

*Orijinal araştırma (Original article)*

**Entomopatojen fungus *Beauveria bassiana*'nın çam keseböceği (*Thaumetopoea wilkinsoni* Tams)'nin farklı dönemlerine etkileri<sup>1</sup>**

Sezer GÖK<sup>2</sup>, Özlem GÜVEN<sup>3\*</sup>, İsmail KARACA<sup>2</sup>

**Effects of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on different stages of the pine processionary moth (*Thaumetopoea wilkinsoni* Tams)**

**Abstract:** In this study, local isolates (from Isparta) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vull. (BMAUM M6-4 and LD.2016) and BMAUM M6-4 were tested on second instar and late instar larvae of the pine processionary moth, respectively, under both laboratory and field conditions. The fungal isolates were tested on the second instar larvae at a concentration of 10<sup>7</sup> conidia/ml by dipping the pine leaves or spraying directly on larvae. For the late instar larvae under laboratory conditions, the fungal isolates were applied to the soil or spraying directly on the insect before the pupal stage. Under field conditions, larvae were collected with a special trap set up on pine trees and the isolates were applied to the soil or sprayed directly on the larvae.

The second instar larvae were highly susceptible to the fungal isolates and 100% fungal infection was observed, at the latest, 5 days after application. The *Beauveria bassiana* BMAUM M6-4 isolate was used only on last instar larvae due to the observation of 100% infection on the third day after fungus application. The 100% infection value observed in the late instar larvae under laboratory conditions was determined as 75% and 93% for the direct fungus application to the soil and the insect under field conditions. In conclusion, local isolates of *B. bassiana* were determined to cause infection on early and late larval stages of the pine processionary moth. More detailed studies on the effectiveness of this isolate are needed under field conditions.

**Key words:** Biological control, pine processionary moth, entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*

<sup>1</sup>Bu çalışma Yüksek lisans tezinin bir bölümüdür.

<sup>2</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 32100, Isparta

<sup>3</sup> Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 46040, Kahramanmaraş

\*Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: [okalkar@hotmail.com](mailto:okalkar@hotmail.com)

Alınış (Received): 27.09.2017 Kabul ediliş (Accepted): 06.03.2018

**Öz:** Bu çalışmada yerel olarak izole edilen entomopatojen fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vull. izolatlarının (BMAUM M6-4 ve LD.2016) laboratuvar koşullarında çam keseböceğinin ikinci dönem larvalarına ve BMAUM M6-4 izolatının son dönem larvalarına arazi ve laboratuvar koşullarında etkisi belirlenmiştir. Fungal izolatlar ikinci dönem larvalara  $10^7$  konidi/ml konsantrasyonunda çam yapraklarını daldırma ve larvalara direkt püskürtme yöntemleri ile denenmiştir. Son dönem larvalara laboratuvar koşullarında toprak içine fungus uygulaması ve pupa dönemine geçmeden böcek üzerine fungus uygulaması yapılmıştır. Arazi koşullarında çam ağaçlarına kurulan özel tuzaklar sayesinde toplanan son dönem larvalara yine toprak içine ve böcek üzerine entomopatojen fungus sporları uygulanmıştır.

Çalışma sonucunda, ikinci dönem larvaların entomopatojen fungus izolatlarına karşı oldukça hassas oldukları gözlenmiş ve uygulamadan en geç beş gün sonra %100 fungal enfeksiyonu ile ölüm belirlenmiştir. *Beauveria bassiana* BMAUM M6-4 izolatı özellikle böcek üzerine fungus uygulamasında üçüncü günde %100 enfeksiyona sebep olduğundan son dönem larvalara sadece bu izolat kullanılmıştır. Son dönem larvaların laboratuvar koşullarında gözlemlenen %100 enfeksiyon değeri, arazi koşullarında toprağa ve böceğe direkt fungus uygulamasında %75 ve %93 olarak belirlenmiştir. Lokal olarak izole edilen *B. bassiana* izolatı, çam keseböceğinin erken dönem ve son dönem larvalarında enfeksiyona neden olup arazi koşullarında uygulanmasının ümitvar olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyolojik mücadele, çam kese böceği, entomopatojen fungus, *Beauveria bassiana*

## Giriş

Yaşam için hayati önemi olan ormanları ateş, kirlilik, istilacı türler, böcekler ve hastalıklar gibi olumsuzluklardan korumak kritik öneme sahiptir. Orman ve orman sektörü üzerinde zararlı böceklerin, hastalıkların ve diğer biyotik etmenlerin önemli etkileri bulunmaktadır. Orman ekosistemlerinin ayrılmaz parçaları olmasına rağmen böcekler ve hastalıklar orman sağlığı ve orman dışındaki ağaçların ve diğer ağaçlık arazilerin üzerinde önemli etkileri vardır. Ormanları böcek zararlılarına ve hastalıklarına karşı koruma tedbirleri sürdürülebilir orman yönetiminin ayrılmaz bir parçasıdır (FAO 2009).

