

ISSN 2146-0035  
E-ISSN 2548-1002

# Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi

Turkish Journal of  
Biological Control



Yıl: 2023

Cilt (Volume): 14

Sayı (Number): 2

**Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi**  
(Turkish Journal of Biological Control)

Turkish Journal of Biological Control is a peer reviewed journal which has been published twice a year (July – December) by the Biological Control Society of Turkey. The Journal accepts original, full-length manuscripts and short communications relating to the biological control of pests, diseases and weeds in Turkish or English.

Annual subscription price: € 30

Price of single issue: € 20

**Corresponding address:**

Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi  
Çukurova Üniversitesi Kampüsü PTT Şubesi  
P.O. Box: 33 - 01330, Adana - Turkey

E-mail: [bimude@cu.edu.tr](mailto:bimude@cu.edu.tr)

Web: <http://www.biyolojikmucadele.org.tr>



CABI ve TÜBİTAK/ULAKBİM tarafından taranmaktadır. Indexed in CABI and TÜBİTAK/ULAKBİM.

All rights to articles published in this Journal are reserved by the Biological Control Society of Turkey. Permission must be obtained for reproduction in whole or in part of any form.

---

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ BASİMEVİ

Tel: 0322 338 60 69

[basimevidizgi@cu.edu.tr](mailto:basimevidizgi@cu.edu.tr)

**Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi**  
(Turkish Journal of Biological Control)

**Sahibi** (Owner – On behalf of Biological Control Society of Turkey):

M. Rifat ULUSOY

**Sorumlu Müdür** (Editor in Chief): Kamil KARUT

**İngilizce Editor (English Editor):** Gregory T. SULLIVAN

**Düzenleme Kurulu** (Editing Board):

Cengiz KAZAK	Mehmet Rifat ULUSOY	Kamil KARUT
Ali ERKILIÇ	Serkan PEHLİVAN	Hilmi TORUN
Miraç YAYLA		

**Danışma Kurulu / Advisory Board**

AYSAN Y., Adana	KAZAK C., Adana
BAŞPINAR H., Aydın	KODAN M., Ankara
BAYHAN E., Diyarbakır	KOTAN R., Erzurum
ÇIKMAN E., Şanlıurfa	ÖZAKTAN H., İzmir
DEMİR İ., Trabzon	ÖZDER N., Tekirdağ
DEMİR S., Van	ÖZKAN C., Ankara
ER M. K., Kahramanmaraş	SATAR S., Adana
ERKILIÇ A., Adana	SERTKAYA E., Antakya
ERLER F., Antalya	STATHAS G., Yunanistan
FURSOV V., Ukrayna	SULLIVAN S., Samsun
GÖKÇE A., Niğde	SUSURLUK İ. A., Bursa
GÖZEL U., Çanakkale	ŞENAL D., Kocaeli
HAYAT M., Hindistan	ŞENGONCA Ç., Almanya
HAZIR A., Adana	ULUSOY M. R., Adana
JAPOSHVILI G., Gürcistan	UYGUN N., Adana
KARACA İ., Isparta	UYGUR S., Adana
KARACAOĞLU M., Adana	ÜLGENTÜRK S., Ankara
KASAP İ., Çanakkale	YOLDAŞ Z., İzmir
KARUT K., Adana	YURTCAN M., Edirne

**Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi**  
(Turkish Journal of Biological Control)

Yıl: 2023

Cilt (Volume): 14

Sayı (Number): 2

**İnceleme ve Değerlendirmede Bilimsel Olarak**  
**Katkıda Bulunanlar**  
(Scientific Advisory Board)

ATAKAN Ekrem, Adana

AYDIN Gökhan, Isparta

BAYRAMOĞLU Zeynep, Rize

BOLU Halil, Diyarbakır

ELEKÇİOĞLU Naime Zülal, Adana

KAZAK Cengiz, Adana

KÖK Şahin, Çanakkale

MUŞTU Murat, Kayseri

ÖZDİKMEN Hüseyin, Ankara

ÖZGÖNEN ÖZKAYA Hülya, Isparta

PEHLİVAN Serkan, Adana

SOYLU Soner, Hatay

TIRENG KARUT Şebnem, Adana

## İçindekiler (Contents)

<i>Orijinal araştırmalar (Original articles)</i>	<i>Sayfa (Page)</i>
The isolation and characterization of bacteria isolated from <i>Capnodis tenebrionis</i> L. and their biological control potential against some insect pests <b>Capnodis tenebrionis L.'den izole edilen bakterilerin izolasyonu, karakterizasyonu ve bazı böcek zararlılarına karşı biyolojik mücadele potansiyelleri</b> Ebru GÜNEY AYDIN, Kazım SEZEN.....	85-104
Effects of the entomopathogenic fungus, <i>Beauveria bassiana</i> , with adipokinetic hormone, on <i>Myzus persicae</i> and <i>Trialeurodes vaporariorum</i> <b>Entomopatojen fungus, Beauveria bassiana'nın Myzus persicae ve Trialeurodes vaporariorum üzerindeki etkisinin adipokinetik hormon ile artırılması</b> İsmail KARACA, Özlem GÜVEN, Umesh Kumar GAUTAM, Tuğçe ÖZEK.....	105-120
Bağda Kurşuni Küf Hastalığı ( <i>Botrytis cinerea</i> Pers.)'na karşı antagonist bakterilerle biyolojik mücadele <b>Biological control of Gray Mold Disease (Botrytis cinerea Pers.) of grapevine by antagonistic bacteria</b> Mehmet YILDIZ, Ümit ÖZYILMAZ.....	121-140
Antalya ili örtüaltı domates üretim alanlarında <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) larva parazitoitlerinin belirlenmesi üzerine araştırmalar <b>The determination of larval parasitoids of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in greenhouses used for tomato cultivation in Antalya Province, Türkiye</b> Yusuf YÜKSEKYAYLA, Mahmut Mete KARACA, Kamil KARUT.....	141-154
Çanakkale İli'nde tarım dışı bir habitat olan Çardak Lagünü'ndeki afidofag syrphidler (Diptera: Syrphidae) <b>Aphidofagous syrphids (Diptera: Syrphidae) from the Çardak Lagoon area, a non-agricultural habitat in Çanakkale Province, Türkiye</b> Şahin KÖK, İsmail KASAP.....	155-165

*Original article (Özgün makale)*

**The isolation and characterization of bacteria isolated from *Capnodis tenebrionis* L. and their biological control potential against some insect pests**

Ebru GÜNEY AYDIN<sup>1</sup>, Kazım SEZEN<sup>1\*</sup>

***Capnodis tenebrionis* L.'den izole edilen bakterilerin izolasyonu, karakterizasyonu ve bazı böcek zararlılarına karşı biyolojik mücadele potansiyelleri**

**Öz:** *Capnodis tenebrionis* L. (Coleoptera: Buprestidae), Türkiye'nin de dahil olduğu birçok ülkede sert çekirdekli meyve bahçelerinin en yıkıcı zararlılarından biridir. Bu çalışmada *C. tenebrionis*'in larva ve erginlerinden 21 bakteri izolatu izole edilmiş, morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler özellikleri belirlenmiştir. Buna göre *C. tenebrionis*'in kültürlenebilir bakteri florası; *Bacillus cereus*, *B. mycoides*, *B. pumilus*, *Paenibacillus xylanilyticus*, *B. flexus*, *B. simplex*, *Raoultella terrigena*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *B. safensis*, *B. amyloliquefaciens* ve *B. aryabhatai* olarak saptanmıştır. Bu bakteri izolatlarının farklı zararlı böcek türlerinin larvalarına karşı biyolojik mücadele potansiyelleri; Karaağaç yaprak böceği (*Pyrrhalta luteola* M.), Petek güvesi (*Galleria mellonella* L.) ve Un kurdu (*Tenebrio molitor* Ludwig) üzerinde incelenmiştir. *Bacillus cereus* izolatları bu zararlı böcekler üzerinde en yüksek etkiyi göstermiş ve hedeflenen zararlıların biyolojik mücadelesinde kullanılabilecek potansiyel bir etmen olarak saptanmıştır.

**Anahtar sözcükler:** *Capnodis tenebrionis*, Bakteriyel izolatlar, Biyolojik kontrol

**Abstract:** *Capnodis tenebrionis* L. (Coleoptera: Buprestidae) is one of the most destructive pests of stone fruit orchards in several countries, including Türkiye. In the present study, 21 bacterial isolates were isolated from the larvae and adults of *C. tenebrionis*. The morphological, physiological, biochemical and molecular characteristics of the bacterial isolates were determined. The bacterial flora isolated from *C. tenebrionis* was as follows: *Bacillus cereus*, *B. mycoides*, *B. pumilus*, *Paenibacillus xylanilyticus*, *B.*

<sup>1</sup>Karadeniz Technical University, Faculty of Science, Department of Biology, Ortahisar/Trabzon, Türkiye

\* Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: sezen@ktu.edu.tr

ORCID ID (Yazar sırasıyla): 0000-0001-9347-0359; 0000-0002-2903-0460

Alınış (Received): 9 Haziran 2023

Kabul edilmiş (Accepted): 2 Kasım 2023

*flexus*, *B. simplex*, *Raoultella terrigena*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *B. safensis*, *B. amyloliquefaciens* and *B. aryabhatai*. The biological control potential of these bacterial isolates against the larvae of several economic pest species, the elm leaf beetle (*Pyrrhalta luteola* (M.)), the honeycomb moth (*Galleria mellonella* L.), and the mealworm (*Tenebrio molitor* Ludwig), was investigated. The isolates of *B. cereus* showed the highest efficacy against these insect pests.

**Key words:** *Capnodis tenebrionis*, Bacterial isolates, Biological control

## Introduction

*Capnodis tenebrionis* (L.) (Coleoptera: Buprestidae), also known as the Mediterranean flathead peach borer, is a widespread pest of stone fruit crops in the Rosaceae family. It is widespread in several regions of the arid and semi-arid Mediterranean regions (Vit 2004). The great wax moth, *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae), causes the losses of honeycomb and pollen. The elm leaf beetle, *Pyrrhalta luteola* (M.) (Coleoptera: Chrysomelidae), damages elms planted for shade and ornamentation in Türkiye; the trees become bare due to excessive leaf fall. In recent years, the mealworm, *Tenebrio molitor* Ludwig (Coleoptera: Tenebrionidae), has become a new invertebrate model to study microbial infections (De Souza et al. 2015), and is an alternative protein-rich food (Grau et al. 2017).

Several control methods have already been used against these pests. However, the damage is still great. Synthetic pesticides are widely used in Türkiye to control these pests. The complexity of chemical control, its negative impact on the environment, and the associated costly damage, have encouraged the search for alternative pest control strategies (Ben-Yehuda et al. 2000), especially to protect organic fruit production. The use of entomopathogenic bacteria (EPB) is one of the best potential alternatives to the use of synthetic pesticides (Muratoğlu et al. 2011).

The most used microorganisms against insect pests today are entomopathogenic bacteria. In studies conducted over the past 50 years, many entomopathogenic bacteria have been isolated from insects and some have been found to cause disease in them. Among them, *Bacillus* species, which belong to the soil bacteria, stand out. The most important of these bacteria is *Bacillus thuringiensis* (Bt). *Bacillus thuringiensis* is a spore-forming, Gram-positive, aerobic soil bacterium that produces crystalline toxins with insecticidal properties against insects of the orders Lepidoptera, Diptera and Coleoptera (Beegle & Yamamoto 1992). However, it has also been isolated from diseased and healthy insects, from leaf surfaces of plants, and from stored products (Burgess & Hurst 1977; Carozzi et al. 1991; Kaelin et al. 1994).

The objective of this study was to isolate the culturable bacterial flora of *C. tenebrionis* collected in Türkiye, and evaluate their potential against some

economically important insect pests. Twentyone bacterial isolate were isolated from the larvae and adults of *C. tenebrionis*. The isolates were identified using morphological, biochemical, physiological and molecular techniques and tested against the larvae of *P. luteola*, *T. molitor* and *G. mellonella*.

## Materials and Methods

### Collection of larvae and adults

The larvae and adults of *C. tenebrionis* were collected from orchards in Amasya Province, Türkiye. The collected larvae and adults were brought to the laboratory in plastic boxes with perforated lids to allow air circulation. In the laboratory, the larvae and adults were macroscopically examined and then divided into dead larvae, live larvae and adults. For the bioassays with the three insects, *P. luteola*, were collected from the fields in Trabzon Province, and *G. mellonella* and *T. molitor* were obtained from the laboratory cultures at the Department of Biology of Karadeniz Technical University (KTU) in Trabzon, Türkiye.

### Isolation of bacteria

Bacterial isolation was performed on live larvae, dead larvae and adults of *C. tenebrionis*. Insects collected from the field were sterilized with 70% ethanol for 5 minutes (Poinar & Thomas 1978) and washed 3 times with sterile distilled water. Larval and adult bodies were then homogenized in a nutrient broth, using a glass mill. The homogenate was filtered through two layers of cheese muslin cloth into sterilized tubes to remove larval debris. Then, 10, 25, and 50 µl of the larval extracts were applied to nutrient agar and incubated at 30°C for 2–3 days. The remaining mixtures were incubated at 30°C for 3–4 hours to enrich the number of bacteria that showed low concentrations. Of these mixtures, 10, 25, and 50 µl were also plated on nutrient agar and incubated for 2–3 days at 30°C. Finally, the incubated larval suspensions were heated in a water bath at 80°C for 10 min to eliminate non-spore forming bacteria. After heat inactivation, 10, 25 and 50 µl of the heated suspensions were plated on nutrient agar and incubated at 30°C for 2–3 days. Isolates were differentiated on the basis of colony color and morphology. Pure cultures of the bacterial colonies were prepared and stored in 20% glycerol at –80°C in the Microbiology Laboratory, Department of Biology, KTU, Trabzon, Türkiye.

### Phenotypic and biochemical identification of bacterial isolates

Phenotypic and biochemical characterizations of bacterial isolates were performed according to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vols. 1 and 2 (Sneath et al. 1986). Colony morphology of the isolates plated on nutrient agar plates was



examined by direct observation and under a stereomicroscope. The shape of the bacterial isolates was also determined using a light microscope at 1,000× magnification. Gram staining was performed according to the procedure described by Claus (1992). Endospore staining was performed using the method of Prescott et al. (1996). Temperature tests were performed at 4, 10, 35, 40, 45 and 50°C; NaCl tolerance tests were performed with medium containing 3, 5, 7, 9, and 11% NaCl; and pH tests were performed with the medium at pHs 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, and 11.

To determine the biochemical properties of the isolates, starch hydrolysis and oxidase tests, and the catalase test, according to Benson (1985) and Cappuccino & Sherman (1992), respectively, were performed. In addition, their growth on McConkey agar was studied.

The API 20E, API 50CH and VITEK-2 systems were also used for biochemical characterization of the bacterial isolates. Whereas the API 20E test was used for Gram-negative bacteria, the API 50CH test was used for Gram-positive bacteria. At the end of the plating of the API 50CHB test tubes, the tube with the number zero was considered the control and color-changing of the tube was considered a positive result. In the same way, reagents (TDA, JAMES, VP1-VP2, NIT1-NIT2) were added to portions of the cultures in the API 20E test tubes, the remainder was observed for direct color change, and the metabolic and biochemical properties of the isolates were determined. The API test results were evaluated using IdBactv. 1.1 software from G. Kronvall, with the media for the API20E and API 50CHB tests from bioMerieux, France.

To corroborate the results of the API tests, VITEK-2 tests (manufacturer's details) were performed; VITEK-2 is an automated microbial identification system that provides highly accurate and reproducible results with its colorimetric cards and associated hardware and software. Various metabolic activities, such as acidification, alkalization and enzyme hydrolysis of the bacterial isolates, were determined fully automatically by using the VITEK-2 panel test system. The results were then analysed by comparison with data in its database. In addition, some biochemical properties were tested using the VITEK-2 BCL card for Gram-positive, spore-forming bacteria, and the VITEK-2 GN card for Gram-negative cocci and bacilli.

### **16S rRNA gene sequencing and phylogenetic tree**

Partial sequencing of the 16S rRNA gene was used to confirm isolate identification. The total genomic DNA of the bacterial isolates was extracted according to the standard protocol and stored at -20°C until use. PCR amplification of the 16S rRNA genes of the bacterial isolates was performed using universal primers. UNI16SF (5'-ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA-3' and UNI16S-R (5'-ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3') primers were used as

forward and reverse primers, respectively (Weisburg et al. 1991). To determine the nucleotide sequence of the 16S rDNA gene regions, they were sent to Macrogen (The Netherlands) for automated DNA base analysis. Sequence analysis was performed from both sides of the gene and the results were evaluated and compared with other sequences in the gene bank.

Nucleotide sequences of 16S rRNA genes were edited with BioEdit and aligned with ClustalW (Hall 1999). Phylogenetic analysis was performed using the neighbour-joining method (NJ) run by MEGA 4.0 software (Tamura et al. 2011). The NJ analysis was based on Kimura's 2-parameter test. Gaps in the alignment were treated as missing data. The reliability of the phylograms was tested by bootstrap analysis with 1,000 repetitions using MEGA 4.0. The closed circles in black represent the isolates examined in this study. Bootstrap values  $\geq 70\%$  are labeled. The scale at the bottom of the dendrogram indicates the degree of dissimilarity.

### **Crystal protein**

To amplify the *cry* genes of these nine isolates, genomic DNA was extracted from the cultures using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), according to the manufacturer's protocol and the PCR reaction was performed by using 4 pairs of universal primers for the *cry1*, *cry2*, *cry3*, and *cry4* genes, as described by Ben-Dov et al. (1997) in Kati et al. (2007).

By using light microscopy, a distinction was made between crystals, spores and vegetative cells. Preparation of specimens for microscopic examination included the following steps: The bacterial smears were immersed for 3 minutes in a small vessel containing a Coomassie Brilliant Blue solution (consisting of 0.25% Coomassie Brilliant Blue, 50% ethanol and 7% acetic acid). They were then rinsed with tap water, air dried, and viewed under a light microscope (Shaerif & Alaeddinoğlu 1988).

For the SDS-PAGE gel, the spore-crystal mixture was resuspended in 1 M cold NaCl and centrifuged at 12,000 rpm for 5 minutes. The pellet was washed twice in sterilized dH<sub>2</sub>O and resuspended with sterilized dH<sub>2</sub>O. Protein concentrations were determined with the Bradford (1976) assay method and analyzed in 10% SDS-PAGE, as described by Laemmli (1970). Silver staining was used to detect proteins after electrophoretic separation on polyacrylamide gel, and the molecular weight of proteins was estimated by comparison with protein molecular weight standards.

