<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> subculture forms on *Spodoptera littoralis* larvae on different days (Spore concentration 1000 spore/mm<sup>2</sup>)

Altkültür formları	Günler (% ölüm oranları ± SH)					
	1. Gün <sup>a</sup>	2. Gün <sup>a</sup>	3. Gün <sup>a</sup>	4. Gün <sup>a</sup>	5. Gün <sup>a</sup>	6. Gün <sup>a</sup>
1. Alt kültür	0.0±0.0 a	3.3±3.3 A	6.7±4.2 a	10.0±4.5 a	10.0±4.5 a	16.7±6.2 a
5. Alt kültür	0.0±0.0 a	3.3±3.3 A	51.7±13.3 b	86.7±13.3 3 c	90.0±10.0 c	93.3±6.7 bc
8. Alt kültür	0.0±0.0 a	0.0±0.0 A	10.8±4.9 a	24.2±6.1 ab	65.8±3.8 b	83.3±6.2 b
12. Alt kültür	0.0±0.0 a	6.7±4.2 A	16.7±6.2 a	40.0±5.2 b	76.7±6.2 b	100.0±0.0 c

<sup>a</sup> Her sütundaki aynı harfler istatistikî olarak benzer (P>0.05, t-test), farklı harfler istatistikî olarak farklı olduklarını belirtmektedir (P<0.05, t- test).

Zararlı böcek popülasyonunu kontrol altında tutan önemli biyolojik mücadele etmenlerinden biri olan entomopatojen funguslar Noctuidae familyasına bağlı birçok türün mücadelesinde de etkili oldukları bilinmektedir (Asi et al., 2013). Bu entomopatojen fungusların özellikle de *B. bassiana*'nın mikrobiyal insektisit olarak kullanılma potansiyelleri ile ilgili araştırmalar ve çalışmalar bulunmaktadır (Asi et al., 2013; Gül et al., 2014; Hajjar et al., 2015; Er et al., 2016; Cırbın et al., 2017, Kılıç et al., 2019). Entomopatojen funguslar kimyasal insektisitler kadar kısa sürede etkili olmadıkları için kimyasal mücadelenin tamamen yerini almaları uzak bir ihtimaldir. Bundan dolayı mikrobiyal insektisit olarak seçilecek fungusların pestisit



toleransları yüksek olmalı, virülanslarını kaybetmemeli ve ürün yetiştirme sisteminde canlı kalabilmelidir.

Çizelge 7. *Beauveria bassiana* BMAUM-E2003 izolatının 1., 5., 8. ve 12. altkültür formlarının *Spodoptera littoralis* larvalarına farklı günlerdeki etkileri (Spor konsantrasyonu 1000 spor/mm<sup>2</sup>)

Table 7. The effects of the *Beauveria bassiana* BMAUM-E2003 1<sup>st</sup>, 5<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> subculture forms on *Spodoptera littoralis* larvae on different days (Spore concentration 1000 spore/mm<sup>2</sup>)

Altkültür formları	Günler (% ölüm oranları ± SH)					
	1. Gün <sup>a</sup>	2. Gün <sup>a</sup>	3. Gün <sup>a</sup>	4. Gün <sup>a</sup>	5. Gün <sup>a</sup>	6. Gün <sup>a</sup>
1. Alt kültür	0.0±0.0 a	33.3±11.2 A	90.0±6.8 b	100.0±0.0 b	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
5. Alt kültür	3.3±3.3 a	20.0±12.6 A	83.3±10.8 b	93.3±4.2 b	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
8. Alt kültür	6.7±4.2 a	17.5±6.3 A	37.5±5.7 a	75.0±7.2 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
12. Alt kültür	13.3±4.2 b	23.3±6.2 A	50.0±6.8 a	73.3±6.7 a	96.7±3.3 a	100.0±0.0 a

<sup>a</sup> Her sütündeki aynı harfler istatistikî olarak benzer (P>0.05, t-test), farklı harfler istatistikî olarak farklı olduklarını belirtmektedir (P<0.05, t-test).