*Thaumetopoea* cinsine bağlı çam keseböceği (*T. wilkinsoni* Tams. ve *T. pityocampa* Schiff) Akdeniz ormanları çam ağaçlarında önemli zararlı böceklerdir (Salvato et al. 2002). Türkiye’de yaşayan çam keseböceği önceden Avrupa ve Kuzey Batı Afrika’da olduğu gibi *T. pityocampa* olarak sınıflandırılırken, Simonato et al. (2007) tarafından yapılan çalışmada Türkiye’nin Kuzey ve Güneyindeki çam keseböceği’nin, *Thaumetopoea wilkinsoni* olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *T. wilkinsoni* Türkiye’nin kuzey, güney ve batısında, *T. pityocampa*’nın ise Trakya Bölgesi’nde daha yaygın olduğu görülmektedir. Ancak, bu iki tür birbirlerinin buldukları bölgelerde de görülmektedir (İpekdağ et al. 2015).

Yaprak zararlısı olan çam keseböceği, epidemi halinde zarar yaptığında ağaçlarda büyük kayıplara neden olur. Çam keseböceğinin 4. ve 5. larva dönemlerinde beslenme ihtiyacının artması ile zarar miktarında da artış olur. Zararın en yüksek olduğu evre ise son larva dönemidir (Devkota & Schmidt 1990). Zarar gören yapraklar fotosentez işlevini gerçekleştiremez ve ağacın büyüme ve gelişmesinde aksaklıklar meydana gelir. Piknik ve yerleşim alanlarında çam keseböceğinin bulunması, çam yapraklarında ciddi bozulmalara ve bundan dolayı daha fazla bakım maliyetine neden olmaktadır. Ağaçlara verdiği zararın yanında 3. dönemden başlayarak 4. ve 5. dönem larvalarında görülen, insan ve evcil hayvanlarda cilt tahrişlerine, konjunktivit, solunum sıkışıklığı ve astıma neden olan kaşıntıya tüyler bulunmaktadır (Vega et al. 1999). Yıl boyunca ölü larvalara, kozalara, yuvalara ve böcek istila olmuş çam ağacı döküntüleri ile temas etmek deri iltihabına neden olabilmektedir (FAO 2009). Bu sorun sadece eğlence ve yerleşim alanlarını etkilememekte aynı zamanda ağaçlandırma çalışmaları ve ormanlarda otlatmayı da zorlaştırmaktadır.

Çam keseböceği ile mücadelede mekanik (Çanakçıoğlu & Mol 1998; Avcı et al. 2011), kimyasal (Robredo 1980; Robredo & Obama 1991), kültürel ve biyolojik (Montoya, 1988; Onaran & Kati 2010) yöntemler kullanılmaktadır. Kimyasal ilaçların kullanımındaki uygulama zorluklarının yanı sıra çevreye ve hedef olmayan canlılara olan olumsuz etkileri alternatif mücadele yöntemlerini ön plana çıkarmıştır.

Entomopatojen funguslar, tarım ve orman zararlısı böceklerde en yaygın hastalık etmeni patojenlerdendir (Mueller & Schmit 2007). Uygun ortam koşullarında fungal hastalıkların görülmesi epizootiğe yol açar ve buna bağlı olarak zararlı böcek popülasyonlarında azalma görülür (Lacey & Goettel 1995). Diğer patojenlerden farklı olarak, funguslar, zararlıyı integüment yoluyla enfekte etmesinden dolayı böceğin beslenmediği evrelerde (son larva ve pupa) önemli mücadele etmenleri olarak kullanılırlar. Entomopatojen fungus enfeksiyonundan ölen böcekler çoğunlukla buldukları bitki üzerinden toprağa düştükleri için, toprak ortamı, önemli fungus rezervini oluşturur ve fungus sporlarını abiyotik ve biyotik faktörlerden koruyarak canlılıklarını uzun süre muhafaza etmelerini sağlar. Tarımsal ekosistemlerde toprakta çok sık rastlanan *Beauveria bassiana* ve *Metarhizium anisopliae* geniş konukçu aralığına sahip entomopatojen funguslardır (Goettel et al. 2005)

Zararlılarla mücadelede esas olan zararlının sebep olduğu zararı minimuma indirmektedir. Bunun için de böceğin erken veya son dönemlerinin hedef alınması önemlidir. Çam keseböceğinin mücadelesinde güvenli biyolojik mücadele stratejileri geliştirmek için bakteri (İnce et al., 2008; Kati et al., 2010), virüs (İnce et al., 2007) ve entomopatojen fungus (Şahin 2006; Er et al. 2007; Sevim et al. 2010; Aydın 2016; Sönmez et al. 2017) kullanımını araştıran çeşitli çalışmalar bulunmaktadır.

Genellikle zararlının larva dönemlerini hedef alan entomopatojen fungus çalışmalarında *B. bassiana* ve *M. brunneum*'un etkili olduğu belirlenmiştir (Sönmez et al. 2017). Bu çalışmada Isparta ili topraklarından izole edilen ve ön patojenite testi ile etkinliği belirlenen *B. bassiana*'nın çam keseböceğinin ikinci dönem larvalarına laboratuvar koşullarında, beşinci dönem larvalarına arazi ve laboratuvar koşullarında uygulanarak etkinliği belirlenmiştir.