### **Bioassays**

The bacterial isolates were spread on nutrient agar plates to obtain single colonies for each isolate. The obtained single colonies were inoculated into nutrient broth medium and incubated overnight at 30°C. After incubation, the bacterial density

was measured at OD<sub>600</sub> (optical density) and adjusted to  $1.8 \times 10^9$  cfu/ml (Ben-Dov et al. 1995). Five milliliters of this culture were centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. The pellet was then resuspended in 5 mL of sterilized phosphate-buffered saline solution and used in bioassays.

The susceptibility of *P. luteola*, *T. molitor* and *G. mellonella* to each bacterial isolate was tested under laboratory conditions. Healthy third-instar larvae of *T. molitor* and *G. mellonella* were purchased and healthy second-instar larvae of *P. luteola* were collected from elm trees (species) in Trabzon. The larvae used for the bioassays were randomly selected. Fresh elm leaves, bran and semi-synthetic food were used as the diets for *P. luteola*, *T. molitor* and *G. mellonella*, respectively, in the bioassays. The semisynthetic food was prepared as follows: 500 g of bran, 200 g of honeycomb, 150 ml of filtered honey, 150 mL of water and 300 mL of glycerol were thoroughly mixed (Bronskill 1961).

For each isolate, one milliliter of the bacterial suspension, as described above, was dribbled onto the elm leaf, bran and semisynthetic feed, and placed in individual plastic boxes, each containing a single bacterial isolate. Ten, second-third instar larvae were placed on the food material in containers and maintained at  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  and 60% relative humidity in a 12:12 photoperiod. Larval mortality was recorded every 24 hours, with all the dead larvae removed from the containers daily. All bioassays were repeated 3 times on different occasions. Four different concentrations ( $1.8 \times 10^9$  cfu/ml,  $1.8 \times 10^8$  cfu/ml,  $1.8 \times 10^7$  cfu/ml, and  $1.8 \times 10^6$  cfu/ml), based on OD<sub>600</sub> values of the bacterial isolates, were used in the dose-response experiments. The bioassays were performed as previously described for *T. molitor*. The mortality percentages were corrected in SPSS, according to the Abbott formula (Abbott 1925).

## Results and Discussion

A total of 21 bacterial isolates were collected from *C. tenebrionis* were identified to species level by using phenotypic, biochemical, and molecular methods. Color and shape of colonies of the bacterial isolates were determined on nutrient agar. Based on Gram staining and endospore staining results, three of them were determined to be Gram-negative, non-spore forming, coccobacilli, and the other 18 were determined to be Gram-positive, spore-forming bacilli (Table 1).

Table 1. Morphological and staining characteristics of the 21 bacterial isolates collected from *Capnodis tenebrionis* in Türkiye.

Isolates	Colony color	Colony shape	Cell shape	Gram staining	Spore staining
L-1	Light cream	Smooth	Coccobacil	-	-
L-2	Cream	Smooth	Bacil	+	+
L-3	Cream	Smooth	Coccobacil	-	-
L-4	Cream	Smooth	Bacil	+	+
L-5	Cream	Rough	Bacil	+	+
L-6	Cream	Rough	Bacil	+	+
L-7	Light cream	Rough	Bacil	+	+
L-8	Light cream	Rough	Bacil	+	+
L-9	Cream	Smooth	Bacil	+	+
L-10	Cream	Rough	Bacil	+	+
OL-1	Light cream	Rhizoid	Bacil	+	+
OL-2	Light cream	Rough	Bacil	+	+
OL-3	Light cream	Smooth	Bacil	+	+
OL-4	Cream	Smooth	Bacil	+	+
OL-5	Light cream	Smooth	Bacil	+	+
E-1	Cream	Rough	Bacil	+	+
E-2	Light cream	Smooth	Coccobacil	-	-
E-3	Cream	Smooth	Bacil	+	+
E-4	Cream	Rough	Bacil	+	+
E-5	Cream	Rough	Bacil	+	+
E-6	Cream	Rough	Bacil	+	+

Tests were performed to determine the optimal ranges of the physical factors, such as pH, NaCl, and temperature, that affect bacterial growth. In the temperature tests, all isolates were able to grow at 35°C, isolates numbered L-1, L-10, and OL-5 were able to grow (but poorly) at +4°C, and isolates numbered L-1, L-10, and OL-2 were able to grow but poorly at 10°C. Only the isolate OL-1 failed to grow at 40°C. The isolates numbered L-3, L-7, L-8, L-9, OL-2, OL-3, OL-5, and E-3 could grow at 45°C, and the isolates numbered L-7 and E-3 could grow well at 50°C.

An important criterion in the identification of species is also that the bacteria cannot produce and manufacture certain enzymes, can synthesize or cannot synthesize some organic substances, or can or cannot degrade some organic substances. For this purpose, starch hydrolysis, oxidase and catalase tests were performed. The isolates ability to grow on MacConkey agar was also investigated (Table 2).

Table 2. Some biochemical characteristics of bacterial isolates collected from *Capnodis tenebrionis* in Türkiye.

Isolates	Catalase test	Oxidase test	Starch Hydrolysis test	MacConkey test
L-1	-	+	-	+
L-2	+	+	+	-
L-3	+	-	-	+
L-4	+	-	+	-
L-5	+	+	+	-
L-6	+	+	+	-
L-7	+	+	-	-
L-8	+	-	+	-
L-9	+	+	+	-
L-10	+	+	-	W+
OL-1	+	-	+	-
OL-2	+	+	+	-
OL-3	+	-	-	-
OL-4	+	-	+	-
OL-5	+	+	-	W+
E-1	+	W+	+	-
E-2	+	+	-	+
E-3	+	+	-	-
E-4	+	+	+	-
E-5	+	+	+	-
E-6	+	+	+	-

W: Weak positive

The use of the 16S rDNA gene sequences in the construction of phylogenetic trees is widely used to determine bacterial systematics; examples of the bacterial 16S rRNA samples from this study are shown in Fig. 1.

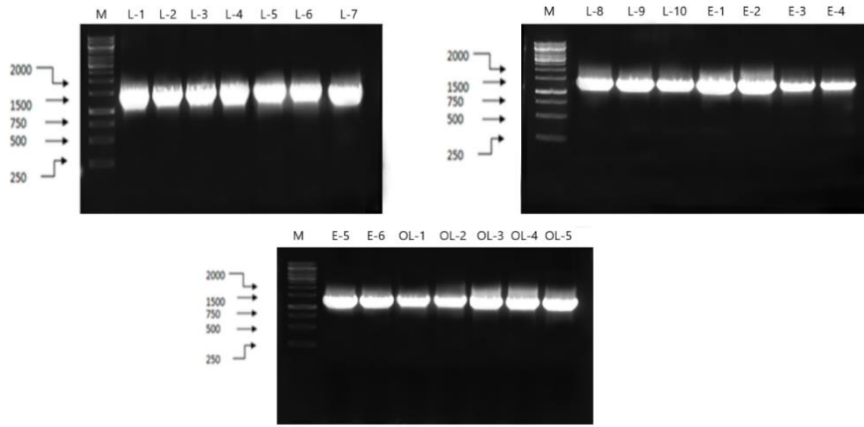


Figure 1. PCR results for 16S rRNA from bacterial isolates collected from *Capnodis tenebrionis* in Türkiye (M: Marker, Fermentas, GeneRuler 1kb).

After all characterization studies, the cultured bacterial flora from *C. tenebrionis* were determined to be: *Bacillus cereus* (E-1; MH220062, E-4; MH220065, E-5; MH220066, E-6; MH220067, OL-4; MH220081, L-2; MH220069, L-4; MH220071, L-5; MH220072, L-6; MH220073) *Bacillus mycoides* (OL-1; MH220078), *Bacillus pumilus* (L-7; MH220074), *Paenibacillus xylanilyticus*, (L-8; MH220075), *Bacillus flexus* (L-9; MH220076), *Bacillus simplex* (L-10; MH220077, OL-5; MH220082), *Raoultella terrigena* (L-1; MH220068), *Enterobacter cloacae* (L-3; MH220070), *Klebsiella oxytoca* (E-2; MH220063), *Bacillus safensis* (E-3; MH220064), *Bacillus amyloliquefaciens* (OL-2; MH220079) and *Bacillus aryabhatai* (OL-3; MH220080). The phylogenetic tree data and 16S rDNA results support each other (Figs. 2 and 3).

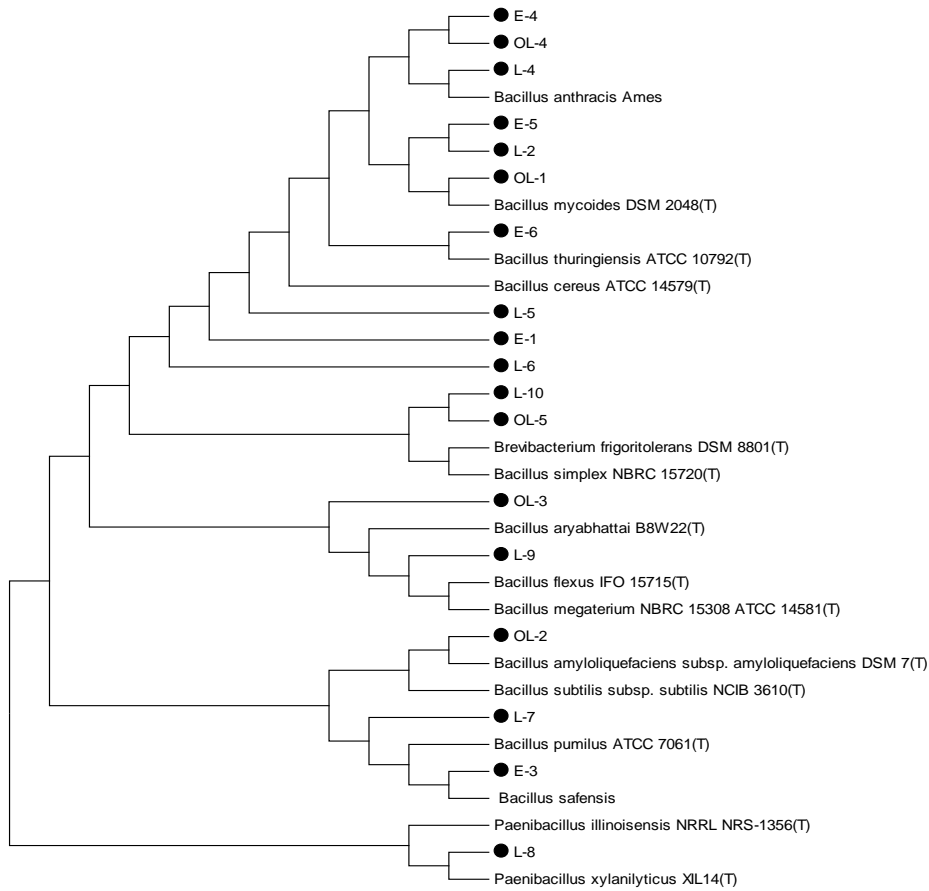


Figure 2. Neighbour-joining analysis of the 16S rDNA region of the Gram-positive isolates of bacteria from *Capnodis tenebrionis* in Türkiye yielded this phylogenetic tree.

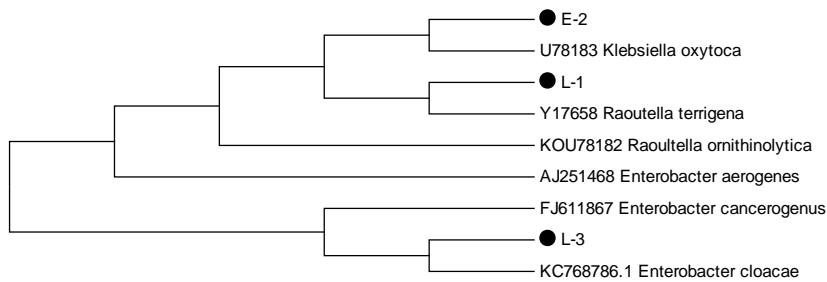


Figure 3. Neighbour-joining analysis of the 16S rDNA region of Gram-negative bacterial isolates collected from *Capnodis tenebrionis* in Türkiye yielded this phylogenetic tree.

The nine gram-negative bacterial isolates, which were thought to be *B. thuringiensis*, were amplified by PCR to detect *cry* genes encoding for crystal proteins. However, no bands of the same size were observed in comparison with the control strain.

These nine bacterial isolates were then subjected to crystal staining to detect crystal proteins. They were examined under a light microscope (type of microscope & manufacturer's details) and no crystal proteins were observed in any isolate.

Mixtures prepared to detect crystal proteins from isolates thought to be *B. thuringiensis* in order to support the results of *cry*-gene PCR were analyzed in 10% SDS-PAGE (Fig. 4). However, the crystal protein band was not observed in any of the isolates.

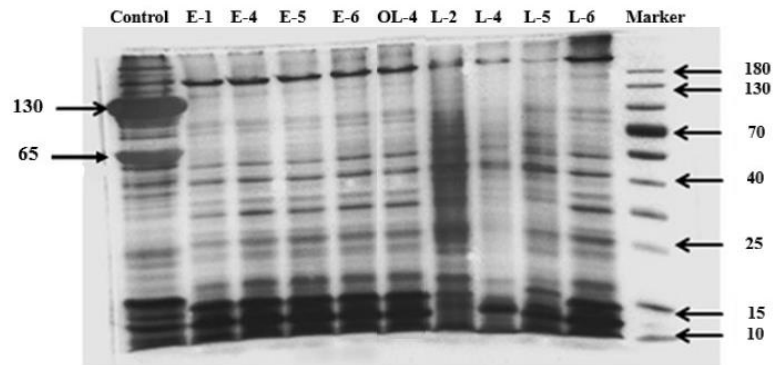


Figure 4. Protein profiles of the isolates stained with silver nitrate. (M: Marker, Control: *B. thuringiensis kurstaki*; BnBt).

To determine the insecticidal potential of these isolates, the third larval stage of *P. luteola* was used under laboratory conditions. Isolates E-5 and E-6 showed the highest efficacy with 87% mortality. This level of lethal effect was followed by that caused by L-5 with 83%, L-6, L-4, E-1 with (80%), L-2, E-4, L-4, L-7 with (77%) (Fig. 5).



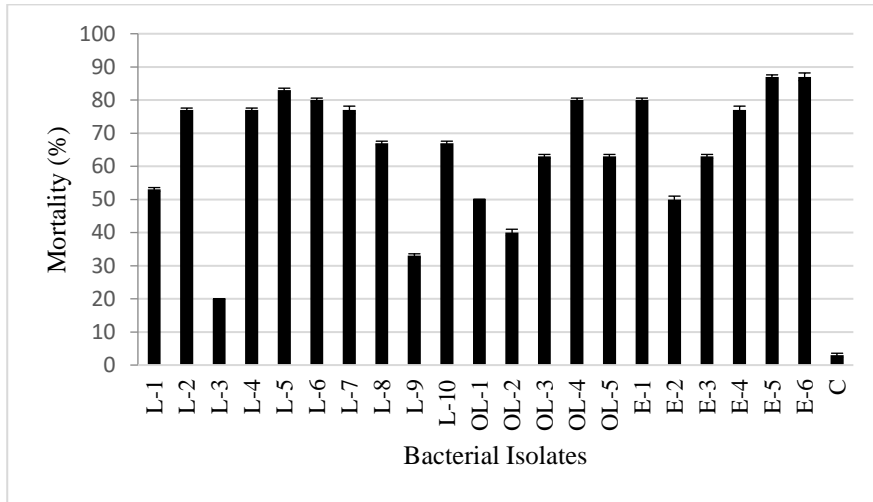


Figure 5. Insecticidal activities of bacteria isolated from *Capnodis tenebrionis* in Türkiye on *Pyrrhalta luteola*; C: Control.

For the larvae of *G. mellonella*, the isolate OL-4 caused a mortality of 60%, followed by the isolates E-4 and E-5 with (53%) (Fig. 6).

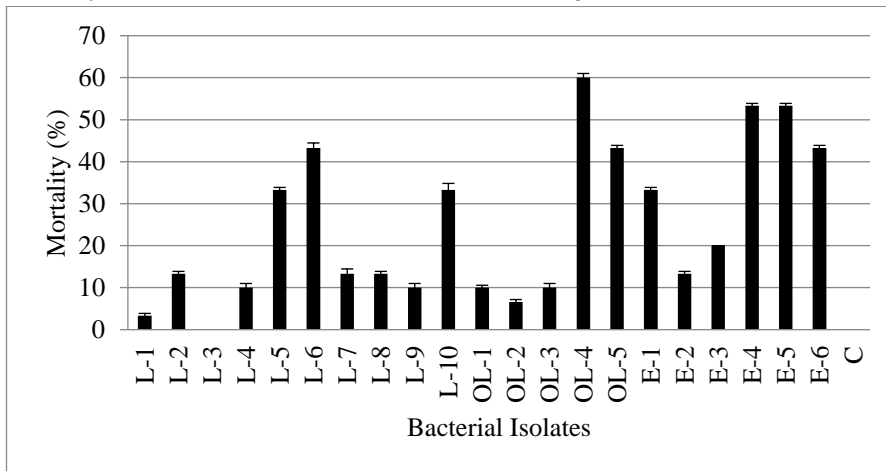


Figure 6. Insecticidal activities of bacteria isolated from *Capnodis tenebrionis* on *Galleria mellonella*; C: Control.

For *T. molitor*, the suspensions were prepared at four different dosages ( $1.8 \times 10^9$ ,  $1.8 \times 10^8$ ,  $1.8 \times 10^7$ ,  $1.8 \times 10^6$  cfu/ml). The isolate OL-4 showed the highest lethal effect at a concentration of  $1.8 \times 10^9$  cfu/mL (47%), 13% at a concentration of  $1.8 \times 10^8$  cfu/mL, and 7% at a concentration of  $1.8 \times 10^7$  cfu/ml. Isolates E-1 and OL-5 produced mortality of 20% and 20%, respectively, at a concentration of  $1.8 \times 10^9$ , 7% and 13% at a concentration of  $1.8 \times 10^8$  cfu/ml, and 3% and 3% at a concentration of  $1.8 \times 10^7$  cfu/ml. These tests were followed by testing of the

isolates, L-2 and E-6, which caused a mortality rates of 10% after the use of  $1.8 \times 10^9$  and  $1.8 \times 10^8$  bacteria, respectively. No mortality was observed for *Tenebrio molitor* at a concentration of  $1.8 \times 10^6$  cfu/ml (Fig. 7, Table 3).