Entomopatojen fungusların birçok türü zararlı böceklerin mücadelesinde kullanılmak üzere biyopestisit olarak ticarileştirilmiştir. Fungal biyopestisitlerin kitlesel üretiminde fungusların zararlılara karşı etkili olmalarının yanında in vitro koşullarda devamlı olarak altkültüre alındıklarında virülanslarını korumaları da oldukça önemlidir. Birçok entomopatojen fungus türleri yapay besiyeri ortamında birkaç defa kültüre alındıklarında spor üretimini yada virülanslarını kaybetme eğilimindedirler. Fenotipik dejenerasyon, fenotipik instabilite, fenotipik bozulma, ve zayıflama gibi terimlerle tanımlanan bu durum (İbrahim et al., 2002; Ryan et al., 2001) özellikle biyoinsektisit üreten firmalar için büyük sorun teşkil etmektedir.

Ülkemiz topraklarından izole edilen ve etkinliği *Galleria mellonella* (Baydar et al., 2016) ve *S. littoralis* larvaları (Cırbın et al., 2017) üzerinde test edilen dört *B. bassiana* izolatının in vitro koşullarda 12 defa altkültüre alındıktan sonra herbir altkültürün *S. littoralis* larvaları üzerindeki etkileri ve miselyum gelişimleri belirlenmiş ve kayda değer sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan BMAUM-E2003, BMAUM-E6001 ve BMAUM-M6001 *B. bassiana* izolatları 1., 5., 8. ve 12. altkültür formlarında virülanslıklarını kaybetmemişler ve üçüncü günden sonra %90 oranında ölüme neden olmuşlardır. Aynı şekilde miselyum gelişimi bakımından herhangi bir kayıp gözlenmemiştir. BMAUM-E2001 izolatı ise 1. altkültür formunda hem virülansı hemde miselyum gelişimi bakımından etkisi düşük olmuş fakat diğer altkültür formlarında virülansı ve miselyum gelişimi artmıştır. Bu artış diğer izolatların gösterdikleri ölüm ve miselyum gelişiminden daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu izolatın 1. altkültür formunda gözlenen bu durum böcekten izolasyon yapılırken deneysel bir hata olabileceği gibi altıncı günde rapor edilen ölüm oranlarından dolayı virülansı düşük bir izolat olabilir. Önceki çalışmalarda gözlemlenen bulgularda bazı izolatlar, 1. veya 3. alt kültüre alındıktan sonra etkinliğini kaybederken (Nagaich, 1973) diğer izolatlar ise 10-12 defa alt kültüre

*Beauveria bassiana* izolatlarının altkültür formlarının etkinlikleri

alındıktan sonra virülansında düşüş gözlemlenmiştir (Morrow et al., 1989; Hajek et al., 1990). Bunun tersine birçok çalışmada birçok alt kültüre alınan izolatların virülansında herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Hall, 1980; Brownbridge et al., 2001).

Çizelge 8. *Beauveria bassiana* BMAUM-E6001 izolatının 1., 5., 8. ve 12. altkültür formlarının *Spodoptera littoralis* larvalarına farklı günlerdeki etkileri (Spor konsantrasyonu 1000 spor/mm<sup>2</sup>)

Table 8. The effects of the *Beauveria bassiana* BMAUM-E6001 1<sup>st</sup>, 5<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> subculture forms on *Spodoptera littoralis* larvae on different days (Spore concentration 1000 spore/mm<sup>2</sup>)

Altkültür formları	Günler (% ölüm oranları ± SH)					
	1. Gün <sup>a</sup>	2. Gün <sup>a</sup>	3. Gün <sup>a</sup>	4. Gün <sup>a</sup>	5. Gün <sup>a</sup>	6. Gün <sup>a</sup>
1. Alt kültür	0.0±0.0 a	36.7±9.5 b	86.7±8.4 b	100.0±0.0 b	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
5. Alt kültür	0.0±0.0 a	82.5±9.6 c	95.8±4.2 b	100.0±0.0 b	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
8. Alt kültür	3.3±3.3 a	3.3±3.3 a	54.2±7.8 a	71.7±7.8 a	96.7±3.3 a	100.0±0.0 a
12. Alt kültür	0.0±0.0 a	23.3±6.2 ab	63.3±6.2 a	93.3±4.2 b	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a

<sup>a</sup> Her sütündeki aynı harfler istatistikî olarak benzer (P>0.05, t-test), farklı harfler istatistikî olarak farklı olduklarını belirtmektedir (P<0.05, t-test).