## Materyal ve Yöntem

### Böcek kültürü ve fungal izolatlar

Çalışmada kullanılan çam keseböceği larvaları Isparta-Barla yolu üzerindeki kızılçam ormanından toplanmış ve arazi çalışmaları yine bu bölgede yürütülmüştür.

Entomopatojen fungus *Beauveria bassiana* izolatlarından BMAUM M6-4 Isparta ili tarım arazisinden alınan toprak örneğinden (Baydar et al. 2016), LD.2016 Süleyman Demirel Üniversitesi kampüsünden toplanan *Leptinotarsa decemlineata*'dan izole edilmiş ve çeşitli kaynaklar kullanılarak teşhisleri yapılmıştır (Goettel & Inglis 1997; Humber 1998) (Çizelge 1).

**Çizelge 1.** Entomopatojen fungus izolatları ve orijinleri

**Table 1.** Entomopathogenic fungus isolates and their origins

Entomopatojen izolatları	fungus	Konukçusu	Coğrafik orijini
<i>Beauveria bassiana</i> LD. 2016		<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (Coleoptera: Chrysomelidae)	Isparta
<i>Beauveria bassiana</i> BMAUM M6-4		Toprak	Isparta

### Spor süspansiyonu hazırlanması ve sporların çimlenme testi

Funguslar, Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyerinde  $25\pm 2$  °C'de karanlıkta inkübe edilmiş ve ekimden 10 gün sonra gelişen sporlar toplanarak %0.3 Tween 80 içeren 20 ml saf steril su (dH<sub>2</sub>O) içeresine eklenerek spor süspansiyonları hazırlanmıştır. Uygulama yapılmadan önce her bir izolatin, spor çimlenme değerleri belirlenmiştir. Seyreltme yapılmış ( $10^{-2}$ ) spor süspansiyonundan 100 µl üç adet PDA içeren Petri kabı üzerine yayılarak 25 °C'de karanlıkta inkübe edilmiştir. Sporların çimlenme değerleri 24 saat sonra gözlenerek her bir Petri kabında 100 spor sayılmış ve her bir izolat için spor çimlenme değeri %90'ı geçen kültürler kullanılmıştır.

Hazırlanan süspansiyondan spor yoğunluğunun hesaplanabilmesi için  $10^{-2}$  seyreltme yapılarak Thoma lamı ve Işık mikroskobu yardımıyla sayım yapılmış ve her bir fungus izolatu için  $10^7$  konidi/ml yoğunlukta spor süspansiyonları hazırlanmıştır.

### **Entomopatojen fungusların ikinci dönem larvalara etkilerinin belirlenmesi**

Çam keseböceği larvaları yumurta döneminde toplanmış ve laboratuvar koşullarında tutularak ikinci dönem evresine girdiklerinde denemelerde kullanılmıştır. Larvalar denemelerden önce yaklaşık bir saat aç bırakılmıştır. Denemede kullanılan çam yaprakları saprofit fungus gelişimlerini önlemek amacıyla 2 dakika %1'lik sodyum hipoklorit ve 1 dakika %70'lik etanole daldırılmış ve daha sonrasında ise 3 kez steril saf su ile yıkanarak dezenfekte edilmiştir. *Beauveria bassiana* izolatları ikinci dönem larvalarına yaprak daldırma ve püskürtme yöntemi ile uygulanmıştır. Yaprak daldırma yönteminde temiz çam yaprakları içinde fungus sporlarını bulunduran 10 ml  $1 \times 10^7$  konidi/ml süspansiyona beş saniye daldırılmış ve içerisinde nemli kurutma kâğıdı bulunan Petri kaplarına (9 cm) aktarılmıştır. Her Petri kabına iki adet yaprak konulmuş ve on adet ikinci dönem larva kabın ortasına bırakılmıştır. Püskürtme yönteminde ise ayrı bir kap içerisinde yerleştirilen böcekler el püskürtme aleti ile 20 cm uzaklıktan üç defa olacak biçimde  $1 \times 10^7$  konidi/ml spor süspansiyonu püskürtülmüştür. Uygulamanın sonunda 10 adet böcek içerisinde nemli kurutma kâğıdı bulunan Petri kaplarına (9 cm) transfer edilmiştir. Besin ihtiyacını karşılamak amacıyla temiz çam yaprakları eklenmiştir. Kontrol grubuna %0.3 Tween 80 içeren saf su uygulanmıştır. Her deneme beş tekerrür olarak hazırlanmıştır. Larva ölümleri on gün boyunca günlük olarak kontrol edilmiştir. Entomopatojen fungus enfeksiyonunu gözlemek için ölen larvalar nemli ortamda tutulmuştur.