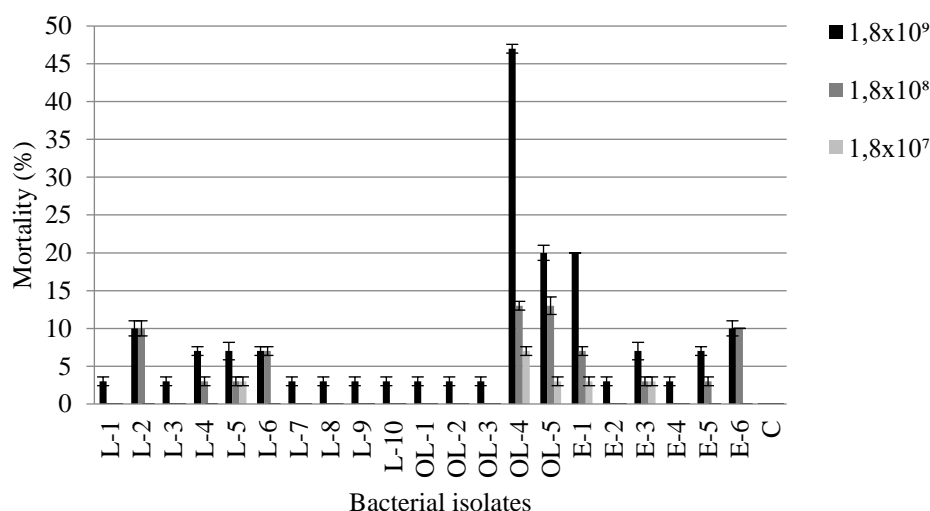


Figure 7. The dose tests of bacteria isolated from *Capnodis tenebrionis* on *Tenebrio molitor*; C: control.

Morphological and physiological methods were used for bacterial characterization, and 16S rDNA analysis was performed to confirm the identifications of the isolates. The API20E, API50CH, and the results from VITEK-2 identification systems were also used to support 16S rDNA sequence analysis. Data obtained from these assays were used whenever data obtained from routine assays were insufficient for species identification.

Table 3. LC<sub>50</sub> and LC<sub>95</sub> (cfu/mL) values of OL-4, OL-5, and E-1 bacterial isolates collected from *Capnodis tenebrionis* in Türkiye, against the larvae of *Tenebrio molitor*.

Isolates	LC <sub>50</sub> (FL, 95%)	Slope ± SE	LC <sub>95</sub> (FL, 95%)	df	X <sup>2</sup>
OL-4	1.82x10 <sup>9</sup> (0.32x10 <sup>9</sup> to 10.41x10 <sup>9</sup> )	0.709±0.386	39.423x10 <sup>9</sup>	1	0.478
OL-5	34.35x10 <sup>9</sup> (2.08x10 <sup>9</sup> to 566.71x10 <sup>9</sup> )	0.496±0.621	72461.38x10 <sup>9</sup>	1	0.578
E-1	63.41x10 <sup>9</sup> (3.23x10 <sup>9</sup> to 1242.94x10 <sup>9</sup> )	0.496± 0.659	132622.21x10 <sup>9</sup>	1	0.727

FL: fiducial limit, SE: standard error, df: degrees of freedom, X<sup>2</sup>: Chi square.

After 16S rDNA sequence analysis and biochemical testing, isolates E-1, E-4, E-5, E-6, OL-4, L-2, L-4, L-5 and L-6 had characteristics of *B. thuringiensis*, *B.*

*cereus* and *B. toyonensis*. SDS gel electrophoresis and crystal staining were performed, and the isolates were found to contain no crystal protein, and the VP (Voges-Proskauer) test was positive. Thus, they were identified as *B. cereus* which can adapt to changing environmental conditions. *Bacillus cereus* is widely distributed in the soil (Vilas-Boas et al. 2002). Many of these species have been isolated from insects, such as *Prodenia eridania*, *Plodia interpunctella* and *Periplaneta americana* (Steinhaus 1947).

In the efficacy tests, the isolates E-5 and E-6 of this group showed the highest efficacy (87%) against the elm leaf beetle. In addition, the OL-4 and E-1 isolates caused 80% mortality. Efficacy testing on honeycomb showed that the E-4 and E-5 isolates produced 53% mortality, and the E-6 and L-6 isolates produced 43% mortality, whereas the OL-4 isolate had the highest lethal effect at 60%.

In this study, the efficacy tests on mealworm larvae, the isolate OL -4 caused the highest mortality rate of 47% at a concentration of  $1.8 \times 10^9$  cfu/ml. In a different study, isolate L-4 caused 77% mortality of *P. luteola*, and *B. cereus* strain Ags1 caused 30% mortality of *Agrotis segetum* (Sevim et al. 2010).

Six *B. cereus* strains have been reported to produce several small, non-protein insecticidal exotoxins (Perchat et al. 2005; Ruiu et al. 2015). In addition, treatment of *Caenorhabditis elegans* and *Meloidogyne incognita* with the supernatant of a *B. cereus* strain culture resulted in mortality of 77.89% of *C. elegans* and 90.96% of *M. incognita* (Gao et al. 2016).

16S rDNA sequence analysis revealed that the OL-1 isolate is similar to *B. thuringiensis*, *B. cereus*, and *B. mycooides*. Because it forms a rhizoidal colony, the VP (Voges-Proskauer) was positive and immobilized, it was determined to be *B. mycooides*.

*Bacillus mycooides* is a rod-shaped, chain-forming bacterium that produces unique rhizoid colonies consisting of cells connected end-to-end on agar plates. Several reports on *B. mycooides* have described its plant growth-promoting effects on sugar beet, cucurbits and tobacco (Neher et al. 2009). *Bacillus mycooides* caused 50% mortality of *P. luteola*, and 10% of *G. mellonella*. It is also showed biocontrol activity against *Cercospora* leaf spot disease (*Cercospora beticola* Sacc.) of sugar beet in both greenhouse and field experiments (Bargabus et al. 2002). In addition, *B. mycooides* (strain B38 V) was reported to have antagonistic activity against *Sclerotinia sclerotiorum* (Ambrosini et al. 2015).

According to 16S rDNA analysis, the L-9 isolate could have been *B. flexus*, *B. aryabhatai* or *B. pumilus*. *Bacillus flexus* has a positive ability to hydrolyze starch, and is positive for the gelatinase and oxidase tests. *Bacillus flexus* has been isolated several times from different lakes and seaweeds, e.g., *Ulva lactula* (Wang & Zhao 2013). In the current study, isolate L-9 was found to cause 33% mortality of *P. luteola* and 10% mortality of *G. mellonella*. Studies showed that *B. flexus* inhibits

the growth of fouling bacterial strains and strongly inhibits the production of byssal filaments and their attachment in the mussel, *Perna indica* (Ramasubburayan et al. 2017).

According to the 16S rDNA sequence analysis, the OL -2 isolate was *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* or *B. velezensis*. Based on all of the results, the isolate was identified as *B. amyloliquefaciens* because the starch hydrolysis test was positive, and the arginine hydrolysis test was negative. *Bacillus amyloliquefaciens* is a non-pathogenic soil bacterium that exhibits certain antifungal properties (Caldeira 2007). OL-2 had a potential caused mortality of 40% and 6% for *P. luteola* and *G. mellonella*, respectively. It caused mortality of 3, 14, and 13% of *Plodia interpunctella* larvae, *Ephestia kuehniella* larvae and *Sitophilus granarius* adults, respectively (Demeli 2014).

16S rDNA analysis of the isolates OL-5 and L-10 suggested that they could be *Bacillus simplex* or *Brevibacterium frigoritolerans*. Considering the results of VITEK-2 testing, it was determined that these isolates were *B. simplex*. *Bacillus simplex* was isolated from *Thaumetopoea pityocampa* (İnce et al. 2008) and *Gryllotalpa gryllotalpa* (Sezen et al. 2013). The OL -5 isolate caused 63% mortality of *P. luteola* and 43% of *G. mellonella*. Also, isolate L-10 caused 67% mortality of *P. luteola* and 33% of *G. mellonella* but caused no deaths of *T. molitor*. *B. simplex* caused 75% mortality of *G. gryllotalpa* nymphs (Sezen et al. 2013).

Isolate L-7 was identified as *Bacillus pumilus*, based on both 16S rDNA sequence analysis and the results of the API and VITEK-2 assay testing. The negative results of the nitrate-nitrite, starch hydrolysis and indole tests confirmed that this isolate was *B. pumilus*. This species had been earlier isolated from many insect species such as *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Dantur et al. 2015). It caused 77% mortality of *P. luteola* and 13% to *G. mellonella*. A soil isolate of *B. pumilus* caused 95.7% mortality of *Leptinotarsa decemlineata* (Say) larvae (Coleoptera: Chrysomelidae) (Ertürk et al. 2008).

The results of 16S rDNA sequencing suggested that the E-3 isolate could have been *Bacillus stratosfericus*, *B. pumilus*, *B. safensis* or *B. aerophilus*. Based on the API results, it was determined to be *G. thermoglucosidasius*. However, the VITEK-2 panel system was unable to identify this isolate. Based on all of the test results, it was identified as *B. safensis*. This species was first isolated from far-field space (Satomi et al. 2006). Later, Tomova et al. (2013) isolated it from a cave in Bulgaria. It caused 63% mortality of *P. luteola* and 20% of *G. mellonella*. It also caused 80% mortality of *Sesamia nonagrioides* (Eski et al. 2015).

After considering the preliminary results from 16S rDNA analysis, and VITEK-2 and API test results, it was determined that the isolate OL-3 could be *Bacillus aryabhatai* or *B. megaterium*. However, after looking at the biochemical

properties of the isolate, it was identified as *B. aryabhatai*, based on the positive gelatinase, VP (Voges-Proskauer) and starch hydrolysis tests. In a previous study, it was isolated from *Oryctes rhinoceros* (Sari et al. 2016). In the current study, this isolate caused 63% mortality of *P. luteola* and 10% mortality of *G. mellonella*.

16S rDNA sequencing and VITEK-2 system analysis showed that isolate E-2 could be *Klebsiella oxytoca* or *Raoultella terrigena*. Based on all the results of biochemical testing, this isolate was identified as *K. oxytoca*. It had been previously isolated from *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Dantur et al. 2015). This isolate caused 50% and 13% mortality of the larvae of the elm leaf beetle and honeycomb, respectively.

The L-3 isolate was identified as *Enterobacter cloacae*, based on the results of API and VITEK-2 testing, and 16S rDNA sequence analysis. This bacterium had been isolated from some pests, such as *Bombyx mori* (Watanabe & Sato, 1998), *Heliothis armigera* (Hübner), *Agrotis segetum* (Lipa & Wiland 1972) and *Melolontha melolontha* (Sezen et al. 2001). It caused mortality of 20% and 40% of elm leaf beetle larvae and *M. melolontha* larvae, respectively (Sezen et al. 2001).

16S rDNA sequencing of the L-8 isolate revealed it to be *Paenibacillus xylanilyticus*, *P. illinoisensis* or *P. pabuli*. According to the results of API and VITEK-2 system testing, it was *P. polymyxa* and *P. glucanolyticus*, respectively. Considering the results of all tests, this isolate was identified as *P. xylanilyticus*. *Paenibacillus* species are found in soil, water and insect larvae (Daane et al. 2002). It was isolated from *G. gryllotalpa* and found to cause 67% mortality of *P. luteola* and 13% mortality of *G. mellonella* (Sezen et al. 2013).

Finally, isolate L-1 showed high similarity with *Raoultella terrigena*, *R. variicola* and *R. ornithinolytica*, according to 16S rDNA sequence analysis; *R. terrigena* according to the API results; and *R. ornithinolytica*, according to VITEK-2 results. It was determined to be a Gram-negative, spore-free bacterium with a low activity level. Based on all test results, it was identified as *R. terrigena*. This species has been isolated from *Dendroctonus rhizophagus* and *D. valens* (Morales-Jimenez et al. 2013). This L-1 isolate caused 53% mortality of *P. luteola*.

## Conclusions

In this study, 21 bacterial isolates were isolated from the larvae and adults of *C. tenebrionis*, a destructive pest of stone fruit orchards. The biochemical, molecular, morphological, physiological, and characteristics of the isolates were determined. Isolates E-5 and E-6 (*Bacillus cereus*) had the highest lethal effect (87%) on *P. luteola*, while OL-4 (*Bacillus cereus*) had the highest lethal effect on both *G. mellonella* and *T. molitor*. Thus, these three isolates appear to have the most potential to be used against coleopteran and lepidopteran pests of agriculture. Field

testing of the isolates against pests in the field would help determine whether their laboratory success translates to field success. Separately, studies on different groups of insect pests are still needed.

## References

- Abbott W. S., 1925. A method of computing of effectiveness of insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18:265–267.
- Ambrosini A., F. H. Sant’Anna, R. de Souza, M. Tadra-Sfeir, H. Faoro, S. M. Alvarenga, F. O. Pedrosa, E. M. Souza & L. M. P. Passaglia, 2015. Genome sequence of *Bacillus mycoides* B38V, a growth-promoting bacterium of sunflower. *Genome Announcement*, 3:e00245-15.
- Bargabus R., N. Zidack, J. Sherwood & B. Jacobsen, 2002. Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 61:289–298.
- Beegle C. C. & T. Yamamoto, 1992. Invitation Paper (C. P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development, *Canadian Entomologist*, 124: 587- 616.
- Ben-Dov E., A. Zaritsky, E. Dahan, Z. Barak, R. Sinai, R. Manasherob, A. Khameraev, E. Troitskaya, A. Dubitsky, N. Berezina & Y. Margalith, 1997. Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Applied Environmental Microbiology*, 63:4883-4890.
- Ben-Dov E., S. Boussiba & A. Zaritsky, 1995. Mosquito larvicidal activity of *Escherichia coli* with combinations of genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Journal of Bacteriology*, 177: 2851–2857.
- Benson H. J., 1985. Microbiological Applications, a Laboratory Manuel in General Microbiology, Brock, Fourth Edition, Wm C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa.
- Ben-Yehuda S., A. Assal & Z. Mendel, 2000. Improved chemical control of *Capnodis tenebrionis* and *C. carbonaria* in stone-fruit plantations in Israel. *Phytoparasitica*, 28:27–41.
- Bradford M. M., 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248–254.
- Bronskill J. K., 1961. A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae). *Journal of the Lepidopterists’ Society*, 15: 102-104.
- Burges H. D. & J. A. Hurst, 1977. Ecology of *Bacillus thuringiensis* in storage moths. *Journal of Invertebrate Pathology*, 30: 131-139.
- Caldeira A. T., S. S. Feio, J. M. S. Arteiro, A. V. Coelho & J. C. Roseiro, 2007. Environmental dynamics of *Bacillus amyloquelaciens* CCMI 1051 anti-fungal activity under different nitrogen patterns. *Journal of Applied Microbiology*, 104:806-816.
- Cappuccino J. G. & N. Sherman, 1992. Microbiology, a Laboratory Manual, Third Edition, Rockland Community College, Suffern, New York.

- Carozzi N. B., V. C. Kramer, G. W. Warren, S. Evola & M. G. Koziel, 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 3057-3061.
- Claus M. 1992. A standardized Gram staining procedure. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8:451-452.
- Daane L. L., I. Harjono, S. M. Barns, L. A. Launen, N. J. Palleroni & M. M. Häggblom, 2002. PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52:131-139.
- Dantur K. I., R. Enrique, B. Welin & A. P. Castagnaro, 2015. Isolation of cellulolytic bacteria from the intestine of *Diatraea saccharalis* larvae and evaluation of their capacity to degrade sugarcane biomass. *AMB Express*, 25 (5): 15.
- De Souza P. C., A. T. Morey, G. M. Castanheira, K. P. Bocate, L. A. Panagio, F. A. Ito, M. C. Furlaneto, S. F. Yamada-Ogatta, I. N. Costa, H. M. Mora-Montes & R. S. Almeida, 2015. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. *Journal of Microbiological Methods*, 118: 182-6.
- Demeli M., Z. Demirbağ & K. Sezen, 2014. Isolation and characterization of *Bacillus* from some warehouses in Trabzon. *Journal of Applied Biological Sciences*, 8(2):69-80.
- Ertürk O., M. Yaman & I. Aslan, 2008. Effects of four *Bacillus* ssp. of soil origin on the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Entomological Research*, 38: 135-138.
- Eski A., F. Özkan Çakıcı, M. Güllü, H. Muratoğlu, Z. Demirbağ & İ. Demir, 2015. Identification and pathogenicity of bacteria in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* Lefebvre (Lepidoptera: Noctuidae), *Turkish Journal of Biology*, 39: 31-48.
- Gao H., G. Qi, R. Yin, H. Zhang, C. Li & X. Zhao, 2016. *Bacillus cereus* strain S2 shows high nematicidal activity against *Meloidogyne incognita* by producing sphingosine. *Scientific Reports*, 6: 28756.
- Grau T., A. Vilcinskas & G. Joop, 2017. Sustainable farming of the mealworm *Tenebrio molitor* for the production of food and feed. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 72 (9-10): 337-349.
- Hall T. A., 1999. Bio Edit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/Nt. *Nucleic Acids Symposium*, 41: 95-98.
- İnce I. A., H. Katı, H. Yılmaz, İ. Demir & Z. Demirbağ. 2008. Isolation and identification of bacteria from *Thaumetapoea pityocampa* Den. And Schiff. (Lep., Thaumetapoeidae) and determination of their biocontrol potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 3005-3015.
- Kaelin P., P. Morel, & F. Gadani, 1994. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma serricornis* (F.). *Applied Environmental Microbiology*, 60: 19-25.
- Katı H., K. Sezen, R. Nalcacioglu & Z. Demirbag, 2007. A highly pathogenic strain of *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* in lepidopteran pests. *The Journal of Microbiology*, 45: 553-557.