Funguslarda sektorisasyon (spor üretmeyen kültürler) mutasyon sonucu oluşarak oksidatif strese sebep olur ve yaş ile ilgili genlerin işleyişini değiştirir. Sektorisasyon uzun süreli kültürlerde ve entomopatojen funguslarda dâhil olmak üzere ticari ürün haline getirilen funguslarda en önemli problemdir (Ansari & Butt, 2011). Bizim çalışmamızda yapılan altkültür formlarında sektorisasyon oluşumu gözlenmemiştir.

BotaniGard ve Mycotrol ticari ürünlerindeki *B. bassiana* GHA ırkının in vitro koşullarında tekrarlanan alt kültürlerinin virülensiliğini değerlendiren Brownbridge et al. (2001) entomopatojen fungusun virülanslığını ve morfolojik karakterleri üzerine in vitro koşullarında tekrarlanan alt kültürlerinin etkisi, izolatlar ve türler arasında oldukça çeşitlilik gösterdiğini belirtmiştir. Ryan et al. (2002) *M. anisopliae* izolatının alt kültürlerinde oldukça sık gözlenen sektor (sector) oluşumu ile birlikte sekonder metabolitler ve enzim üretme yeteneğinde değişiklikler gözlemlenmiş ve biyoinsektisit olarak kullanılacak entomopatojen fungusların stabil olması ve endüstriyel boyutta yapılacak üretimlerde dejenere olmuş alt kültürlerden örnek alınmamasını vurgulamıştır. Ansari & Butt (2011), *Metarhizium anisopliae*'ya ait ticari olarak kullanılan iki farklı izolatın in vitro koşullarda farklı iki besiyeri ortamında altkültürlere alarak raf ömürlerini incelemişler Basmati pirinç üzerinde geliştirilen altkültürlerin istikrarını kaybetmediğini, *Tenebrio molitor*'a karşı uygulandığında ölü böceklerin üzerinde konidyumlarında artış gözlemlendiğini ve raf ömrünün arttığını bildirmişlerdir.

Çizelge 9. *Beauveria bassiana* BMAUM-M6001 izolatının 1., 5., 8. ve 12. altkültür formlarının *Spodoptera littoralis* larvalarına farklı günlerdeki etkileri (Spor konsantrasyonu 1000 spor/mm<sup>2</sup>)

Table 9. The effects of the *Beauveria bassiana* BMAUM-M6001 1<sup>st</sup>, 5<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> subculture forms on *Spodoptera littoralis* larvae on different days (Spore concentration 1000 spore/mm<sup>2</sup>)

Altkültür formları	Günler (% ölüm oranları ± SH)					
	1. Gün <sup>a</sup>	2. Gün <sup>a</sup>	3. Gün <sup>a</sup>	4. Gün <sup>a</sup>	5. Gün <sup>a</sup>	6. Gün <sup>a</sup>
1. Alt kültür	0.0±0.0 a	33.3±8.4 a	90.0±6.8 c	100.0±0.0 b	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
5. Alt kültür	3.3±3.3 ab	75.8±9.5 b	95.8±4.2 c	100.0±0.0 b	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
8. Alt kültür	6.7±4.2 ab	23.3±6.2 a	40.8±4.6 a	68.3±7.5 a	96.7±8.2 a	100.0±0.0 a
12. Alt kültür	13.3±6.7 b	40.0±7.3 a	56.7±3.3 b	90.0±6.8 b	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a

<sup>a</sup> Her sütündeki aynı harfler istatistikî olarak benzer (P>0.05, t-test), farklı harfler istatistikî olarak farklı olduklarını belirtmektedir (P<0.05, t- test).