### **Entomopatojen fungusların son dönem larvalara etkilerinin belirlenmesi arazi uygulamasında tuzakların kurulması**

Isparta Barla bölgesi ormanlarında bulunan çam keseböceklerinin toprağa inme zamanı çevre koşullarına bağlı olmakla birlikte genellikle Mayıs ayının ortasında gözlenmektedir. Larvaları yakalamak için kullanılan tuzaklar Nisan ayının sonlarına doğru kurulmuştur. Kalınlığı 3-5 cm olan süngerler, çam ağaçlarının gövdesini saracak şekilde kesilerek ağacın gövdesine yerleştirilmiştir. Süngerin ortasına 30 cm uzunluğunda ve 4 cm çapında plastik borular yerleştirilmiştir. Ağacın gövdesinden yürüyüşe geçen larvaları toplayan ve boruların içinden geçişini sağlayan sert naylon, huni şeklini oluşturacak biçimde süngere yapıştırılmıştır. Plastik boruların toprağa yakın uç kısmına 5 lt'lik şeffaf ve kalın siyah poşet bağlanarak larvaların poşet içinde toplanması sağlanmıştır. Şeffaf poşetin içine araziden toplanan 2 kg toprak konulmuştur. Entomopatojen fungus, mücadele uygulaması ve laboratuvar denemelerinde kullanılan larvalar için toplamda 17 adet tuzak kurulmuştur.

### **Entomopatojen fungusların uygulanması**

İkinci dönem larvada etkinliği yüksek bulunan *B. bassiana* (BMAUM-M6-4) izolatu kullanılmıştır.

Bu izolat pirinç üzerinde Seema et al. (2013)'de belirtildiği gibi üretilmiştir. Spor sayımı için 1 gr fungus içeren pirinç 10 ml %0.3'lük Tween 80'li su içinde karıştırılarak stok solüsyonu hazırlanmış ve bu stok solüsyonundan  $10^2$  seyreltme yapılarak Thoma lamı ile spor sayımı yapıp konsantrasyonu  $3.9 \times 10^9$  konidi/ml olarak belirlenmiştir.

Entomopatojen fungusun toprağa yürüyüş yapan larvalara uygulanması iki yöntem ile yapılmıştır. Birinci yöntemde toprak içinde bulunan entomopatojen fungusun, larvaların pupa oluşturmalarına etkisini belirlemek için pirinç inokulumdan 17.5 gr tartılarak 2 kg toprak ile karıştırılmıştır. Böylece keselerden çıkıp tuzaklar ile yakalanan beşinci dönem larvalar toprak içinde pupa evresine geçerken entomopatojen fungus sporlarına maruz kalmışlardır. İkinci yöntemde tuzaklar içinde boş poşetler içinde yakalanan larvalar toplanıp toprağa konulmadan önce aynı miktarda fungus sporları ile 30 dakika maruz bırakılmış ve sonra içinde 2 kg toprak bulunan poşetler içine konularak birinci yöntemdeki gibi tuzakların olduğu yerde bırakılmıştır. Böylece, toprağa inmeden fungus sporlarına maruz kalan beşinci dönem larvaların toprak içinde pupa evresine geçişinde entomopatojen fungusların etkisi belirlenmiştir. Kontrol gurubu için sadece toprak kullanılmıştır. Her bir uygulama beş tekrardan (tuzak) oluşmuştur. Tuzakların kurulduğu ağaçlarda çam keseböceği keselerinin sayısı farklı olduğu için tuzaklara inen böcek sayısı değişkenlik göstermiştir. Uygulama yapılan larvalar arazi koşullarında 10 gün bırakılmış ve sonra laboratuvara getirilerek incelenmiştir. Çam keseböcekleri entomopatojen fungus ile enfekte olmuş larva, canlı larva, ipek kozalar içinde enfekte olmuş pupa ve canlı pupa olarak değerlendirilmiştir.

### **Laboratuvar uygulaması**

Çam ağaçlarının gövdesine kurulan tuzaklardan yakalanan beşinci dönem larvalar laboratuvara getirilerek entomopatojen fungusların etkisi belirlenmiştir. Delikli kapakları bulunan plastik kaplara 500 gr steril toprak konulmuştur. *Beauveria bassiana* (BMAUM-M6-4) izolatının pirinç inokulumundan 4.4 gr tartılıp toprağa karıştırılmış ve üzerine 10 adet larva konulmuştur. Larva üzerine fungus uygulamasında ise ayrı bir kap içine alınan 10 adet larva üzerine 4.4 gr tartılan pirinç inokulumu uygulanmış ve 30 dakika funguslu ortamda bekletildikten sonra içinde toprak bulunan plastik kaplar üzerine bırakılmıştır. Kontrol için herhangi bir uygulama yapılmamış ve 10 adet larva toprak üzerine bırakılmıştır. Her bir uygulama beş tekrardan oluşmuştur. Plastik kutular karanlık ortamda 20-25 °C'de muhafaza edilmiş ve uygulamadan 10 gün sonra inceleme yapılmıştır. Çam

keseböcekleri entomopatojen fungus ile enfekte olmuş larva, canlı larva, ipek kozalar içinde enfekte olmuş pupa ve canlı pupa olarak değerlendirilmiştir.

### Verilerin analizi ve değerlendirilmesi

Ölüm oranı Abbott formülü kullanılarak yapılmıştır (Abbott 1925). Elde edilen veriler ANOVA analizine tabi tutulup, Tukey çoklu karşılaştırma testi ile entomopatojen fungusların neden olduğu ölümler ve uygulamalar arasındaki farklar karşılaştırılmıştır. Veriler SPSS 17.0 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir (SPSS Inc., Chicago, IL).