- Laemmli U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
- Lipa J. J. & E. Wiland, 1972. Bacteria isolated from cutworms and their infectivity to *Agrotis* spp. *Acta Microbiologica Polonica*, 4: 127–140.
- Morales-Jiménez J., A. Vera-Ponce de León & A. García-Domínguez, 2013. Nitrogen-fixing and uricolytic bacteria associated with the gut of *Dendroctonus rhizophagus* and *Dendroctonus valens* (Curculionidae: Scolytinae). *Microbial Ecology*, 66: 200-210.
- Muratoğlu H., K. Sezen & Z. Demirbağ, 2011. Determination and pathogenicity of the bacterial flora associated with the spruce bark beetle, *Ips typographus* (L.) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Turkish Journal of Biology*, 35: 19–20.
- Neher O. T., M. R. Johnston, N. K. Zidack & B. J. Jacobsen, 2009. Evaluation of *Bacillus mycoides* isolate BmJ and *B. mojavensis* isolate 203-7 for the control of anthracnose of cucurbits caused by *Glomerella cingulata* var. *orbiculare*. *Biological Control*, 48: 140–146.
- Perchat S., C. Buisson, J. Chaufaux, V. Sanchis, D. Lereclus & M. Gohar, 2005. *Bacillus cereus* produces several non proteinaceous insecticidal exotoxins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90: 131–133.
- Poinar G. O. & G. M. Thomas, 1978. Diagnostic Manual for the Identification of Insect Pathogens. New York, NY, USA: Plenum Press.
- Prescott L. M., J. P. Harley & D. A. Klein, 1996. Microbiology. Dubuque, IA, USA: William C. Brown Publishers.
- Ramasubburayan R., S. Titus, P. Kumar, G. Immanuel & A. Palavesam, 2017. Antifouling activity of marine epibiotic bacterium *Bacillus flexus* APGI isolated from Kanyakumari Coast, Tamilnadu, India. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 46 (07): 1396-1400.
- Ruiu L., G. Falchi, I. Floris, M. G. Marche, M. E. Mura & A. Satta, 2015. Pathogenicity and characterization of a novel *Bacillus cereus sensu lato* isolate toxic to the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* Wied. *Journal of Invertebrate Pathology*, 126: 71–77.
- Sari S. L. A., A. Pangastuti, A. Susilowati, T. J. Purwoko, E. Mahajoeno, W. Hidayat, I. Mardhena, D. F. Panuntun, D. Kurniawati & R. Anitasari, 2016. Cellulolytic and hemicellulolytic bacteria from the gut of *Oryctes rhinoceros* larvae. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 17: 78–83.
- Satomi M., M. T. La Duc & K. Venkateswaran, 2006. *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 1735–1740.
- Sevim A., Z. Demirbağ & İ. Demir, 2010. A new study on the bacteria of *Agrotis segetum* Schiff. (Lepidoptera: Noctuidae) and the insecticidal activities. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 34: 333–342.
- Sezen K., İ. Demir & Z. Demirbağ, 2001. Identification and insecticidal effects of bacteria isolated from pests of hazelnut, Proceedings of the 1st Eurasian Congress on Molecular Biotechnology, 17-20 Sep, Trabzon, Turkey, 146–148.
- Sezen K., Ş. İşçi, H. Muratoğlu, K. İnan & Z. Demirbağ, 2013. Identification and pathogenicity of bacteria from *Gryllotalpa gryllotalpa* L. (Orthoptera: Gryllotalpidae). *Turkish Journal of Biological Control*, 4 (2): 89-108.



- Shaerif F. A. & N. G. Alaeddinoğlu, 1988. A rapid and simple method for staining of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Industrial Microbiology*, 3: 227–229.
- Sneath P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt, 1986. Regular, nonsporing gram-positive rods (Editors: Kandler O., Weiss N.,) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, MD, USA: Williams and Wilkins, 1208–1260.
- Steinhaus E. A., 1947. *Insect Microbiology*. Comstock Publishing Co. Inc., Ithaca, New York, 768 s.
- Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar, 2011. MEGA5: Molecular evolution and genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731–2739.
- Tomova I., I. Lazarkevich, A. Tomova, M. Kambourova & E. V. Tonkova, 2013. Diversity and biosynthetic potential of culturable aerobic heterotrophic bacteria isolated from Magura Cave, Bulgaria. *International Journal of Speleology*, 42 (1): 65-67.
- Vilas-Boas G., V. Sanchis, D. Lereclus, M. V. F. Lemos & D. Bourguet, 2002. Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1414–1424.
- Vit K., 2004. Fauna Europaea: Buprestidae. In: Alonso-Zarazaga M. A. (ed.) *Fauna Europaea: Coleoptera*. Fauna Europaea version 1.1. <http://www.faunaeur.org>.
- Wang X. & H. Zhao, 2013. Isolation and characterization of a *Bacillus flexus* strain used in alkaline wastewater treatment. *Advanced Materials Research*, 750-752: 1381–1384.
- Watanabe K. & M. Sato, 1998. Plasmid-mediated gene transfer between insect-resident bacteria, *Enterobacter cloacae*, and plant-epiphytic bacteria, *Erwinia herbicola* inguts of silkworm larvae. *Current Microbiology*, 37: 352–355.
- Weisburg W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier & D. J. Lane, 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173: 697–703.

*Original article (Özgün makale)*

**Effects of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, with adipokinetic hormone, on *Myzus persicae* and *Trialeurodes vaporariorum***

İsmail KARACA<sup>1</sup>, Özlem GÜVEN<sup>2\*</sup>, Umesh Kumar GAUTAM<sup>3</sup>, Tuğçe ÖZEK<sup>4</sup>

**Entomopatojen fungus, *Beauveria bassiana*'nın *Myzus persicae* ve *Trialeurodes vaporariorum* üzerindeki etkisinin adipokinetik hormon ile artırılması**

**Öz:** Bu çalışmanın amacı, adipokinetik hormon (AKH) ile birlikte uygulanan entomopatojen fungusların etkilerini araştırmaktır. Adipokinetik hormon ile tek ve kombine uygulanan *Beauveria bassiana* izolatları yeşil şeftali yaprak biti, *Myzus persicae* ve sera beyazsineği *Trialeurodes vaporariorum* üzerinde test edilmiştir. *M. persicae*'nin *T. vaporariorum*'a göre uygulamaya daha duyarlı olduğu bulunmuştur. *M. persicae* üzerinde BMAUM M6-4 ve BMAUM LD 2016'nın tek ve hormon ile birlikte uygulamasında sırasıyla %58, %67, %95 ve %95 ölüm oranı görülmüştür. Aynı şekilde *T. vaporariorum*'a bu fungusların tek ve hormon ile birlikte uygulanması sonucu sırasıyla %44, %68 ve %45, %78 oranında ölüm gözlenmiştir. *M. persicae* ve *T. vaporariorum*'da Bovine Serum Albumin (BSA) standardı ile 595 nm'de ölçülen protein seviyesi, BMAUM M6-4+AKH uygulamasında en yüksek besin mobilizasyonunu ortaya çıkarmıştır. Adipokinetik hormon tedavisinde karbonhidrat (glukoz) düzeyinin kontrol grubuna göre biraz arttığı bulunmuştur. En düşük glukoz düzeyi entomopatojen fungus uygulamasında ölçülmekle birlikte, en yüksek düzey adipokinetik hormon tedavisi ile birlikte *B. bassiana* izolatlarında saptanmıştır. Entomopatojen funguslarla uygulanan AKH'nin etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Bu nedenle, böceklere karşı gelecekteki entegre yönetim stratejileri için bu alanda yapılacak daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar sözcükler:** Adipokinetik hormon, *Beauveria bassiana*, Entomopatojen fungus, *Myzus persicae*, *Trialeurodes vaporariorum*

<sup>1</sup> Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Isparta University of Applied Sciences, Isparta, Türkiye

<sup>2</sup> Department of Biology, Faculty of Science and Letters, Kahramanmaraş Sütçü İmam University, Kahramanmaraş, Türkiye

<sup>3</sup> Biology Centre, CAS, and Faculty of Science, Institute of Entomology, University of South Bohemia, Branišovská, České Budějovice, Czech Republic

<sup>4</sup> Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Isparta University of Applied Sciences, Isparta, Türkiye (This Author is a 100/2000 YÖK PhD Scholar)

\* Corresponding author (Sorumlu yazar): ozlemk@ksu.edu.tr

ORCID ID (Yazar sırasıyla) : 0000-0002-0975-789X; 0000-0002-1775-8323; 0000-0001-6322-9839; 0000-0002-9787-442X

Received (Alınış): 15 Haziran 2023

Accepted (Kabul ediliş): 11 Ekim 2023

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the effects of the co-application of entomopathogenic fungi (EMFs) and adipokinetic hormone (AKH) on the green peach aphid, *Myzus persicae*, and the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*. Single and combined applications of two *Beauveria bassiana* isolates with AKH were tested. The green peach aphid was more susceptible to treatments than the greenhouse whitefly. Mortality rates of 58%, 67%, 95%, and 95% were observed for the single and combined applications of BMAUM M6-4 and BMAUM LD 2016, respectively, against *M. persicae*. The application of these fungi singly and in combination with AKH against *T. vaporariorum* caused mortality rates of 44%, 68% and 45% and 78%, respectively. The protein level measured at 595 nm with the standard, Bovine Serum Albumin (BSA), for *M. persicae* and *T. vaporariorum* revealed that the highest level of nutrient mobilization was for the BMAUM M6-4+AKH treatment. The level of carbohydrate (glucose) was slightly higher in the AKH treatments when compared to the control group. The lowest glucose level was measured for the entomopathogenic fungi application, and highest level was determined for the isolates combined with AKH. The mechanism of action of AKH applied with *B. bassiana* isolates is not fully understood. Therefore, more detailed studies are needed in this area to determine the potential of this promising approach for inclusion in IPM programs for the control of these insect pests.

**Key words:** Hormone, *Beauveria bassiana*, Entomopathogenic fungi, *Myzus persicae*, *Trialeurodes vaporariorum*

## Introduction

The rapid growth of the global population has increased the demand for agricultural products and the importance of pest control has grown in response. Chemicals applied to control insect pests have brought many problems in terms of environmental and human health. Sustainable agriculture and ecological agriculture have become more popular and reconizeded by the public to restore ecological balance and to minimize the use of chemicals. The demand for products that do not contain pesticide residues and the new laws and regulations introduced by the European Union have been effective as a driving force in the application of biological control methods to reduce the amount of pesticide applications (EFSA 2021).

Biological control, which is an important part of integrated pest management (IPM) programs, utilizes predation, parasitism, herbivory, and pathogenicity against insects, mites, other pests and plant diseases. Among the pathogens, myco-biocontrol is the use of fungi to lower the pest density before crop damage the economic threshold. Many insect groups may be infected by over 700 species of fungi recorded as pathogenic. Entomopathogenic fungi (EMFs) such as *Metharizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin, and *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. are well characterized with respect to pathogenicity against several insects,

and have been used for the control of agricultural pests worldwide (Lacey et al. 2001).

Many studies have shown that the insect endocrine system, particularly various insect neuropeptides, can be used as potential and specific physiological targets for pest control, predominantly adipokinetic hormone (AKH) (Gäde & Goldsworthy 2003; Hoffmann & Lorenz 1998; Rayne & O'Shea 1997; Roeder 1999). The mechanisms responsible for neuropeptides synthesis; their transport, secretion, binding; and various physiological aspects offer numerous opportunities for a new neuropeptide-based insect control strategy. Insect stress neurohormones appear to be particularly suitable for this purpose due to their roles in physiological processes. This is because stress conditions, such as starvation, injury, poisoning, infection and intense activity, cause severe metabolic stress and the requirements of animals under these stress conditions are basically similar, i. e., they must activate their energy stores to eliminate or minimize the effects of the stressor or stresses (Gäde & Goldsworthy 2003; Kodrík et al. 2015).

Insect metabolism is predominantly controlled by the adipokinetic hormones (AKHs) belonging to the AKH/RPCH peptide family. This hormone is synthesized, stored and released by neurosecretory cells in the corpora cardiaca (CC), a neuroendocrine gland associated with the brain. One of the most important functions of AKHs is to control the energy part of insect metabolism. In general, they act as typical stress hormones by activating the metabolism of lipids, carbohydrates and/or certain amino acids to store more energy. Among other functions, the AKHs stimulate the heart rate (Scarborough et al. 1984), regulate general body movements (Kodrík et al. 2002) and starvation-induced foraging behavior (Lee & Park 2004); participate in the activation of antioxidant mechanisms (Kodrík et al. 2007), enhance food intake and digestive processes in the insect gut (Kodrík et al. 2012; Bodláková et al. 2017), and also interact with the humoral and cellular immune systems (Goldsworthy et al. 2002). In terms of usage, AKHs show their effects after penetrating the insects cuticle (Kodrík et al. 2002; Lorenz 2003).

Interestingly, recent studies have shown that AKHs have an adverse effect on the defence reactions against insecticidal stress (Plavšín et al. 2015). The co-application of insecticides with AKH increased the insect mortality in comparison to that induced by the insecticides singly. Co-application of AKH with permethrin (Kodrík et al. 2010) and endosulfan and malathion (Velki et al. 2011) against *Pyrrhocoris apterus* (Linnaeus, 1758) (Heteroptera: Pyrrhocoridae), and pirimiphos-methyl and deltamethrin (Plavšín et al. 2015) against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae), caused significant mortality. The mechanism underlying the interaction of AKH with insecticides to increase insect mortality is not currently understood; however, it has been suggested that an

increase in insect metabolism after AKH treatment might play a role (Kodrík et al. 2015). Increasing metabolism may cause easier and faster penetration of insecticides to the tissues and cells. This hypothesis was supported by the determination of metabolic density. Higher carbon dioxide production was measured after insecticide application with AKH than after insecticide application singly (Kodrík et al. 2015).

Entomopathogens pose a serious threat to insects. Therefore, insects develop several defense mechanisms that help protect them, or at least reduce the impact of this type of stress. A similar insect response was observed between the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Ibrahim et al. 2017) and the entomopathogenic fungus, *Isaria fumosorosea* (Gautam et al. 2020a,b), in combination with AKH. The synergy of entomopathogenic fungi with AKH seems to be very promising.

The main goal of this study was to demonstrate whether the application of external AKHs significantly enhances the efficacy of the entomopathogenic fungus, *B. bassiana*, against the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), and the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Westw.) (Hemiptera: Aleyrodidae).

## Materials and Methods

### Insect rearing

Two insect species, the green peach aphid, *M. persicae*, and the greenhouse whitefly, *T. vaporariorum*, were used in this study. *Myzus persicae* and *T. vaporariorum* were reared on pepper plants and eggplants, respectively, at  $25 \pm 1$  °C, and  $65 \pm 5\%$  RH and 16: 8 hours Light: Dark (L: D) in separate insect rearing rooms. In order to maintain the colonies, the old pepper plants and eggplants were replaced with clean plants from the plant rearing room every week.

### Fungal strains and preparation of inoculum

The strain of the entomopathogenic fungus, *B. bassiana* (BMAUM M6-4), used in this study was isolated from soil samples in Isparta Province, Türkiye (Baydar et al. 2016), by using the "Galleria trap method" (Zimmermann 1986). The other *B. bassiana* isolate, BMAUM LD 2016, was isolated from adult *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) collected from the campus of Süleyman Demirel University in, Isparta, Türkiye.

Conidia from 2-3 weeks-old fungal culture were harvested in 30 ml of 0.03% w/v Aqueous Tween® 80 and conidial concentration was determined by using a Thoma haemocytometer. The final concentration was adjusted to  $1 \times 10^7$  conidia/ml in 100 ml of 0.03% w/v Aqueous Tween® 80. Conidial viability was

determined by inoculating a  $1 \times 10^5$  conidia/ml spore suspension on Potato dextrose agar (PDA) and evaluating the germination of 100 spores after 24 h of incubation at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Conidia viability always exceeded 90% for both strains of *B. bassiana*.

### **Adipokinetic hormone (AKH)**

The adipokinetic hormone, Acypi-AKH: pGlu-Val-Asn-Phe-Thr-Pro-Thr-Trp-Gly-Gln-NH<sub>2</sub> (Jedlička et al. 2012) used in this study was provided by Prof. Dalibor Kodrík (Institute of Entomology ASCR, Biology Center, České Budějovice, Czech Republic).

### **Insect treatment with entomopathogenic fungi and adipokinetic hormone**

The leaf dipping method was used for application of the entomopathogenic fungal spores for testing against *M. persicae*. Clean pepper leaves were dipped for 5 seconds in the  $1 \times 10^7$  conidia/ml spore suspension and dried on filter paper. Spore treated leaves were placed in Petri dishes containing 12-15 ml of sterile water agar (2%, w/v) to minimize dehydration of the leaves. Ten nymphs were transferred to each leaf and one hour after contact with the fungal spores, 2  $\mu\text{l}$  of Acypi-AKH (80 pmol of Acypi-AKH in 20% methanol of Ringer's solution) was dropped on each nymph with a fine tipped brush.

The insect treatments were entomopathogenic fungus singly, entomopathogenic fungus with AKH, AKH singly, and control. Each trial was conducted with five replications, and all trials were repeated at least twice on different dates using different fungal cultures and insect generations.

For the control group, sterile distilled water with 0.03% w/v Tween<sup>®</sup> 80 was used in the application of the *B. beauveria* strain, and 2  $\mu\text{l}$  solvent was used in the hormone application. The experiments were carried out in a climate chamber (Termaks<sup>®</sup>) at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  temperature,  $60 \pm 5\%$  humidity and 16: 8 hours L:D periods. Dead and living individuals of the insects were recorded daily.

Before the application of treatments, ten adult greenhouse whiteflies, were released into mesh tent cages with clean tomato plants to stimulate egg laying. After ten days, the tomato leaves containing the same age nymphs were used in the treatments. Entomopathogenic fungi were applied to *T. vaporariorum* by using the leaf dipping method, as previously mentioned (Gautam et al. 2020a). However, leaves with nymphs were used instead of clean ones. The excess insects were removed to leave ten nymphs on each leaf. The same treatments and conditions mentioned above for *M. persicae* were applied to *T. vaporariorum*.

### **Nutrient Levels**

Nutrient availability plays an important role in regulating insect growth and controlling insect homeostasis. The analysis of nutrient levels in the bodies of

insects infected with entomopathogenic fungi was performed with the following kit and the protocol determined by the manufacturer; the level of protein was measured with The Bicinchoninic Acid Protein Test Kit (Sigma Aldrich) (Stoscheck 1990) and the Bovine Serum Albumin (BSA) was used as the standard. Protein readings were performed at 595 nm (T80 UV / VIS Spectrometer, PG Instruments Ltd).

In the experiments, 5 aphids and 10 whitefly individuals were used for each replication. One hour after treatment with the EMF, 2 µl of Acypi-AKH (80 pmol of Acypi-AKH hormone) was applied on the top of each insect. These insects were then homogenized in potassium phosphate solution (PBS) (pH 7.0). Ten µl of this solution was transferred to an Eppendorf tube for each individual; the insects were crushed with a plastic crusher and centrifuged at +4 °C 10000 g for 10 minutes. The supernatants were used for the assays. Samples were stored at -20 °C until they were processed.

#### **Digestive enzyme activity**

For the activity of digestive enzymes, the glucose level was determined, and for this determination only the *B. bassiana* (BMAUM LD 2016) isolate and AKH were applied, as described earlier. Thirty aphids and thirty whiteflies were removed one hour after application and placed in 1.5 ml Eppendorf tubes containing 80% methanol and 1% HCL. The glucose level was analyzed with a SHIMADZU HPLC (RID 10A detector, Aminex HPX-87C carbohydrate column), and the results were obtained in mg/g.

#### **Data Analyses**

The statistical analyses were performed with use of the SPSS (ver. 17) and JMP (ver. 8) package programs. The data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) and subsequently the Tukey test to compare each treatment. Insect mortalities were corrected according to Abbott's formula (Abbott 1925), and percentage mortalities were calculated. Probit analysis on the median lethal time (LT<sub>50</sub>) of the *B. bassiana* isolate's application singly and combined with AKH, were calculated. Statistically significant difference was established at the level of P < 0.05.