Entomopatojen fungusların mikrobiyal insektisit olarak tercih edilmeleri için öncelikle pestisit toleransları yüksek olmalı ve kitle üretim sisteminde canlılıklarını devam ettirebilmelidirler. Meydana gelebilecek morfolojik değişiklikler, renk değişimi ve büyüme formunun yanı sıra virülanslığın azalması ticari üretim yapan firmalar için oldukça büyük sorun teşkil etmektedir. Bu çalışmada kullanılan *B. bassiana* izolatları topraktan izole edildikten sonra etkinliği *G. mellonella* (Baydar et al., 2016) ve *S. littoralis* larvaları (Cırbın et al., 2017) üzerinde test edilmiştir. Bir sonraki adım olan bu çalışmada ise alt kültür formları *S. littoralis* larvalarına uygulanmış ve 12. alt kültürde bile virülanslığını kaybetmediği ve besiyeri ortamında gelişimini tamamladığı bulunmuştur. İleriki çalışmalara devam niteliğinde olan bu bulgular, farklı zararlı böceklere ve arazi çalışmalarında takip edilecek yöntemlere öncülük edecektir.

## Teşekkür

Bu çalışma, 4773-YL1-16 No`lu Proje ile Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

## Kaynaklar

- Abbott W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal Economic Entomology*, 18: 265-267.
- Ansari M. A. & T. M. Butt 2011. Effects of successive subculturing on stability, virulence, conidial yield, germination and shelf-life of entomopathogenic fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 110: 1460-1469.
- Anonim 2008. Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Ziraî Mücadele Teknik Talimatları Kitapları, Tahıl Hastalıkları ve Zararlıları, Cilt 1:116-119.

- Aroiee H., S. Mosapoor & H. Karimzadeh 2005. Control of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) by thyme and peppermint. *KMITL Science and Technology Journal*, 5(2): 511-514.
- Asi M. R., M. H. Bashir, K. Zia & M. Akram 2013. Potential of entomopathogenic fungi for biocontrol of *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 23: 913-918.
- Baydar R., Ö. Güven & I. Karaca 2016. Occurrence of entomopathogenic fungi in agricultural soils from Isparta province in Turkey and their pathogenicity to *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *The Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 26 (2): 323-327.
- Beron C. M. & B. M. Diaz 2005. Pathogenicity of hyphomycetous fungi against *Cyclocephala signaticollis*. *BioControl*, 50:143-150
- Brownbridge M., S. Costa & S. T. Jarnonski 2001. Effects of in vitro Passage of *Beauveria bassiana* on virulence to *Bemisia argentifolii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77: 280-283.
- Butt T. M., C. Wang, F. A. Shah & R. Hall 2006. Degeneration of entomogenous fungi. (Ed.: J. Eilenberg & H. Hokkanen, An ecological and societal approach to biological control). *Progress in Biological Control*, Springer, Dordrecht. 213-226.
- Cırbın İ., Ö. Güven & İ. Karaca 2017. Bazı entomopatojen fungusların *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) larvaları üzerine etkilerinin belirlenmesi. *Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpaşa University*, 34 (3): 159-165.
- Delen N., E. Durmuşoğlu, A. Güncan, N. Güngör, C. Turgut & A. Burçak 2005. Türkiye’de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongresi, 3-7 Ocak 2005, Ankara.
- Er K. M. & C. Mart 2009. Kahramanmaraş ilinde belirlenen bazı entomopatojen funguslar ve ilin entomopatojen fungus kullanımı bakımından değerlendirmesi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi*, 12(2): 52-56.
- Er K. M., H. Tunaz, A. A. Isıkber, S. Satar, C. Mart & N. Uygun 2008. Pathogenicity of entomopathogenic fungi to *Coccinella septempunctata* L. (Col.: Coccinellidae) and a survey of fungal diseases of Coccinellids. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 11(1): 118-122.
- Er M. K. 2013. Gaziantep, Adıyaman ve Kahramanmaraş antepfıstığı bahçelerinde bulunan entomopatojen fungusların tespiti. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 4(2): 155-163.
- Goettel M. S. & G. D. Inglis 1997. Fungi: Hyphomycetes. (Ed.: Lacey, L.A., Manual of Techniques in Insect Pathology). Academic Press, San Diego, USA, 213-249.
- Güven Ö., R. Baydar, C. Temel & İ. Karaca 2014. Bazı entomopatojen fungusların *Aphis fabae* (Scopoli) (Hemiptera: Aphididae) üzerine etkileri. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 5(2): 149-158.
- Güven Ö., D. Çayır, R. Baydar & İ. Karaca 2005. Patates böceği [*Leptinotarsa decemlineata* (Say.) (Coleoptera: Chrysomelidae)] üzerine entomopatojen fungus *Beauveria bassiana* izolatlarının etkisi. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 6 (2): 107-116.
- Hajek A. E., R. Humber & M. H. Griggs 1990. Decline in virulence of *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales) with repeated in vitro subculture. *Journal of Invertebrate Pathology*, 56: 91-97.
- Hall R. A. 1980. Effect of repeated subculturing on agar and passaging through an insect host on pathogenicity, morphology, and growth rate of *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 36: 216-222.