### Bulgular ve Tartışma

*Beauveria bassiana* izolatlarının yaprak daldırma ve böcek püskürtme yöntemleri ile uygulanması sonucunda çam keseböceği ikinci dönem larvaları üzerinde etkili oldukları saptanmıştır (Çizelge 2). *Beauveria bassiana* LD.2016 izolatı ile %100 ölüm yaprak daldırma yönteminde dokuzuncu günde gözlenirken, böcek üzerine püskürtme yönteminde beşinci günde ortaya çıkmıştır. *Beauveria bassiana* BMAUM M6-4 izolatının her iki yöntemde de daha etkili olduğu bulunmuştur. Böcek üzerine püskürtme yöntemi ile üçüncü günde gözlenen %100 ölüm yaprak daldırma yönteminde beşinci günde tespit edilmiştir (Çizelge 2).

**Çizelge 2.** *Beauveria bassiana* LD.2016 ve BMAUM M6-4 izolatlarının çam keseböceği ikinci dönem larvaları üzerine etkileri (Ortalama ± Standart hata)

**Table 2.** Effect of *Beauveria bassiana* LD.2016 and BMAUM M6-4 isolates on the second instar larvae of the pine processionary moth (Mean ± SE)

<i>Beauveria bassiana</i> izolatları	Uygulama Yöntemi	Ölüm oranı (%)*			
		3. gün	5. gün	7. gün	9. gün
LD.2016	Yaprak daldırma	6±0.2 b	16.6±2.2 b	80.3±1.1 a	100±0 a
	Böcek üzerine püskürtme	79.6±1.1 a	100±0 a	100±0 a	100±0 a
BMAUM M6-4	Yaprak daldırma	82±1.1 a	100±0 a	100±0 a	100±0 a
	böcek üzerine püskürtme	100±0 a	100±0 a	100±0 a	100±0 a
Kontrol	Yaprak daldırma	0±0 b	12±3.7 b	12±3.7 b	12±3.7 b
	Böcek üzerine püskürtme	0±0 b	10±3.1 b	10±3.1 b	10±3.1 b

\*Her sütundaki aynı harfler istatistiki olarak benzer ( $P>0.05$ ), farklı harfler istatistiki olarak farklı olduklarını belirtmektedir ( $P<0.05$ ).

Çam keseböceğinin son dönem larvalarına laboratuvar koşullarında farklı iki yöntem ile uygulanan *B. bassiana* BMAUM M6-4 izolatı oldukça etkili olmuş ve

%100 oranında ölüm belirlenmiştir. Uygulama yöntemlerinde fungus enfeksiyonunun gözlemlendiği böceğin dönemlerinde farklılık belirlenmiştir.

Toprağa fungus uygulamasında en yüksek fungus enfeksiyonu oranı ipek koza oluşturmuş pupalarda belirlenirken, toprak içine yürüyüş yapmadan önce böcekler fungus uygulamasında en yüksek enfeksiyon oranı larva döneminde gözlenmiştir (Çizelge 3).

Arazi koşullarında yapılan çalışmada, her iki uygulamada da canlı larvalara rastlanmış ve toprağa fungus uygulamasında %75.2 oranında fungus ile enfeksiyon gözlenirken böceğe fungus uygulamasında bu oran %93 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4). Toprağa fungus uygulamasında entomopatojen fungus ile enfekte olmuş larva ve ipek koza oluşturmuş pupa oranları eşit olarak (ortalama %37) dağılırken bu oran böceğe fungus uygulamasında ipek koza oluşturmuş pupa enfeksiyonuna göre larva fungus enfeksiyonu %74.1 oranı ile daha fazla bulunmuştur (Çizelge 4).

**Çizelge 3.** Çam keseböceği son dönem larvalarına entomopatojen fungus *Beauveria bassiana* BMAUM M6-4 izolatının laboratuvar koşullarında uygulanmasından on gün sonra belirlenen canlı ve ölü larva, pupa ve entomopatojen fungus ile enfekte olmuş larva ve pupa birey sayıları (n=50) (Ortalama  $\pm$  Standart hata)

**Table 3.** Number of alive and dead larvae, pupa and entomopathogenic fungi infected larvae and pupa determined ten days after the application of *Beauveria bassiana* BMAUM M6-4 isolates under laboratory conditions on late instar larvae of the pine processionary moth (Mean  $\pm$  SE)

Uygulama yöntemi	Canlı Larva*	Ölü Larva/Pupa <sup>a*</sup>	Canlı Pupa*	Fungus ile enfeksiyon	
				Larva <sup>*b</sup>	Pupa <sup>*b</sup>
Toprağa fungus uygulaması	0 $\pm$ 0 a	0 $\pm$ 0 a	0 $\pm$ 0 a	3.4 $\pm$ 0.8 bA	6.6 $\pm$ 0.8 bB
Böceğe fungus uygulaması	0 $\pm$ 0 a	0 $\pm$ 0 a	0 $\pm$ 0 a	7.4 $\pm$ 1.4 cA	2.6 $\pm$ 1.4 aB
Kontrol	0 $\pm$ 0 a	2.2 $\pm$ 0.7 b	7.8 $\pm$ 0.7 b	0 $\pm$ 0 a	0 $\pm$ 0 a

<sup>a</sup> Larva ve pupalarda, entomopatojen fungus gelişimi gözlenmeyen ve sebebi bilinmeyen ölümler.