## **Results**

#### **The effect of entomopathogenic fungal isolates and AKH hormone**

The effects of two isolates of the EMF, *B. bassiana*, on the green peach aphid (*M. persicae*) and the greenhouse whitefly (*T. vaporariorum*), were observed from the

second day after application (Figure 1). The treatment effects of the isolates and a the hormone on the two insects are presented in Tables 1 and 2.

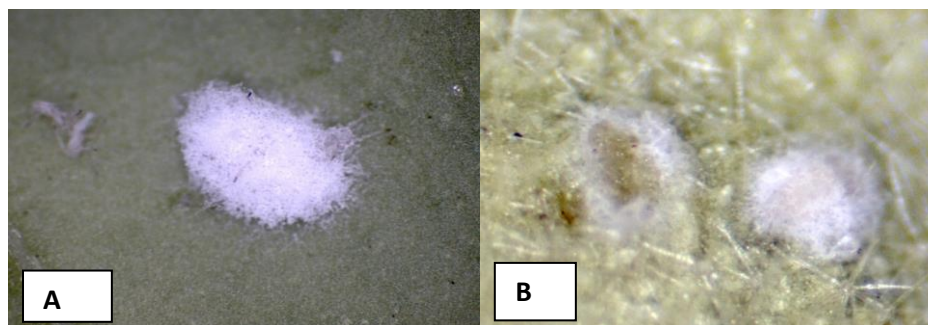


Figure 1. The effects of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on the green peach aphid (*Myzus persicae*) (A) and the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) (B).

Application of the two *B. bassiana* isolates singly and together with AKH were very effective against the green peach aphid (Table 1). On the 1st day after treatments, mortality was observed to increased over time. After 48 hrs, all applications, including the control, were included in the same statistical group. After 72 hrs, the EMF singly and entomopathogenic fungus with AKH application had more effect on the insect pests, and mean mortality was significantly different between the hormone and control treatment. After 192 hrs, the highest mortalities were observed for the *B. bassiana* isolate, BMAUM LD 2016, and for BMAUM LD 2016 with AKH. There was no significant difference between the AKH and control treatments (Table 1).



Table 1. The mean number of dead nymphs ( $\pm$  SE) of the green peach aphid, *Myzus persicae*, after the application of two *Beauveria bassiana* (isolates singly and with the hormone, AKH singly).

Treatments <sup>a</sup>	Mortality of Nymphs							
	24 hrs*	48 hrs	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
BMAUM M6-4	0.2 $\pm$ 0.2 a	2.5 $\pm$ 1.0 a	3.2 $\pm$ 1.2 ab	3.9 $\pm$ 1.3 abc	4.0 $\pm$ 1.3 bc	5.6 $\pm$ 1.3 b	5.8 $\pm$ 1.3 b	6.5 $\pm$ 1.2 b
BMAUM M6-4 + AKH	0.2 $\pm$ 0.2 a	2.7 $\pm$ 0.9 a	4.4 $\pm$ 1.4 a	5.0 $\pm$ 1.4 ab	5.1 $\pm$ 1.3 ab	6.3 $\pm$ 1.5 ab	6.7 $\pm$ 1.6 ab	7.2 $\pm$ 1.0 ab
BMAUM LD 2016	0.2 $\pm$ 0.2 a	2.2 $\pm$ 0.7 a	4.5 $\pm$ 1.2 a	6.4 $\pm$ 0.9 a	7.3 $\pm$ 0.6 ab	8.5 $\pm$ 0.3 a	9.5 $\pm$ 0.2 a	9.6 $\pm$ 0.2 a
BMAUM LD 2016 + AKH	0.2 $\pm$ 0.2 a	3.0 $\pm$ 1.2 a	4.7 $\pm$ 1.0 a	7.6 $\pm$ 0.7 a	8.6 $\pm$ 0.4 a	8.7 $\pm$ 0.3 a	9.5 $\pm$ 0.3 a	9.6 $\pm$ 0.2 a
AKH	0.0 $\pm$ 0.0 a	0.0 $\pm$ 0.0 a	0.0 $\pm$ 0.0 b	0.3 $\pm$ 0.2 c	0.3 $\pm$ 0.3 d	1.0 $\pm$ 0.3 c	1.0 $\pm$ 0.3 c	1.3 $\pm$ 0.3 c
Control	0.0 $\pm$ 0.0 a	0.0 $\pm$ 0.0 a	0.0 $\pm$ 0.0 b	0.3 $\pm$ 0.3 c	0.3 $\pm$ 0.4 d	0.6 $\pm$ 0.4 c	0.8 $\pm$ 0.4 c	0.9 $\pm$ 0.3 c

\*Means within a column followed by the same lower case letter are not significantly different ( $P \geq 0.05$ ).

<sup>a</sup>BMAUM: Biological Control Research and Application Center, AKH: Adipokinetic Hormone

The two Turkish isolates of *B. bassiana* (EMPs) used in this study were very effective against the greenhouse whitefly and the green peach aphid. Applications of the entomopathogenic fungi with AKH caused higher mortality that was significantly different from the other treatments (Table 2).

Table 2. Mean number of dead nymphs ( $\pm$  SE) of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* after the application of two *Beauveria bassiana* isolates singly or with the hormone AKH singly on different days.

Treatments <sup>a</sup>	Mean Mortality of Nymphs						
	24hrs*	48hrs	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
BMAUM M6-4	0.0 $\pm$ 0.0 a	0.0 $\pm$ 0.0 a	0.6 $\pm$ 0.2 abc	1.2 $\pm$ 0.3 abc	3.0 $\pm$ 1.03 ab	3.8 $\pm$ 1.6 ab	4.4 $\pm$ 1.2 a
BMAUM M6-4 + AKH	0.0 $\pm$ 0.0 a	0.1 $\pm$ 0.1 a	1.4 $\pm$ 0.4 ab	3.8 $\pm$ 1.1 ab	4.6 $\pm$ 0.9 a	5.6 $\pm$ 1.3 a	6.8 $\pm$ 1.2 a
BMAUM LD 2016	0.0 $\pm$ 0.0 a	0.0 $\pm$ 0.0 a	0.9 $\pm$ 0.2 abc	1.5 $\pm$ 0.7 abc	3.5 $\pm$ 1.5 ab	3.9 $\pm$ 0.5 ab	4.5 $\pm$ 0.7 a
BMAUM LD 2016 + AKH	0.0 $\pm$ 0.0 a	0.6 $\pm$ 0.9 a	1.7 $\pm$ 0.6 a	4.6 $\pm$ 1.5 a	5.02 $\pm$ 1.7 a	5.8 $\pm$ 1.8 a	7.8 $\pm$ 1.4 a
AKH	0.0 $\pm$ 0.0 a	0.0 $\pm$ 0.0 a	0.2 $\pm$ 0.1 bc	0.2 $\pm$ 0.1 bc	0.2 $\pm$ 0.1 b	0.3 $\pm$ 0.2 b	0.3 $\pm$ 0.2 b
Control	0.0 $\pm$ 0.0 a	0.0 $\pm$ 0.0 a	0.04 $\pm$ 0.03 c	0.07 $\pm$ 0.07 c	0.1 $\pm$ 0.1 b	0.1 $\pm$ 0.1 b	0.1 $\pm$ 0.1 b

\*Means within a column followed by the same lower case letter are not significantly different ( $P \geq 0.05$ ).

<sup>a</sup>BMAUM: Biological Control Research and Application Center, AKH: Adipokinetic Hormone.

After calculating the effects of *B. bassiana* isolate (BMAUM LD 2016) singly and together with adipokinetic hormone as percentages, it was determined that mortality in the green peach aphid was significantly higher than in the greenhouse whitefly (Table 3). Also, the BMAUM M6-4 treatment involving green peach aphid nymphs showed significantly lower effects than the BMAUM LD 2016 treatments, singly and with AKH. For the nymphs of both insect species, the BMAUM M6-4 isolate combined with AKH showed higher and statistically significant effects ( $F = 59.98; 5.29, P \leq 0.05, df = 3$ ) than the single applications (Table 3).

Table 3. Percentage mortality of *Myzus persicae* and *Trialeurodes vaporariorum* 168 hrs after the application of entomopathogenic fungi singly and combined with the hormone, AKH.

Insect species	Percentage Mortality <sup>a</sup>					
	BMAUM M6-4	BMAUM M6-4 + AKH	BMAUM LD 2016	BMAUM LD 2016 + AKH	AKH	Control
<i>Myzus persicae</i>	58 ± 3 b*	67 ± 11 ab	95 ± 2 a	95 ± 11 a	10 ± 4 c	8 ± 3 c
<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	44 ± 13 a	68 ± 8 ab	45 ± 16 a	78 ± 8 a	3 ± 0.3 b	1 ± 0.2 b

\*Mean mortalities within a row followed by the same lower-case letter are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>a</sup>BMAUM: Biological Control Research and Application Center, AKH: Adipokinetic Hormone.

The effects of *B. bassiana* isolates singly or combined with AKH, depending on the elapsed time, were calculated by using regression curves and equations. For *M. persicae*, the  $LT_{50}$  values were 5.8, 4.8, 3.8 and 3.4 days for BMAUM M6-4, BMAUM M6-4 + AKH, BMAUM LD 2016 and BMAUM LD 2016 + AKH, respectively. For *T. vaporariorum*, the  $LT_{50}$  values were 7.8, 5.8, 7.5 and 2.5 days for BMAUM M6-4, BMAUM M6-4 + AKH, BMAUM LD 2016 and BMAUM LD 2016 + AKH, respectively.

### Protein levels

The total protein levels measured at 595 nm in *M. persicae* nymphs after the application of the *B. bassiana* isolates singly or combined with AKH are given in Figure 2. The lowest protein level was measured in the control group and that was followed by the AKH and BMAUM LD 2016 treatments. The protein level increased slightly in BMAUM LD 2016 + AKH, and the highest level was obtained in the BMAUM M6-4 + AKH treatment (Figure 2).

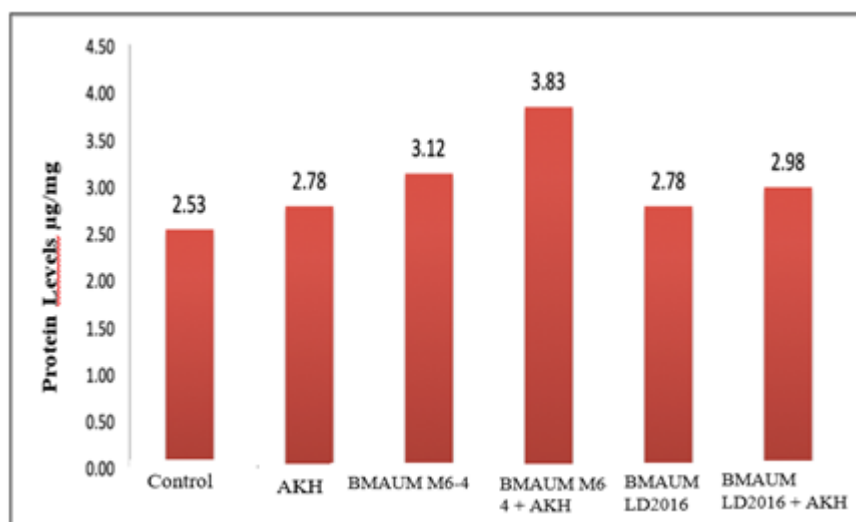


Figure 2. Total protein levels in *Myzus persicae* nymphs after the application of *B. bassiana* isolates singly or combined with AKH.

The protein levels in *T. vaporariorum* nymphs are presented in Figure 3. Quite similar levels were observed in *T. vaporariorum* nymphs, as were the protein levels in *M. persicae* nymphs, and the highest level was obtained for the BMAUM M6-4 treatment (Figure 3).

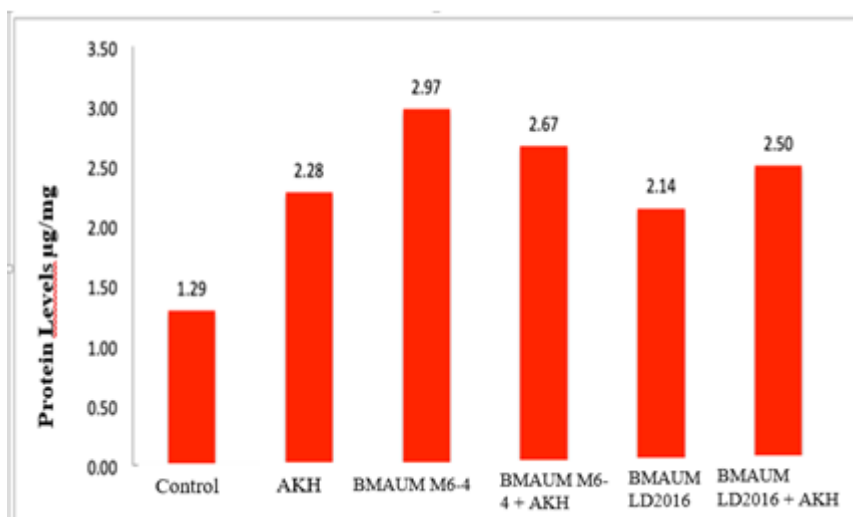


Figure 3. Total protein levels in *Trialeurodes vaporariorum* nymphs after the application of two *B. bassiana* isolates singly or combined with AKH.

#### Digestive enzyme activity

The activity levels of glucose enzymes across the treatments are presented in Figure 4. The glucose level was slightly higher in the AKH treatments than in the

control. The lowest glucose level was measured for the entomopathogenic fungal applications against the nymphs of both insect species, and the highest level was determined for the *B. bassiana* isolate combined with AKH, against *M. persicae* (Figure 4).

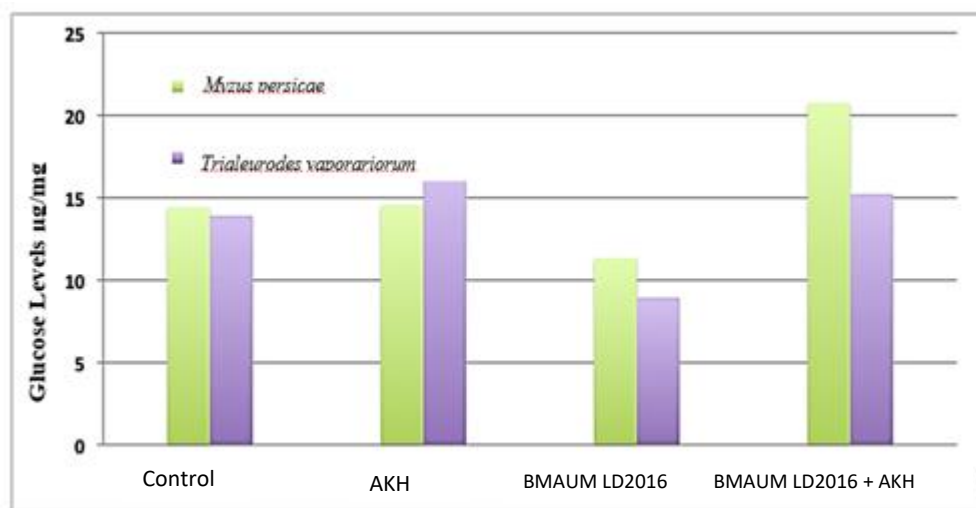


Figure 4. Total glucose levels measured in *Myzus persicae* and *Trialeurodes vaporariorum* treated with the *B. bassiana* isolate (BMAUM LD.2016) applied singly and combined with adipokinetic hormone (AKH).

## Discussion

Two local Turkish isolates (BMAUM M6-4 and BMAUM LD 2016) of the EMF, *B. bassiana*, collected in Isparta Province, Türkiye, were very effective against the important greenhouse pests, *M. persicae* and *T. vaporariorum*. The low  $LT_{50}$  values for these isolates raises the prospect of using them as microbial pesticides in IPM programs. Both the mortality rates and  $LT_{50}$  values revealed by this study are within the ranges of the values stated in the literature (Akmal et al. 2013; Kim et al. (2013). There are several reports about the effects of EMFs on aphids and whiteflies (Akmal et al. 2013, Kim et al. (2013); Jandricic et al. 2014; Quesada-Moraga et al. 2006). Testing 44 locally isolated entomopathogenic fungal and 4 commercially used isolates on the three aphid species *M. persicae*, *Aphis gossypii* Glover and *Aulacorthum solani* Kalténbach (Hemiptera: Aphididae), showed promising results. Moreover, the local isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae* were more effective than commercially available isolates (Jandricic et al. 2014). The use of *B. bassiana* on four aphid species (*Schizaphis graminum*, *Rhopalosiphum padi*, *Brevicoryne brassicae* and *Lipaphis erysimi*) produced  $LT_{50}$  values between 2.19 days and 3.73 days (Akmal et al. 2013). Also, similar results for the application of *Isaria* spp., *Lecanicillium* spp., *B. bassiana* and *Cordeceps* spp. on *M. persicae* were reported by Kim et al. (2013).

Studies conducted to test the control of *Bemisia tabaci* author and *T. vaporariorum* by 25 isolates of *B. bassiana* produced 3% to 85% mortality (Quesada-Moraga et al. 2006). In another study, *B. bassiana* caused 46.3% mortality of whitefly (Javed et al. 2019). Feng et al. (2004) investigated the effects of *B. bassiana* on *T. vaporariorum* under greenhouse conditions and recorded 72.1% mortality on the 10th day, 86.3% mortality on the 15th day, and 97.9% mortality on the 25th day.

In the present study, the synergistic effects of an entomopathogenic fungus and AKH were investigated. The study found that the hormone application increased to a certain extent the effect of entomopathogenic fungi after the first few days but the increase was not statistically significant. Although today difficulties in hormone supply and high cost limit the application of these entomopathogenic fungi and AKH together, this basic research can be built on infuture studies, venturing that the AKHs can be produced synthetically in the future.

Recently, some studies have focused on using insecticides, microorganisms and insect toxins in combination with AKHs (Goldsworthy et al 2002; Goldsworthy et al 2005; Kodrik et al. 2015; Shaik et al 2017; Ibrahim et al. 2018; Gautam et al. 2020a), and they found increased mortality in insects. Ibrahim et al. (2017) investigated the co-application of AKH and *Steinernema carpocapsae* against firebug, *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae) adults. The applications increased mortality by about 2.5 times within one day, and carbon dioxide production increased about 2.1 and 1.6 times compared to the control and only EPN-treated insects, respectively. The application of AKHs with the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, bacterium, *Bacillus megaterium*, and laminarin, against *Locusta migratoria* (Linnaeus, 1758) (Orthoptera: Acrididae), increased mortality in comparison to the use of the microorganisms singly (Goldsworthy et al. 2005; Mullen & Goldsworthy 2006). Similar results reported by Gautam et al. (2020a) also revealed that AKHs boosted the lethality of infection by the EMF, *Isaria fumosorosea*, of the cockroach, *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattodea: Blattidae).