- Humber R. A. 1997. Fungi: Identification. (Ed.: L. A. Lacey, Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, San Diego, 153–185.
- Ibrahim L., T. M. Butt & P. Jenkinson 2002. Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 106: 705-715.
- Inglis G. D., M. S. Goettel, T. M. Butt & H. Strasser 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. (Ed.: Butt, T.M., C. Jackson & N. Magan, Fungi as Biocontrol Agents. Progress, Problems and Potential). CABI Publishing, pp. 23–69.
- İzgi Ü. & Ö. Güven 2014. Entomopathogenic fungi isolated from soil samples taken from Başkonuş forestland in Kahramanmaraş. *Bitki Koruma Bülteni*, 54(3): 201-209.
- Kılıç E., Ö. Güven, R. Baydar & İ. Karaca 2019. The mortality effects of some entomopathogenic fungi against *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera littoralis*, *Tenebrio molitor* and *Blattella germanica*. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 25 (1): 33-37.
- Kılınçer N., A. Yiğit, C. Kazak, M. K. Er, A. Kurtuluş & N. Uygun 2010. Teoriden pratiğe zararlılarla biyolojik mücadele. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 1: 15-59.
- Koz C. & Ö. Güven, 2014. Entomopathogenic fungi isolated from wheat fields in villages of Kahramanmaraş city center. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 5(1): 39-51.
- Morrow B. J., D. G. Boucias & M. A. Heath 1989. Loss of virulence in an isolate of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi* after serial in vitro passage. *Journal of Economical Entomology*, 82: 404-407.
- Nagaich B. B. 1973. Verticillium species pathogenic on aphids. *Indian Pathology*. 26: 163-165.
- Öztürk H. E., Ö. Güven & İ. Karaca 2005. Effects of some bioinsecticides and entomopathogenic fungi on colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* L.). *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, Ghent University*, 80 (2): 205-211.
- Ryan M. J., P. D. Bridge, D. Smith & P. Jeffries 2002. Phenotypic degeneration occurs during sector formation in *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 163-168.
- Saidy M. F. E., M. Auda & D. Degheele 1989. Detoxification mechanisms of diflubenzuron and teflubenzuron in the larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 35: 211-222.
- Samson R. A., H. C. Evans & J. P. Latge 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer-Verlag, New York, 187 pp.
- Samson R. A. 1974. Paecilomyces and some allied Hypomycetes. *Study of Entomology*, 6: 1-119.
- Sevim A., I. Demir, M. Höfte, R. A. Humber & Z. Demirbağ 2009. Isolation and characterization of entomopathogenic fungi from hazelnut-growing region of Turkey. *BioControl*, 55, 279-297.
- Wang C., T. Butt, & R. J. Leger 2005. Colony sectorization of *Metarhizium anisopliae* is a sign of ageing. *Microbiology*, 151(10): 3223-3236.
- Zimmermann G. 1986. The 'Galleria bait method' for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology*, 102: 213-215.
- Zimmermann G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17: 553-59.