<sup>b</sup> Her satırdaki aynı büyük harfler istatistiki olarak benzer (P>0.05), farklı harfler istatistiki olarak farklı olduklarını belirtmektedir (P<0.05).

\* Her sütündeki aynı küçük harfler istatistiki olarak benzer (P>0.05), farklı harfler istatistiki olarak farklı olduklarını belirtmektedir (P<0.05).

**Çizelge 4.** Çam keseböceği beşinci dönem larvalarına entomopatojen fungus *Beauveria bassiana* BMAUM M6-4 izolatının arazi koşullarında uygulanmasından 10 gün sonra belirlenen canlı, ölü, pupa ve entomopatojen fungus ile enfekte olmuş larva ve pupaların yüzde değerleri (Ort $\pm$  SH)

**Table 4.** Number of alive and dead larvae, pupa and entomopathogenic fungi infected larvae and pupa determined ten days after the application of *Beauveria bassiana* BMAUM M6-4 isolates under field conditions on late instar larvae of the pine processionary moth (Mean  $\pm$  SE)



Uygulama yöntemi	Canlı Larva *	Ölü Larva/Pupa <sup>a</sup>	Canlı Pupa *	Fungus ile enfeksiyon	
				Larva <sup>*b</sup>	Pupa <sup>*b</sup>
Toprağa fungus uygulaması	24.8±4 b	0±0 a	0±0 a	37.3±3.7 bA	37.9±5.2 cA
Böceğe fungus uygulaması	7.0±4 a	0±0 a	0±0 a	74.1±8.7 cA	18.9±5.0 bB
Kontrol	5.9±2.5 a	16.9±5.1 b	77.2±2.5 b	0±0 a	0±0 a

<sup>a</sup>Larva ve pupalarda, entomopatojen fungus gelişimi gözlenmeyen ve sebebi bilinmeyen ölümler.

<sup>b</sup> Her sütündeki aynı büyük harfler istatistiki olarak benzer ( $P>0.05$ ), farklı harfler istatistiki olarak farklı olduklarını belirtmektedir ( $P<0.05$ ).

\* Her sütündeki aynı küçük harfler istatistiki olarak benzer ( $P>0.05$ ), farklı harfler istatistiki olarak farklı olduklarını belirtmektedir ( $P<0.05$ ).

Çam keseböceği ile mücadelede alerjik reaksiyona neden olan kılların görülmeye başlamadan önceki erken dönemini veya yeni nesil oluşturmadan önceki son dönemini hedef almak bu böcek ile etkili bir mücadele yöntemi imkânı sunar. Bu dönemler geçirildikten sonra böcek ile yapılacak mücadelede hem maliyetleri arttıran çok daha fazla uygulama gerektirmekte, hem de kaşındırıcı tüylerin çevreye yayılmasıyla mücadele yöntemi zorlaşacaktır. Bu çalışma ile *T. wilkinsoni*'nin ikinci dönem larvaları ve pupa oluşturmadan önceki son dönem larvalarının *B. bassiana* ya karşı hem arazi koşullarında hem de laboratuvar koşullarında oldukça duyarlı oldukları belirlenmiştir. Erken dönem ve son dönem larvalarında laboratuvar koşullarında %100 ölüm gözlenirken, son dönem larvalarında arazi koşullarında toprağa ve böceğe fungus uygulamasında sırası ile %75 ve %93 enfeksiyon belirlenmiştir.

Önceki çalışmalarda çam keseböceklerinin entomopatojen funguslara karşı doğal olarak duyarlı olduğu belirlenmiş (Vargas-Osuna et al. 1994; Er et al. 2007; Sevim et al. 2010; Draganova et al. 2013; Sönmez et al. 2017) ve *B. bassiana*'nın zararlı larva ve pupalarını değişik oranlarda etkilediği bildirilmiştir (Battisti et al. 2000; Sevim et al. 2010). Türkiye'den izole edilen yerel *B. bassiana* KTU-24 izolatının *T. pityocampa* larvaları üzerine etkileri araştırılmış (Sevim et al. 2010; Sönmez et al. 2017) ve %100 ölüm ile etkili olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada kullandığımız yerel izolat ikinci dönem larvalara etkisi bakımından benzer sonuçlar göstermiştir.

Bu çalışmamız yerel izolatın pupa oluşturmadan önceki son dönem larvalarına arazi koşullarında uygulanması ile ilk çalışma olması bakımından önemlidir.

Entomopatojen fungusun zararlı böcekler üzerine etkisi konukçunun dönemine, uygulama şekline ve çevre koşullarından özellikle sıcaklık ve neme bağlı olarak değişkenlik gösterir (Marannino et al. 2006; Alexandre et al. 2006; Quesada-Moraga et al. 2006). Bu çalışmada, çam keseböceğinin son dönem larvalarına yapılan fungus uygulamasında çevre koşullarının etkisinden dolayı arazi

koşullarındaki fungal enfeksiyon laboratuvar koşullarında yapılan uygulamadan daha az bulunmuştur. Ayrıca pupa evresine geçmeden entomopatojen fungusların larva dönemine uygulanması enfeksiyon oranını arttırmıştır. Ayrıca, entomopatojen fungusların zararlının pupa dönemine geçmeden larva dönemine uygulanması enfeksiyon oranını arttırmıştır. Buna ilaveten, henüz toprağa inmeden larvalara uygulanacak sporlar, larvaların hareketleri sayesinde daha geniş alanlara yayılabilecek ve uygulama yapılmamış diğer böceklerin fungus sporları ile etkilenmesini sağlayabilecektir ki böylece çam keseböceği ile mücadele de daha etkili olacaktır.