## Conclusions

This current study demonstrated that the application of two *B. bassiana* isolates together with AKH and *T. vaporariorum*, compared to the application of the entomopathogenic fungal isolates singly. The mechanisms of AKH activity have not been clearly explained yet but it may play a role in increasing the metabolic rate and nutrient mobility in insects, which in turn increase the effects of entomopathogenic fungi. More studies need to be conducted to understand the physiological and biochemical modes of action of AKH in insects under stress situations. Overall, this study produced a useful body of information that can substantially contribute to the improvement of control strategies for two important pests in IPM programs bring interesting results potentially usable also in pest management strategies.

## Acknowledgements

This study was supported by grant No. 218O240 from The Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TUBITAK) 1002 and TUBITAK 2216 (U.K.G.). The authors thanks to personnel of the Plant Protection Department of Isparta University of Applied Sciences, Türkiye for their material and facility support. Special thanks to Dalibor Kodrík (Biology Centre, CAS, and Faculty of Science, Institute of Entomology, University of South Bohemia, Branišovská, České Budějovice, Czech Republic) for providing some materials and the insect hormone, AKH.

## References

- Abbott W. S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265–267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Akmal M., S. Freed, M. N. Malik & H. T. Gu, 2013. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hypomycetes) against different aphid species under laboratory conditions. *Pakistan Journal of Zoology*, 45(1): 71-78.
- 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.
- Bodláková K., P. Jedlička & D. Kodrík, 2017. Adipokinetic hormones control amylase activity in the cockroach (*Periplaneta americana*) gut. *Insect Science*, 24(2):259-269. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12314>
- EFSA, 2021. European Food Safety Authority, The 2019 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal*, 19(4), 6491. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6491>
- Feng G., B. Chen & H. Yin, 2004. Trials of *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* and imidacloprid for management of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) on greenhouse grown lettuce. *Biocontrol Science and Technology*, 14 (6): 531-544. <https://doi.org/10.1080/09583150410001682269>
- Gäde G. & G. J. Goldsworthy, 2003. Insect peptide hormones: a selective review of their physiology and potential application for pest control. *Pest Management Science*, 59: 1063-1075. <https://doi.org/10.1002/ps.755>
- Gautam U. K., A. Bohatá, H. A. Shaik, R. Zemek & D. Kodrík, 2020a. Adipokinetic hormone promotes infection with entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* in the cockroach *Periplaneta americana*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 229: 108677. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108677>
- Gautam, U. K., D. Hlávková, H. A. Shaik, I. Karaca, G. Karaca, K. Sezen, & D. Kodrík, 2020b. Adipokinetic hormones enhance the efficacy of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* in model and pest insects. *Pathogens*, 9(10):801. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100801>

- Goldsworthy G. J., D. Kodrık, R. Comley & M. Lightfoot, 2002. A quantitative study of the adipokinetic hormone of the firebug, *Pyrrhocoris apterus*. *Journal of Insect Physiology*, 48: 1103-1108. [https://doi.org/10.1016/s0022-1910\(02\)00203-2](https://doi.org/10.1016/s0022-1910(02)00203-2)
- Goldsworthy G. J., K. Opoku-Ware & L. M. Mullen, 2005. Adipokinetic hormone and the immune responses of locusts to infection. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1040: 106-113. <https://doi.org/10.1196/annals.1327.013>
- Hoffmann K. H. & M. W. Lorenz, 1998. Recent advances in hormones in insect pest control. *Phytoparasitica*, 26: 323-330.
- Ibrahim E., M. Hejníková, H. A. Shaik, D. Doležel & D. Kodrık, 2017. Adipokinetic hormone activities in insect body infected by entomopathogenic nematode. *Journal of Insect Physiology*, 98: 347-355. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.02.009>
- Ibrahim E., P. Dobeš, M. Kunc, P. Hyršl & D. Kodrık, 2018. Adipokinetic hormone and adenosine interfere with nematobacterial infection and locomotion in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 107: 167-174. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.04.002>
- Jandric S. E., M. Filotas, J. P Sanderson & S. P. Wraight, 2014. Pathogenicity of conidia-based preparations of entomopathogenic fungi against the greenhouse pest aphids *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, and *Aulacorthum solani* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 118: 34-46. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.02.003>
- Javed K., H. Javed, T. Mukhtar & D. Qiu, 2019. Efficacy of *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii* for the management of whitefly and aphid. *Journal of Agricultural Science*, 56 (3): 669-674. <https://doi.org/10.21162/PAKJAS/19.8396>
- Jedlička P., V. Steinbauerová, P. Simek & H. Zahradnickova, 2012. Functional characterization of the adipokinetic hormone in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 162: 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.02.004>
- Kim J., G. Jeong, J. H. Han & S. Lee, 2013. Biological control of aphid using fungal culture and culture filtrates of *Beauveria bassiana*. *Mycobiology*, 41(4): 221-224. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2013.41.4.221>
- Kodrık D., A. Bednárová, M. Zemanová & N. Krishnan, 2015. Hormonal regulation of response to oxidative stress in insects-an update. *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 25788-25816. <https://doi.org/10.3390/ijms161025788>
- Kodrık D., I. Bártu & R. Socha, 2010. Adipokinetic hormone (Pyrap-AKH) enhances the effect of a pyrethroid insecticide against the firebug *Pyrrhocoris apterus*. *Pest Management Science*, 66: 425-431. <https://doi.org/10.1002/ps.1894>
- Kodrık D., K. Vinokurov, A. Tomčala & R. Socha, 2012. The effect of adipokinetic hormone on midgut characteristics in *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera). *Journal of Insect Physiology*, 58, 194–204. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.11.010>
- Kodrık D., N. Krishnan & O. Habuštová, 2007. Is the titer of adipokinetic peptides in *Leptinotarsa decemlineata* fed on genetically modified potatoes increased by oxidative stress?. *Peptides*, 28: 974-980. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.01.017>
- Kodrık D., R. Socha & R. Zemek, 2002. Topical application of Pya-AKH stimulates lipid mobilization and locomotion in the flightless bug, *Pyrrhocoris apterus* (L.)

- (Heteroptera). *Physiological Entomology*, 27: 15-20. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3032.2002.00261.x>
- Lacey L.A., R. Frutos, K. H. Kaya & P. Vails, 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future. *Biological Control*, 21 (3): 230-248, 2001. <https://doi.org/10.1006/bcon.2001.0938>
- Lee G. & J. H. Park, 2004. Haemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 167: 311-323. <https://doi.org/10.1534/genetics.167.1.311>
- Lorenz, M. W., 2003. Adipokinetic hormone inhibits the formation of energy stores and egg production in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 136: 197–206. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(03\)00227-6](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00227-6)
- Mullen L. M. & G. J. Goldsworthy, 2006. Immune responses of locusts to challenge with the pathogenic fungus *Metarhizium* or high doses of laminarin. *Journal of Insect Physiology*, 52: 389-398. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.10.008>.
- Plavšín I., T. Stašková, M. Šery, V. Smykal, H. K. Hackenberger & D. Kodrík, 2015. Hormonal enhancement of insecticide efficacy in *Tribolium castaneum*: Oxidative stress and metabolic aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 170: 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.01.005>
- Quesada-Moraga E., E. A. A. Maranhao, P. Valverde-Garcia & C. Santiago-Alvarez, 2006. Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. *Biological Control*, 36: 274-287. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.09.022>
- Rayne R. C. & M. O'Shea, 1997. Neuropeptide biosynthesis: Possible molecular targets for the control of insect pests. *The ACS Symposium Series*, 658: 292-300.
- Roeder T., 1999. Octopamine in invertebrates. *Progress in Neurobiology*, 59:533-561.
- Scarborough R. M., G.C. Jamieson, S. J. Kalisz Kramer, G. A. McEnroe, C. A. Miller & D. A. Schooled, 1984. Isolation and primary structure of two peptides with cardioacceleratory and hyperglycaemic activity from the corpora cardiaca of *Periplaneta americana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81:5575-5579. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.17.5575>
- Shaik H. A., A. Mishra & D. Kodrík, 2017. Beneficial effect of adipokinetic hormone on neuromuscular paralysis in insect body elicited by braconid wasp venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 196: 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.02.011>
- Stoscheck C.M., 1990. Quantitation of protein. *Methods in Enzymology*, 182: 50-68.
- Velki M., D. Kodrík, J. Večera, B. K. Hackenberger & R. Soch, 2011. Oxidative stress elicited by insecticides: a role for the adipokinetic hormone. *General and Comparative Endocrinology*, 172: 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.12.009>.
- Zimmermann G., 1986. The 'Galleria bait method' for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology*, 102:213-215.





*Özgün makale (Original article)*

**Bağda Kurşuni Küf Hastalığı (*Botrytis cinerea* Pers.)'na karşı antagonist bakterilerle biyolojik mücadele**

**Biological control of Gray Mold Disease (*Botrytis cinerea* Pers.) of grapevine by antagonistic bacteria**

Mehmet YILDIZ<sup>1</sup>, Ümit ÖZYILMAZ<sup>2\*</sup>

**Abstract:** This study focused on isolating antagonistic bacteria from vineyard areas in Sarıgöl/Manisa Province and using them for biological control against Gray Mold Disease caused by *Botrytis cinerea*. Biological efficiencies of antagonists were investigated by *in-vitro* and *in-vivo* studies. The compatibilities of the antagonists with azoxystrobin and cyprodinil + fludioxonil, which are active ingredients of fungicides, were also examined. A total of 11 *B. cinerea* strains were isolated, and the B33 isolate was used as the most virulent disease isolate across the study. A total of 160 putative antagonistic bacterial isolates were obtained from healthy grape plants. Among them, 17 bacterial isolates inhibited mycelial growth of the fungal agent by between 6.8% and 80.1% in *in-vitro* dual culture tests. The antagonistic bacteria were *Bacillus halotolerans*, *B. licheniformis*, *B. safensis*, *B. subtilis*, *B. velezensis*, *Kosakonia cowanii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Of the 17 antagonists, 13 were *Bacillus* species, while seven of them were strains of *B. velezensis*. In plant studies conducted with the A7Len4, A1Len4 and A8Len1 isolates, an efficacy of between 71.43% and 80.96% against the disease was determined. All three antagonists were compatible with up to two applications of azoxystrobin.

**Keywords:** *Botrytis cinerea*, biological control, antagonist bacteria, *Bacillus velezensis*

**Öz:** Bu çalışmada; Manisa ili Sarıgöl ilçesi bağ alanlarından antagonist bakterilerin izolasyonu ve Kurşuni Küf Hastalığına (*Botrytis cinerea*) karşı biyolojik mücadelede kullanılabilen olanakları araştırılmıştır. *In-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarla biyolojik etkinliği araştırılan antagonistlerin ayrıca azoxystrobin ve cyprodinil + fludioxonil etkili maddeli fungisitler ile uyumluluğuna da bakılmıştır. Çalışmada 11 adet *B. cinerea* izolatu elde edilmiş ve en virulent B33 izolatu çalışmanın tamamında hastalık etmeni olarak kullanılmıştır. Sağlıklı bitkilerden 160 antagonist adayı bakteri izole edilmiştir. Aday bakteri izolatları arasında 17 bakteri izolatu *in-vitro* ikili kültür testlerinde fungal etmenin misel gelişimini %6.8-%80.1 arasında engellemiştir. Antagonist bakteri izolatları *Bacillus halotolerans*, *B. licheniformis*, *B. safensis*, *B. subtilis*, *B. velezensis*, *Kosakonia cowanii* ve *Pseudomonas aeruginosa* olarak tanımlanmıştır. On yedi antagonistten 13 tanesi *Bacillus* türleriyken, 7 tanesinin *B. velezensis* olduğu belirlenmiştir. A7Len4, A1Len4 ve A8Len1 izolatları ile yapılan bitki çalışmalarında, *B. cinerea*'a karşı %71.43-%80.96 arasında etki

<sup>1</sup> Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye

<sup>2</sup> Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Aydın, Türkiye

\*Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: uozyilmaz@adu.edu.tr

ORCID ID (Yazar sırasıyla): 0000-0003-3193-3324; 0000-0003-2314-9118

Alınış (Received): 23 Temmuz 2023

Kabul edilmiş (Accepted): 15 Eylül 2023

saptanmıştır. Bu üç antagonistin de azoxystrobin etkili fungusit ile arazi dozunun iki katına kadar uyumlu olduğu bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** *Botrytis cinerea*, biyolojik savaş, antagonist bakteri, *Bacillus velezensis*

## Giriş

Kurşuni Küf Hastalığı bağ dahil birçok bitkide verim kaybına neden olan ve *Botrytis cinerea* Pers (teleomorph: *Botryotinia fuckeliana*)'in neden olduğu fungal bir hastalıktır. Üzerinde birçok çalışmanın yapıldığı bu hastalık hem sofralık hem de şaraplık üzümlerde ciddi ürün kayıplarına neden olmakla birlikte sofralık üzümlerin ve şarapların kalitesini de bozmaktadır (Bavaresco et al. 1997; Kurt 2016).

Dünyada farklı sıcaklıktaki üzüm üretim bölgeleri de dahil olmak üzere, hem hasat öncesi hem de hasat sonrası verim kayıplarına neden olan en önemli hastalıklardan biridir (Elmer & Reglinski 2006). Hastalık ile mücadelede çok sayıda fungusit (Cyprodinil, Boscalid, Pyrimethanil, Cyprodinil + Fludioxonil, Fenhexamid, Folpet) kullanılmaktadır. Aynı etken maddelerin sık kullanılması sonucunda etken maddelere karşı hastalık etmenlerinin geliştirdiği direnç bilinen bir gerçektir (Leroux 2007). Buna ek olarak özellikle meyvesi tüketilen tarım ürünlerinde, ilaçlamaların sıklıkla yapılması bazı kalıntı problemlerini de beraberinde getirmektedir. İnsan ve çevre sağlığı düşünüldüğünde ülkeler bazı düzenlemeler yaparak etken maddeleri ruhsatlandırmalarından çıkarabilmektedir. Hatta bazı etken maddeler bir takvime bağlanarak dünyada kullanımı zaman içinde yasaklanmaktadır (Pal & Mc Spadden Gardener 2006; Compant et al. 2013). Bu konular düşünüldüğünde bilim insanları alternatif mücadele yöntemleri üzerine odaklanmaktadır. Bunlardan en popüler olanlarından biri de biyolojik mücadeledir. Bağda Kurşuni Küf Hastalığına karşı antagonist bakterilerin kullanımı, bitki gelişimini arttıran kök bakterileri ve uyarılmış dayanıklılık ile ilgili birçok çalışma yürütülmüştür (Ferreira 1990; Paul et al. 1998; Whiteman & Stewart 1998; Ait Barka et al. 2000; Rabosto et al. 2006; Magnin-Robert et al. 2007; Trotel-Aziz et al. 2008; Loqman et al. 2009; Furuya et al. 2011; Boubakri et al. 2015; Gruau et al. 2015; Haidar et al. 2016a; Kasfi et al. 2018; Nigris et al. 2018; Calvo-Garrido et al. 2019). Ülkemizde ise Kurşuni Küf Hastalığına karşı yapılan biyolojik mücadele çalışmaları domates (Yıldız 2000; Yıldız et al. 2007), patlıcan (Akça & Tozlu 2022), çilek (Çelik & Yıldız 2021; Genç Kesici & Dönmez 2022) gibi bitkiler üzerinde yapılmış, ayrıca *in-vitro* etkinlik denemeleri yürütülmüştür (Yıldız 1991; Tekiner et al. 2020). Bağda ise mayaların değerlendirildiği çalışmalar bulunmaktadır (Nağme 2005; Yıldız et al. 2009). Bakteriler biyolojik kontrol ajanları (BKA) içinde sıklıkla kullanılan mikroorganizma grubudur ve araştırmacılar çalışmaları sırasında *Bacillus* ve *Pseudomona* türleri ile sıklıkla karşılaşmaktadırlar. Birçok etki mekanizması ile hastalıkları doğrudan ya da dolaylı kontrol edebilen bu BKA'lar aynı zamanda

bitkilerin mineral ve su alımını arttırarak ya da birtakım bileşikler üreterek bitki büyümesini de teşvik etmektedir (Elad & Stewart 2007; Compant et al. 2013; Bonaterra et al. 2022). Antagonist bakterilerin hedef mikroorganizmalara olan en bilinen ve sıklıkla karşılaşılan etkileri ürettikleri metabolitleri sayesinde olmaktadır. Bu metabolitlerin büyük bir çoğunluğu ikincil metabolit olarak adlandırılır ve antibiyotik, siderofor vb. gibi işlevler olarak karşımıza çıkarlar (Sharrar et al. 2020). Hem uçucu hem uçucu olmayan bileşikler olan bu metabolitler aynı türün bireyleri arasında dahi büyük bir farklılık gösterebilmekte ve izolata özgü davranışlar sergileyebilmektedir (Kai 2020). Bu bağlamda piyasada aynı türe ait farklı antagonistlerden yapılan preparatların bulunması, biyolojik mücadele çalışmalarında farklı izolatların elde edilmeye çalışılması ve bunlar üzerine çalışmalar yürütülmesi konunun ne kadar özel bir noktada olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada bağın en önemli hastalıklarından biri olan Kurşuni Küf Hastalığına karşı etkili olabilecek antagonistik bakterilerin bulunması hedeflenmiştir. Bu amaçla elde edilen türlerin tanılanması, *in-vitro* ve *in-vivo* testlerle biyolojik etkinlikleri araştırılmış ve bazı fungusitlerle olan uyumlulukları da incelenmiştir.

## Materyal ve Yöntem

Bu çalışmada; Ekim 2021’de Manisa ilinin Sarıgöl ilçesinden izole edilen antagonist bakteri ve *Botrytis cinerea* izolatları kullanılırken, laboratuvar çalışmalarında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Fitobakteriyoloji Laboratuvarı olanaklarından yararlanılmıştır. Bitki çalışmaları ise yine aynı bölüme ait 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ve ortalama 25 °C’ye ayarlı iklim odasında yürütülmüştür. Ayrıca çalışmanın tamamında Sultani Çekirdeksiz asma çeşidi kullanılmış ve meyveler ile bağ çubukları yine Manisa Sarıgöl’den temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan hastalık etmeni *B. cinerea* üzüm meyvelerinden izole edilmiştir. Bunun için Manisa Sarıgöl’den 10 farklı bağ alanından hastalık etmeni ile bulaşık olduğu tahmin edilen meyveler buz kutusu içinde laboratuvara getirilmiş ve zaman kaybetmeden izolasyon yapılmıştır. İlk önce %2’lik NaClO içinde 2 dakika bekletilerek yüzey dezenfeksiyonu yapılmış ve ardından üç kere steril damıtık su ile durulanmıştır. Kurutma kağıtlarında fazla nemi alınan parçalar daha sonra Su Agar besisi yerine ekilmiş, bir hafta 20 °C’de inkubasyona bırakılmış ve gelişen fungal kolonilerin kenarlarından alınarak PDA besisi yerine aktarılmıştır (Burçak & Delen 2000). PDA besisi yerinde gelişen fungal izolatlar daha sonra mikroskop (Leica DMLS) altında incelenerek; hif, salkım şeklindeki tipik konidiospor formasyonu ve konidiosporlar araştırılmıştır (Anonymous 2008; Törün 2018). Daha sonra izolatların tek spor çalışmaları yapıp 4 °C’deki buzdolabına kaldırılarak sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir (Kızılırmak 2019).