Entomopatojen fungusun çam keseböceğinin erken dönemlerine örneğin yumurta ve birinci dönem larvalarına (Aydın 2016) uygulanması bu böceğin etkilerinin en aza indirgenmesinde etkili bir strateji olarak görünmektedir. Özellikle yumurta döneminde yapılan uygulama ile hem yumurtalar hedef alınmış hem de yumurtadan çıkan erken dönem larvalar enfekte olmuştur (Aydın 2016). Bizim çalışmamızda *B.*

*bassiana* izolatının yumurta dönemine olan etkisine bakılmamış; fakat ikinci dönem larvalarında gözlenen enfeksiyonun bu böceğin erken dönemlerine de etkili olabileceğini göstermiştir. Hedef böceğin erken dönem veya son dönemlerine yapılacak uygulamaların laboratuvar koşullarının yanında kesinlikle arazi ortamında uygulanması gerekmektedir.

Sonuç olarak bu çalışma *B. bassiana* izolatının, çam keseböceğinin erken dönem ve son dönem larva evresinde etkili olduğunu ve böceğin ağaçlara ve insanlara zarar vermeden kontrol edilebileceğini göstermektedir. İyi bir mikrobiyal mücadele etmeni, konukçu böcek üzerinde kendini çoğaltılabilir ve bireyler arasında geçiş yaparak epizootiklerin oluşmasında daha etkili olur. Çalışmada kullanılan *B. bassiana* BMAUM M6-4 izolatı, erken dönem larvalar üzerinde ve son dönem larvalarda enfeksiyona sebep olarak konukçu üzerinde çoğalmıştır. *Beauveria bassiana* BMAUM M6-4 izolatının arazi koşullarında etkinliği konusunda daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır. Uygulama yöntemleri ve fungusun orman ekosistemindeki uzun vadeli etkileri de araştırılmalıdır.

## Teşekkür

Bu çalışmaya 5080-YL1-17 nolu proje numarası ile destek veren Süleyman Demirel Üniversitesi, Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

- Abbott W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.
- Alexandre T.M., L.F. Alves, P.M. Neves & S.B., Alves. 2006. Effect of temperature and poultry litter in *Beauveria bassiana* (bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch)

- virulence against the lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology*, 35(1):75-82.
- Avcı, M., R. Sarı & O. Sarıkaya, 2011. *Thaumetopoea wilkinsoni*'nin farklı yükseltilerde uçma zamanının feromon tuzaklarla belirlenmesi. Türkiye I. Orman Entomolojisi ve Patolojisi Sempozyumu, 23-25 Kasım, Antalya, 334s.
- Aydın, T., 2016. Entomopatojen Fungus *Metarhizium brunneum* ve Uçucu Yağların Çam Keseböceği (*Thaumetopoea wilkinsoni* Tams) (Lepidoptera: Notodontidae)'ne Etkileri. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 36s, Isparta.
- Battisti, A., M. Bernardi, & C. Ghirardo, 2000. Predation by the Hoopoe (*Upupa epops*) on pupae of *Thaumetopoea pityocampa* and the pikely influence on other natural enemies. *BioControl*, 45: 311-323.
- 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. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 26 (2), 323-327.
- Çanakçıoğlu, H. & T. Mol, 1998. Orman Entomolojisi. Zararlı ve Yararlı Böcekler. I.Ü Orman Fakültesi Yayınları, 975-404-487-2, İstanbul.
- Devkota, B. & G.H. Schmidt, 1990. Larval development of *Thaumetopoea pityocampa* (Den. & Schiff.) (Lep., Thaumetopoeidae) from Greece as influenced by different host plants under laboratory conditions. *Journal of Applied Entomology*, 109(4): 321-330.
- Draganova, S., D. Takov, D. Pilarska, D. Doychev, P. Mirchev, G. Georgiev, 2013. Fungal pathogens on some Lepidopteran forest pests in Bulgaria. *Acta Zoologica Bulgarica*, 65(2): 179-186.
- Er, M.K., H. Tunaz & A. Gökçe, 2007. Pathogenicity of entomopathogenic fungi to *Thaumetopoea pityocampa* (Schiff.) (Lepidoptera: Thaumetopoeidae) larvae in laboratory conditions. *Journal of Pest Science*, 80(4): 235-239.
- FAO, 2009. Global Review of Forest Pest and Disease. Food and Agriculture Organization. <http://www.fao.org/europe/programmes-and-projects/fao-turkey/tr/>.
- Goettel M.S., J. Eilenberg & T. Glare, 2005. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS, editors. Comprehensive molecular insect science. Amsterdam: Elsevier, 361-405 pp.
- Goettel, M. S. & G. D. Inglis, 1997. Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey, L.A. (Ed.), Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, San Diego, USA, 213-249.
- Humber, R. A., 1998. Entomopathogenic fungal identification. APS/ESA Joint Annual Meeting 8-12 November 1998 Las Vegas, NV.
- İnce, İ. A., H. Kati, H. Yılmaz, İ. Demir, & Z. Demirbağ, 2008. Isolation and identification of bacteria from *Thaumetopoea pityocampa* Den. and Schiff. (Lep., Thaumetopoeidae) and determination of their biocontrol potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 3005-3015.
- İnce, İ. A., İ. Demir, Z. Demirbağ, & R. Nalcacıoğlu, 2007. A cytoplasmic polyhedrosis virus isolated from the pine processionary caterpillar, *Thaumetopoea pityocampa*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 632-637.

- İpekdağ K., C. Burban, C. Kerdelhué & S.S. Çağlar, 2015. Distribution of two pine processionary moth species in Turkey evidences a contact zone. *Turkish Journal of Zoology*, 39: 868-876.
- Kati, H., İ. A. Ince, İ. Demir, & Z. Demirbağ 2010. *Brevibacterium pityocampae* sp. nov., isolated from caterpillars of *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera, Thaumetopoeidae). *International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 60: 312–316.
- Lacey L.A. & M.S. Goettel, 1995. Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the early 21st century. *Entomophaga*, 40:3–27.
- Marannino, P., C. Santiago-Álvarez, E. de Lillo & E. Quesada-Moraga, 2006. A new bioassay method reveals pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against early stages of *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera; Buprestidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 93(3): 210-213.
- Montoya, R. 1988. An example of pheromone application: the pine processionary moth. In: [Biorational insecticides. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain.
- Mueller, G. M., & J. P. Schmit, 2007. Fungal biodiversity: what do we know? what can we predict?. *Biodiversity and Conservation*, 16(1):1-5.
- Onaran, M.A., & M. Kati, 2010. Çam keseböceği (*Thaumetopoea pityocampa* Schiff) ile biyolojik mücadele. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12(2): 21-27.
- Quesada-Moraga E., A. Ruiz-García & C. Santiago-Alvarez, 2006. Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). the journal. *Journal of Economic Entomology*, 99(6):1955-66.
- Robredo, F. & E. Obama, 1991. Efficacy trials with cypermethrin and deltamethrin against *Thaumetopoea pityocampa* (Den. & Schiff.)]. Informe para el Registro Oficial de Productos y Material Fitosanitario. Archivos de la Subdirección General de Sanidad Vegetal, Madrid, Spain.
- Robredo, F. 1980. Extensive treatments with diflubenzuron against the pine processionary caterpillar in Spain. Boletín del Servicio de Defensa contra Plagas e Inspección. *Fitopatológica*, 6: 141-154
- Salvato P., A. Battisti, S. Concato, L. Masutti, T. Patarnello & L. Zane, 2002. Genetic differentiation in the winter pine processionary moth (*Thaumetopoea pityocampa* – *wilkinsoni* complex), inferred by AFLP and mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology*, 11: 2435–2444.
- Seema, Y., T. Neeraj & K. Krishan, 2013. Mass production of Entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* using rice as a substrate by Diphasic Liquid-Solid Fermentation Technique. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 3(3): 331-335.
- Sevim, A., I. Demir & Z. Demirbağ, 2010. Molecular characterization and virulence of *Beauveria* spp. from the pine processionary moth, *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera: Thaumetopoeidae). *Mycopathologia*, 170(4): 269-277.
- Simonato, M., Z. Mendel, C. Kerdelhué, J. Rousselet, E. Magnoux, P. Salvato, A. Roques, A. Battisti & L. Zane, 2007. Phylogeography of the pine processionary moth *Thaumetopoea wilkinsoni* in the Near East. *Molecular Ecology*, 16: 2273–2283.

- Sönmez, E., I. Demir, J.C. Bull, T.M. Butt & Z. Demirbağ, 2017. Pine processionary moth (*Thaumetopoea pityocampa*, Lepidoptera: Thaumetopoeidae) larvae are highly susceptible to the entomopathogenic fungi *Metarhizium brunneum* and *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology*, 27: 1168-1169.
- Şahin, H., 2006. Çam kese tırtılı (*Thaumetopoea pityocampa* (Den&Schiff)) (Lepidoptera: Thaumetopoeidae)'na karşı farklı entomopatojen fungus izolatlarının etkinliklerinin araştırılması. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 23s, Kahramanmaraş.
- Vargas-Osuna, E., M. J. Ledesma, H. K. Aldebis & C. Santiago- Alvarez, 1994. Pathogens and parasitoids for the control of *Thaumetopoea pityocampa* (D. y Schiff) (Lep. Notodontidae). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 20:511-5.
- Vega, J.M., I. Moneo, A. Armentia, A. Fernández, J. Vega, R. De La Fuente, P. Sánchez & M.E. Sanchís, 1999. Allergy to the pine processionary caterpillar (*Thaumetopoea pityocampa*). *Clinical & Experimental Allergy*, 29:1418-1423.