*B. cinerea* şüphesi ile saklanan izolatların patojenisite testleri yapılarak izolatların virülensi belirlenmiştir. Bunun için Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidi meyveleri kullanılmıştır. Denemeye alınmadan önce meyveler 5 dakika boyunca

%2'lik NaClO içinde bekletilerek yüzey dezenfeksiyonu yapılmış, üç kere steril damıtık su ile durulanmış ve steril kurutma kağıtları üzerine alınarak kuruması için beklenmiştir. Her meyve üzerine 3 mm çapında ve 3 mm derinliğinde bir delik açılmış ve bu meyveler dibinde steril damıtık su ile nemlendirilmiş kurutma kağıtları bulunan plastik kaplara yerleştirilmiştir. Yüzeyle teması engelleyecek şekilde silikon halkalar üzerine yerleştirilen meyveler üzerindeki deliklere 15 µl olacak şekilde  $1 \times 10^5$  konidi/ml yoğunluğundaki konidi süspansiyonu damlatılmıştır. Denemeler 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. 20 °C'deki bir haftalık inkübasyonun ardından lezyon çapları kumpas yardımıyla ölçülmüş ve izolatlar arasındaki farklar hesaplanmıştır (Kasfi et al. 2018).

Patojenisite çalışmalarında ve diğer spor sayımı gerektiren çalışmalarda spor konsantrasyonları Thoma lamı kullanılarak yapılmıştır. Gerek süspansiyonu oluşturulacak izolat sayısının fazla olması durumunda, gerekse seyreltmelerin hesaplanması sırasında, çalışmaları kısmen yavaşlatan bu işlemi hızlandırmak ve hesaplama hatalarını ortadan kaldırıp sporları fazla bekletmeden hızlıca çalışmaya dahil etmek amacıyla JavaScript (ECMA 2023) bilgisayar dili kullanılarak TAROT adıyla ufak bir bilgisayar programı oluşturulmuştur (ver 1.1). HTML (HyperText Markup Language) tabanlı olarak tasarlanan bu program; bilgisayara kurulum gerektirmeyen ve sadece tarayıcı kaynaklarını kullanan kodlar ile yazılmış olup, lam lamel arasındaki yükseklik, Thoma lamındaki karenin büyüklüğü, sayım yapılan kare sayısı gibi parametreleri de kullanıcının istediği gibi ayarlayabileceği şekilde tasarlanmış bir Web sayfası altında çalışmaktadır. Çok sayıda sayımın ortalamasını kendi alabilen ve istenen bir konsantrasyona seyreltme hesabını otomatik yapan programa internete erişebilen her cihaz ile <https://uozyilmaz.com/thoma/> adresinden ulaşılabilmektedir (Bu çalışmada kodlar verilmemiştir. Ancak program server tarafında çalışan bir öge içermediği için web sitesinden tüm kaynak kodlara erişilebilir).

### **Antagonist bakteri izolasyonu**

Araziden hastalıklı meyvelerin alınması sırasında, bunların arasında en sağlıklı görülen asmaların orta kısmından, salkım ve yapraklardan örnekler toplanarak buz kutusunda laboratuvara getirilmiştir. Hem yaprak hem de meyvelerden epifitik ve endofitik antagonist bakteri izolasyonu yapılmıştır. Her yaprak örneği 2×2 cm büyüklüğünde bir parçadan, her meyve örneği ise 4 adet üzüm meyvesinden oluşmuştur (İşlem öncesi ağırlıkları alınmıştır). Her bir örnekten 2 tekerrür olarak izolasyon yapılmıştır. Epifitik bakterilerin izolasyonu için örnekler 50 ml steril fizyolojik serum (%0.85 NaCl) içerisinde 15 dakika boyunca karıştırılmış ve daha sonra oluşan süspansiyon 5 kere 1/10 olacak şekilde seyreltilmiştir (0 ana solüsyon). Endofitik bakterilerin izolasyonunda ise; örneklere %2'lik NaClO ile 2 dakika yüzey dezenfeksiyonu yapılmış ve steril damıtık su ile üç kere durulandıktan sonra 5 ml fizyolojik serum içerisinde havanda ezilmiştir. Bu aşamada yüzey dezenfeksiyonu sonunda, 3. durulama suyundan 50 µl alınarak KingB (King et al. 1954) besi yerine yayarak ekilmiş ve yüzey dezenfeksiyonu kontrol edilmiştir. Ezilerek oluşturulan süspansiyon 5 kere 1/10 olacak şekilde seyreltilmiştir (0 ana solüsyon). Hem epifitik hem de endofitik süspansiyon serilerinden 50'şer µl alınarak KingB besi yeri yüzeyine yayılarak ekilmiş, 20

°C’de 3 gün inkübasyona bırakılmış, gelişen koloniler sayılmış ve birim bitki dokusundaki toplam bakteri miktarı hesaplanmıştır. Daha sonra farklı koloni morfolojisine göre seçilen bakteriler saflaştırılmıştır.

Antagonist adayı bakterilerin *B. cinerea*’ya olan antagonistik etkilerinin belirlenmesi amacıyla ikili kültür testleri yapılmıştır. İkili kültür testlerinde patojenisite testlerine göre en virulent olan B33 kodlu *B. cinerea* izolatu kullanılmıştır. Bunun için; PDA (pH = 7.0) besi yerinin merkezinden 2.5 cm uzaklıktaki 4 noktaya, aynı antagonist bakteri 5 mm çap oluşturacak şekilde ekilmiş, 24 saat sonra aktif gelişim gösteren hastalık etmeni izolatının PDA kültürünün kenarından 1 cm çaplı agar plağı alınarak antagonist adayı bakterilerin ekildiği petrilerin tam ortasına miseller aşağı gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Denemeler 4 tekerrürlü olarak kurulmuş ve antagonist bakteri bulunmayan ancak patojen inokulasyonu yapılan bir de kontrol grubu denemeye eklenmiştir. Petriler 20 °C’deki inkubatore kaldırılmış ve kontrol petrilerindeki fungal gelişim çapı 5 cm’ye ulaştığında engelleme zonları hesaplanmıştır (Buhur & Özyılmaz 2013). İkili kültür testinden az ya da çok engelleme zonu oluşturan antagonist bakteriler %20 gliserin içeren Nutrient Broth besi yerinde –80 °C’deki derin dondurucuya yedeklenmiştir.

#### **Antagonist bakterilerin tanılaması ve bazı özelliklerinin belirlenmesi**

Antagonist bakterilerin tanılanmasında 16s rRNA sekans analizinden yararlanılmıştır. Bunun için öncelikle DNA ekstraksiyonu işlemleri gerçekleştirilmiştir. Yirmidört saatlik antagonist bakteri kültürlerinden mikrosantrifüj tüpleri içine hafif süspansiyon olacak şekilde su süspansiyonları hazırlanmış, kaynatılmış, santrifüj edilmiş ve süpernatant kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Daha sonra 27F (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) / 1492R (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) primer çiftleri (Lane 1991) kullanılarak PCR işlemi uygulanmıştır. Oluşan PCR ürünlerinin MacroGen firmasına hizmet alımı şeklinde sekansı yaptırılmıştır (27F primeri ile tek yönlü). Gelen sekans ham dosyalarının kalitesinin incelenmesinden sonra diziler NCBI (National Center for Biotechnology Information) gen bankasında taranarak eşleşmelere bakılmıştır (Blastn, Megablast) (Zhang et al. 2000; Morgulis et al. 2008).

Ayrıca bu antagonist bakterilerin hedef dışı canlılara olabilecek olumsuz etkilerini de değerlendirmek üzere bazı özelliklerinin araştırılması için 37 °C’de gelişimi (Özyılmaz 2007), pektolitik enzim aktivitesi (Bradbury 1970) ve tütün aşırı duyarlılık (Klement 1968) testlerinin yanında etki mekanizmalarını ortaya koyan kitinaz (Berg et al. 2000; 2001), proteaz (Krechel et al. 2002) ve DNase (Jeffries et al. 1957) aktive testleri yapılmıştır.

#### **Üzüm meyveleri üzerinde biyolojik etkinlik testi**

İkili kültür testlerine göre seçilen toplam 17 antagonist bakteri, *B. cinerea* izolatlarından en virulent olan B33 izolatu ve Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidi meyveleri biyolojik etkinlik testi için kullanılmış ve patojenisite testindeki aşamalar sırasıyla takip edilmiştir. Ancak bu testlerde antagonist bakterilerin  $1 \times 10^7$  CFU/ml süspansiyonundan 15 µl olacak şekilde yaralara damlatılmış, iki saat sonra *B. cinerea*’nın  $1 \times 10^5$  konidi/ml oranındaki konidial süspansiyonundan aynı yara

üzerine 15 µl konularak hastalık inokulasyonu yapılmıştır. Meyveler 20 °C'de 7 gün inkubasyona bırakılmıştır. Değerlendirme 7. günde lezyon çapları ölçülerek yapılmıştır (Kasfi et al. 2018).

#### **İklim odasında biyolojik etkinlik testi**

Bu amaçla iklim odası çalışmalarında kullanılmak üzere seçilen A7Len4, A1Len4 ve A8Len1 antagonist bakterileri ve ocak ayında ve 5-6 gözlü olacak şekilde toplanmış olan bağ çubukları kullanılmıştır. Dört santigrat derecede 10 gün bekletilen bağ çubukları 3-4 gözlü kalacak şekilde kesilmiş, üst kısmı su kaybını engellemek için eritilmiş parafin ile kapatılmış, alt kısmı 3000 ppm IBA'ya daldırılmış ve ardından içinde nemlendirilmiş perlik bulunan yüksek plastik kaplara yerleştirilmiştir (Tekeli 2014). Daha sonra çubuklar iklim odasında 55 gün bekletilerek hem köklenmesi hem de yaprakların oluşması sağlanmış ve torf bulunan saksılara aktarılmıştır. Bitkilere  $1 \times 10^8$  CFU/ml antagonist bakteri süspansiyonu el pülvarizatörü yardımıyla tüm yeşil aksamın ıslatılması şeklinde püskürtülmüş, bir gün sonra yine buna benzer olarak bu sefer  $1 \times 10^6$  konidi/ml olacak şekilde konidi süspansiyonu ile *B. cinerea* inokulasyonu yapılmıştır. Bitkiler polietilen torbalarla deneme süresince örtülmüştür. Deneme üç tekerrürlü olacak şekilde yürütülmüştür. Denemeye sadece hastalık uygulaması yapılmış bir pozitif kontrol, hiçbir uygulama yapılmamış bir negatif kontrol ve ayrıca bir de karşılaştırma amaçlı kimyasal (%37.5 cyprodinil + %25 fludioxonil) kontrol karakterleri eklenmiştir. Uygulamadan 20 gün sonra bitkiler üzerindeki (inokulasyondan sonra yeni yeşerenler hariç) tüm yapraklar uyarılma yapılan 0-4 skalası (0: yaprak ayası sağlıklı, 1: yaprak ayası %0.1-5'i lezyonlu, 2: yaprak ayası %5.1-20'si lezyonlu, 3: yaprak ayası %20.1- 40'ı lezyonlu ve 4: yaprak ayası %40.1-100'ü lezyonlu) kullanılarak değerlendirilmiştir (Kim et al. 2007). Uygulamalara ait skala değerleri hastalık şiddetine Towsend-Heuberger (Towsend & Heuberger 1943) formülü kullanılarak çevrilmiştir. Ayrıca uygulamaların etki oranları ise Abbott (Abbott 1925) formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

#### **Antagonistlerin bazı fungusitlerle uyumluluğu**

Bu çalışmalar antagonist bakterilerin iki farklı fungusit (azoxystrobin [Hektaş, Caira SC]; 75 ml/100 L ve %37.5 cyprodinil + %25 fludioxonil [Syngenta, Switch 62.5 WG]; 50 g/100 L) ile entegre edilebilme imkanını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Çalışmalarda MGY besi yeri (mannitol %2, sodium L-glutamate %0.4,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  %0.1, sodium chloride %0.04, magnezyum sülfat %0.04, yeast ekstrakt %0.05, pH = 7.0) kullanılmıştır (Cha et al. 1997). Fungisitler sıvı olarak hazırlanan besi yerine tam (1×), yarı (0.5×) ve iki katı (2×) doz oluşturacak şekilde karıştırılmıştır. Konsantre (2×) besi yeri 121 °C'de 15 dk otoklav edilmiş ve fungusitler soğuyan besi yerine sonradan eklenmiştir. Tüpler içine hazırlanan fungusitli besi yerleri antagonist bakteriler (A7Len4, A1Len4 ve A8Len1) ile hazırlanan  $1 \times 10^8$  CFU/ml yoğunluktaki süspansiyonlardan 20 µl olarak inokule edilmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Fungisitli MGY besi yeri içeriği.  
Table 1. Content of MGY medium with fungicide.

2 ml 1× MGY besi yeri için konulan miktarlar (µl)				
Doz	0×	0.5×	1×	2×
MGY (2×)	980	980	980	980
Fungisit (4×)	0	250	500	1000
Damıtık su	1000	750	500	0
Bakteri süspansiyonu*	20	20	20	20

\*MGY (2×) besi yeri içine hazırlanmıştır.

Besi yerleri 25 °C’de 48 saat boyunca çalkalayıcıda inkubasyona bırakılmış ve süre sonunda tüplerdeki bulanıklık (bakteri gelişimi) incelenerek kaydedilmiştir. Daha sonra her tüpten alınan 20 µl besi yeri KingB agarlı besi yerine nokta şeklinde ekilmiştir. Bakteriler gelişmeleri için yine 48 saat inkubasyona bırakılmış ve ardından petride bakterilerin gelişimleri kaydedilmiştir (Benlioğlu & Benlioğlu 1998). Bu çalışmaya ek olarak yapılan ikinci bir çalışma ile fungusitler yine aynı dozlarda bu sefer PDA ile karıştırılarak agarlı besi yeri oluşturulmuş ve petrilere dökülmüştür (Besi yeri ve fungusit son konsantrasyonları yukarıdakine benzer olarak hesaplanmıştır). Petrilere kuruduktan sonra antagonist bakteriler nokta şeklinde ekilmiş ve 25 °C’de inkubasyona bırakılmıştır. Ekim işleminden 48 saat sonra bakterilerin gelişme durumları değerlendirilmiştir (Mohiddin & Khan 2013; Hanuman & Bindu Madhavi 2018).

### İstatistik analizler

Çalışmada yapılan tüm testler/denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre en az 3 tekerrürlü olacak şekilde tasarlanmış olup, ortalamaların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır (ANOVA, Fisher-LSD,  $p < 0.05$ ). Analiz işlemlerinde R istatistik paket programı ve alt kütüphanesi agricolae’dan yararlanılmıştır (de Mendiburu 2021; R Core Team 2022).

### Bulgular ve Tartışma

#### *Botrytis cinerea* izolatlarının elde edilmesi

Manisa Sarıgöl ilçesindeki Sultani Çekirdeksiz çeşidi yetiştirilen 10 farklı bağ alanından toplam 40 adet örnekten izolasyon yapılmıştır. İzolasyon sonucunda besi yerinde gelişen fungal kolonilerden alınan örnekler mikroskop altında incelenmiş ve toplam 11 adet izolat (B12, B33, B03, B44, B31, B02, B51, B32, B14, B42 ve B73) *Botrytis cinerea* şüpheli olarak elde edilmiştir. İzolatların patojen olup olmadığının ve ayrıca patojen ise virülensliğinin belirlenmesine yönelik yapılan patojenisite çalışmalarında, tüm izolatların meyveler üzerinde az ya da çok (4.46 – 24.23 mm çap) bir lezyon oluşturduğu, B33 kodlu izolatın istatistik olarak diğer izolatlardan ayrıldığı belirlenmiştir. Bu izolat yüksek virülenslik gösterdiğinden dolayı çalışmanın kalanında hastalık etmeni olarak kullanılmıştır.



### **Antagonistik bakteri izolasyonu ve tanılanması**

Bakteriler hem üzüm meyvesi hem yaprak dokusundan epifitik ve endofitik durumları dikkate alınarak izole edilmiştir. Gerek epifitik gerekse endofitik bakterilerin izolasyonunda çalışılan parçalar tartılmış ve böylece birim bitki dokusundaki bakteri miktarları hesaplanmıştır. Seyreltme serilerine göre gözden geçirilen petripler incelendiğinde, epifitik bakteriler için 3üncü, endofitik bakteri için ise linci seyreltme serileri sayılabilir ve değerlendirilebilir bulunmuştur. Ayrıca endofitik bakterilerin izolasyonunda son durulama suyundan besi yerine ekilen su örneğinde herhangi bir bakteri gelişimi gözlenmemiş ve yüzey dezenfeksiyonu başarılı olmuştur. Her örnekten iki izolasyon çalışması yapılmış ve hesaplanan değerler bu iki izolasyon çalışmasının ortalaması olarak değerlendirilmiştir. Bir gram yaprak dokusundan  $9.7 \times 10^4 - 2.1 \times 10^7$  CFU epifitik bakteri izole edilirken, aynı yaprakların farklı yerlerinden alınan dokularda  $7.1 \times 10^1 - 2.9 \times 10^4$  CFU endofitik bakteri izole edilmiştir. Bir gram meyvede ise  $1.4 \times 10^2 - 2.8 \times 10^6$  CFU epifitik,  $0.7 \times 10^1 - 4.4 \times 10^3$  CFU endofitik bakteri olduğu hesaplanmıştır.

Koloni morfolojisine göre bakteriler saflaştırılmış ve toplam 160 bakteri elde edilmiştir. Gelişme geriliği, koloniler ile çalışılmaması veya izolatların kısa sürede ölmesi gibi nedenlerle bunlar arasından 130 tanesine *in-vitro*'da *B. cinerea* (B33) izolatına karşı ikili kültür testleri yapılmıştır. Bunların da içinden 17 tanesi fungal etmenin misel gelişimini değişen oranlarda engellemelerinden dolayı aday antagonist bakteri olarak belirlenmiş ve çalışmalarda kullanılmak üzere yedeklenmiştir. İkili kültür testlerinde etkinin %6.8 ile %80.1 arasında değiştiği görülmüştür (Çizelge 2). Elde edilen değerler incelendiğinde A7Len3, A5Fep2, A8Len1, A7Len4, A1Len8, A1Len4, A1Lep1, A1Lep4, A7Lep5 ve A6Len3 antagonist bakterilerinin diğer bakterilerden istatistiki olarak farklı bir grupta yer aldığı görülmüştür.

Çizelge 2. Antagonist bakterilerin ikili kültür testlerinde Kurşuni Küf Hastalığının misel gelişimini engelleme oranları.

Table 2. The rate of inhibition by antagonistic bacteria of mycelial growth of Gray Mold Disease in dual culture testing.

Kod	Tür	Engelleme (%)*	
A7Len3	<i>Bacillus velezensis</i>	80.1	a
A5Fep2	<i>Bacillus velezensis</i>	80.0	a
A8Len1	<i>Bacillus velezensis</i>	79.6	a
A7Len4	<i>Bacillus velezensis</i>	79.4	ab
A1Len8	<i>Bacillus velezensis</i>	79.1	ab
A1Len4	<i>Bacillus velezensis</i>	77.7	ab
A1Lep1	<i>Bacillus subtilis</i>	77.5	ab
A1Lep4	<i>Bacillus subtilis</i>	76.7	ab
A7Lep5	<i>Bacillus halotolerans</i>	74.2	ab
A6Len3	<i>Bacillus licheniformis</i>	73.3	ab
A0Len3	<i>Bacillus subtilis</i>	72.6	b
A8Len6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51.7	c
A1Len2	<i>Bacillus velezensis</i>	49.0	c
A7Lep3	<i>Kosakonia cowanii</i>	38.6	d
A8Len4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37.1	d
A7Len2	<i>Bacillus safensis</i>	26.3	e
A9Lep2	na**	6.8	f

\*4 tekrerrün ortalamasıdır. Aynı harfle gösterilen değerler arasında istatistiki olarak fark yoktur (Fisher-LSD,  $p < 0.05$ ).

\*\*na: Düşük sekans uzunluğu ve kalitesi nedeniyle tür ismi verilmekten kaçınılmıştır.

Antagonist bakterilerin tür düzeyinde belirlenmesine yönelik yapılan 16s rRNA sekans analizleri sonucunda bakterilerin çoğunluğunun Gram pozitif türler olduğu görülmüştür. Zayıf sekans kalitesi olan bir izolat (A9Lep2) hariç diğer izolatların hepsi ortalama 858 bp uzunluğunda ürünler ile NCBI bankasındaki türlerle %100 eşleşmiş ve bir izolat (A1Len8) %99.76 diğerleri ise %100 benzerlik göstermiştir. Buna göre: A7Lep5 *Bacillus halotolerans*; A6Len3 *Bacillus licheniformis*; A7Len2 *Bacillus safensis*; A0Len3, A1Lep1, A1Lep4 *Bacillus subtilis*; A7Len4, A1Len2, A1Len4, A8Len1, A1Len8, A7Len3, A5Fep2 *Bacillus velezensis*; A7Lep3 *Kosakonia cowanii*; A8Len6, A8Len4 *Pseudomonas aeruginosa* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 2).

Antagonit bakterilerin bazı özelliklerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda ise; bakterilerin hepsinin 37 °C'de geliştiği, hatta A9Lep2 izolatı hariç geri kalanların 20 °C'deki gelişiminden daha iyi bir gelişim gösterdiği belirlenmiştir. Buna ek olarak hiçbir bakteri pektolitik aktivite ve tütünde aşırı duyarlılık göstermemiştir (iki test için kontrol olarak kullanılan *Pectobacterium carotovorum* Ecc133 - SCRI133 pozitif sonuç vermiştir). Bazı etki mekanizmalarına bakıldığında; sadece A6Len3 izolatı kitinaz aktivitesi gösterirken, A9Lep2 ve A7Lep3 izolatları hariç hepsi proteaz aktivitesi göstermiştir. İzolatların hiçbir DNase aktivitesi göstermemiştir (kontrol olarak kullanılan *Serratia plymuthica* HRO-C48 [Müller et al. 2004] pozitif sonuç vermiştir).

### Üzüm meyveleri üzerinde biyolojik etkinlik testi

İkili kültür testlerine göre seçilen toplam 17 antagonist bakterinin hastalığa olan etkileri üzüm meyveleri üzerinde araştırılmış ve kontrolle karşılaştırıldığında A7Len2 (*B. safensis*), A0Len3 (*B. subtilis*), A8Len1 (*B. velezensis*), A1Len2 (*B. velezensis*) ve A7Len4 (*B. velezensis*) izolatlarının daha az lezyon büyüklüğü oluşmasına neden olduğu görülmüştür (Çizelge 3). Diğer izolatlar ise lezyon çapını azaltmaktan ziyade hastalığın artmasına neden olmuştur.

Çizelge 3. Antagonist bakteri izolatlarının Meyvelerde Kurşuni Küf Hastalığı gelişiminin engellenmesi üzerine biyolojik etkinlik testi.

Table 3. Biological efficacy testing on inhibition of Gray Mold Disease development on fruits by antagonistic bacterial isolates.

Antagonist bakteri	Lezyon çapı (mm)*	%Etki
A6Len3	23.43 a	-17.74
A1Lep4	23.41 a	-17.63
A8Len4	22.38 ab	-12.46
A1Lep1	22.13 ab	-11.21
A7Lep5	21.15 abc	-6.28
A9Lep2	20.96 abc	-5.33
A5Fep2	20.95 abc	-5.28
A7Lep3	20.62 abc	-3.62
A7Len3	20.32 abc	-2.11
A1Len8	20.15 abc	-1.26
A8Len6	20.10 abc	-1.01
A1Len4	20.03 abc	-0.65
Pozitif kontrol	19.90 abc	
A7Len2	18.36 bc	7.74
A0Len3	17.93 bc	9.90
A8Len1	17.01 c	14.52
A1Len2	9.93 d	50.10
A7Len4	4.18 e	78.99

\*3 tekrerrün ortalamasıdır. Aynı harfle gösterilen değerler arasında istatistiki olarak fark yoktur (Fisher-LSD,  $p < 0.05$ ).

Bu izolatlar içinden gerek ikili kültür testleri gerekse meyveler üzerinde yapılan biyolojik etkinlik testleri dikkate alınarak A7Len4, A8Len1 ve A1Len4 izolatları seçilmiş, saksı ve fungusitlerle uyumluluk denemelerinde bu izolatlar kullanılmıştır. Her ne kadar A8Len1 izolatu istatistiki olarak kontrol ile aynı gruba girmiş olsa da diğer izolatlardan farklı davrandığı, yapılan optimizasyon ve ön çalışmalar sırasında bitki gelişimine olumlu yönde etki edebileceği gözlemlendiği için saksı denemelerine dahil edilmiştir.

### İklim odasında biyolojik etkinlik testi

İklim odası denemesi ile üçü de *B. velezensis* olan A7Len4, A8Len1 ve A1Len4 antagonist bakterilerin B33 kodlu *B. cinerea* izolatına karşı etkinliği köklendirilmiş Sultani çekirdeksiz asma çubuklarında test edilmiştir. Değerlendirme, inokulasyondan sonra 20. günde skala kullanılarak yapılmıştır. İnokulasyondan sonra yeni çıkan yapraklar ortalamayı etkileyebileceği için sayımlara dahil

edilmemiştir. Ölçülen skala değerleri ilk önce hastalık oranına daha sonra da kontrolle karşılaştırılarak etki oranına çevrilmiştir (Çizelge 4). Pozitif kontrol bitkilerinde %43.75 oranında hastalık çıkarken negatif kontrol bitkilerinde hastalık belirtisine rastlanmamıştır. Kimyasal kontrol olarak kullanılan %37.5 cyprodinil + %25 fludioxonil aktif maddeli fungusit bitkileri hastalık çıkışına karşı %82.54 oranında korurken, bakteri izolatları A8Len1 %71.43, A1Len4 %73.88 ve A7Len4 %80.96 oranında hastalık çıkışını engellemek suretiyle etkili olmuştur. Antagonist bakterilerin biyokontrol etkinliği ile fungusitlerin etkinlikleri aralarında istatistiki olarak fark bulunmamıştır (Çizelge 4; Şekil 1).

Çizelge 4. Kurşuni Küf Hastalığına karşı antagonist bakterilerin iklim odası biyolojik aktivite testi.

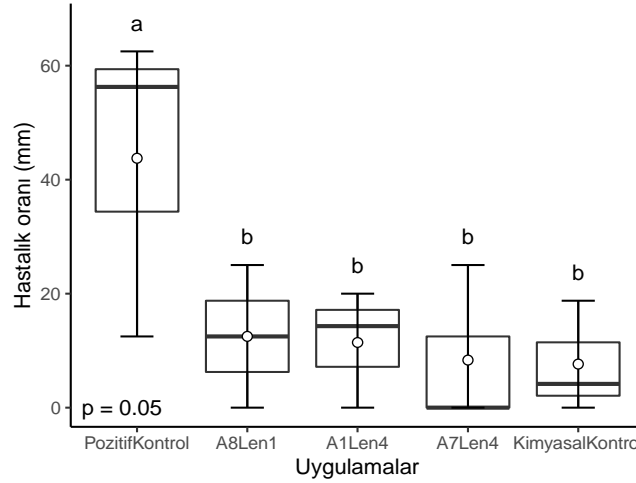
Table 4. Climate chamber biological activity testing of bacteria antagonistic to Gray Mold Disease.

Uygulama	Hastalık şiddeti (%)**	Etki (%)***
Kimyasal kontrol*	7.64	82.54
A8Len1	12.50	71.43
A1Len4	11.43	73.88
A7Len4	8.33	80.96
Pozitif kontrol	43.75	a

\*Kimyasal kontrol: %37.5 cyprodinil + %25 fludioxonil

\*\*Tekerrürdeki bir bitkide skalaya göre değerlendirilen tüm yapraklarının Tawsend heuberger formülü ile hastalık oranına çevrilmiş halidir. 3 Tekerrürün ortalamasıdır, aynı harfle gösterilen değerler arasında istatistiki olarak fark yoktur (Fisher-LSD,  $p < 0.05$ ).

\*\*\*Hastalık oranlarının pozitif kontrole göre Abbott formülü ile hesaplanmış etki oranlarıdır. Etki oranları arasında istatistiki olarak fark bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ).



Şekil 1. İklim odasında antagonist bakteri ve kontrol ilacı uygulanan karakterlerindeki Kurşuni Küf Hastalığı şiddetleri (Boxplot).

Figure 1. Grey mold disease severity in response to antagonistic bacteria and control applications in a climate chamber (Boxplot).

### **Antagonistlerin bazı fungusitlerle uyumluluğu**

Test edilen A7Len4, A1Len4 ve A8Len1 antagonist bakterileri fungusit içeren besi yerlerinde gelişimleri inokulasyondan 2 gün sonra değerlendirilmiştir. Fungisitli MGY sıvı besi yerinde gelişme yeteneklerine bakıldığında, her üç izolat da tüm dozlarda besi yerini bulandırarak gelişim sağladığı gözlenmiştir. Bulanık olan besi yerindeki bakterilerin canlı olup olmadıklarını anlamak için buradan alınan 20 µl besi yeri KingB agarlı besi yerlerine ekilmiş ve gelişimlerine burada da devam ettikleri görülmüştür. Fungisitli PDA besi yerinde gelişme durumlarına bakıldığında ise testlenen üç izolat da azoxystrobin içeren besi yerinde geliştiği gözlenirken; A8Len1 tam doz ile iki katı doz, A7Len4 ve A1Len4 iki katı doz cyprodinil + fludioxonil içeren PDA besi yerinde gelişmediği görülmüştür.

Özellikle bağ gibi birçok hastalığın hedefi olan bitkilerde kimyasal ilaçlar sık aralıklarla kullanılmakta, bu ilaçlar toprakta birikebilmekte, çevreyi kirletmekte ve buna ek olarak patojenler hastalıklara kısa sürede dayanıklılık oluşturabilmektedir (Leroux 2007). Biyolojik mücadele çoğu zaman kimyasal mücadelenin yerini tam olarak alamasa da birçok ilacın zaman içinde raflardan çekilmesi ile alternatif arayışlarının odağına oturmuştur. Bitki hastalıkları ile biyolojik mücadelede bugüne kadar dünya üzerinde birçok çalışma yapılmış ve bu çalışmalar katlanarak artmaktadır. İstisnalar ve özel durumlar olmakla birlikte genellikle biyolojik kontrol ajanları (BKA) hastalık etmenlerinin bulunduğu bitkilerden (kök bölgesi toprağı dahil, tüm toprak altı ve üstü aksamından) izole edilmektedir. Eğer uyarılmış dayanıklılık ya da bitki gelişimine teşvik gibi mekanizmalar düşünülmüyorsa, genellikle bitkideki izolasyon bölgesi hastalık etmeninin hedef aldığı bölgelerdir. Çalışmamızda hedef patojen *B. cinerea* yine bu çalışma sırasında izole edilmiştir. Toplam 11 hastalık etmeni izole edilirken, bunların virülenslikleri arasında istatistiki farklılıklar olduğu saptanmış ve B33 izolatının diğerlerinden daha büyük lezyon çapı oluşturduğu için çalışmanın geri kalanında kullanılmıştır. Biyolojik mücadele denemelerinde hastalık etmeni açısından eldeki virülensi en yüksek bir ya da birkaç izolat ile çalışmak hastalığın gerçek koşullarda kontrol edilmesinde fayda sağlayacaktır. Çalışmamızda toplam 160 antagonist bakteri adayı elde edilmiştir. Benzer bir çalışma 130 bakteri ve maya ile başlatılmıştır (Kasfi et al. 2018). Genellikle bu tür çalışmalar çalışılan bitki ve hastalık etmenine bağlı olarak yüzlerce antagonist bakteri izolatı ile başlamaktadır. Çalışmamızda ikili kültür testlerine gelişme durumlarına göre toplam 130 bakteri aktarılmıştır. Deneyimlerimize göre, seçilen farklı koloni morfolojisine sahip bakteri izolatları arasında kabaca %10-20 düzeyinde antagonist bakteriler ile karşılaşılma olasılığı vardır. Her ne kadar çalışılan etmen ve besi yeri gibi birçok faktör bu oranı etkilese de benzer değerleri literatürde görmek mümkündür (Kasfi et al. 2018; Özyılmaz 2019). Çalışmamızda ikili kültür testi ile 17 bakterinin antagonist olduğu bulunmuş bu da toplam izole edilen bakteri sayısının %10.63'e denk gelmektedir. İkili kültür ve diğer laboratuvar testleri sonucu elde edilen antagonistler aynı zamanda saksı ya da arazide başarılı olacak diye bir durum söz konusu değildir. Laboratuvar çalışmaları ve bitki çalışmaları arasında her zaman için bir uyumsuzluk ile karşılaşılması kuvvetle olasıdır (Fravel 1988). Bunu bir nebze önüne geçmek ve bitki çalışmalarında kullanılacak bakterileri seçmek için bazı araştırmacılar yapılan testlere puanlama getirmişler ve antagonistlerin aldıkları puana göre

değerlendirmişlerdir (Krechel et al. 2002). Bazı çalışmalarda da saksı/sera/tarla çalışmalarından önce kökçük testi gibi ön değerlendirme testlerini devreye sokarak patojen, antagonist ve bitkinin laboratuvar koşullarında biran evvel karşılaştırılarak değerlendirilmesi sağlanmıştır (Sang et al. 2008; Özyılmaz 2019). Ancak günümüzde genel geçer yöntem kabaca çok izolattan ikili kültür ile başlayarak çeşitli testler ile eleme yapılıdır.

Çalışmamızda 16s rRNA sekans analizlerine göre antagonist bakteriler *Bacillus halotolerans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus safensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis*, *Kosakonia cowanii* ve *Pseudomonas aeruginosa* olarak tanılanmıştır. Başta *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* ve *Streptomyces* gibi birçok farklı bakteri türü, *B. cinerea*'nın biyolojik kontrolünde kullanılmakta olduğu ve *Bacillus* türlerinin ise genel anlamda bitki hastalıklarının kontrolünde etkili en önemli antagonistler içinde yer aldığı görülmektedir (Haidar et al. 2016b). Çalışma konusu hastalığa karşı literatürde *Bacillus* türleri ile yapılmış birçok araştırma bulunmaktadır (Lee et al. 2006; Maachia et al. 2015; Wang et al. 2021; Foughalia et al. 2022; Li et al. 2023). *Pseudomonas aeruginosa* ise yine sıklıkla biyolojik mücadele çalışmalarında karşımıza çıkan türler arasındadır. Ancak her ne kadar biyolojik mücadele ile ilişkilendiriliyor olsa da etmen insan patojenleri içinde yer almakta (Moradali et al. 2017), bu nedenle çalışmalarda temkinli yaklaşılması gerekmektedir. Çalışmamız sırasında sıklıkla karşılaşılmayan ancak biyolojik savaş çalışmalarında (Espinosa et al. 2023) anılan *Kosakonia cowanii* (= *Enterobacter cowanii*) etmeni de izole edilmiştir. İnsan patojeni olan ve kanlardan izole edilebilen etmen Gram negatif çubuk şekilli bir bakteri olup doğada bitkilerden ve topraklar sıklıkla izole edilmektedir (Yang et al. 2018). Bu türlerin biyolojik savaş çalışmalarında laboratuvar da iyi sonuç vermesine karşın, insan sağlığı açısından çok iyi değerlendirilmesi gerekmektedir (Özyılmaz 2018). Çalışmamızda tesadüfi olarak seçilen antagonist izolatların neredeyse yarısı daha sonradan *Bacillus velezensis* olarak tanılanmış ve bunların da büyük çoğunluğunun yaprak endosferinden izole edildiği görülmüştür. Özellikle bu türün baskın olarak öne çıkması nedeniyle çalışmadaki saksı denemeleri de bu izolatlar üzerine yoğunlaşmıştır. Literatüre bakıldığında patojenlere olan durdurucu etkilerinin yanında bitki gelişimini arttıran özellikleri ile endofitik karakterdeki bu bakteri ile çalışıldığı görülmektedir (Khan et al. 2020). Endofitik bakteriler, bitki dokularında yaşayabilen ve bitkilerin büyümesini teşvik eden, patojenlere karşı koruyan özel bir bakteri grubudur. Bunlar antibiyotik üretimi, bitki büyümesine teşvik, uyarılmış dayanıklılık, parazitizm, yarışma gibi birçok mekanizmaya sahip olabilmektedir (Eljounaidi et al. 2016). Kurşuni küf hastalığı üzerine de bu endofitik özellikteki bakterilerle çalışılmıştır (Nigris et al. 2018; Bolívar-Anillo et al. 2020). Endofitik bakterilerin yaşam ortamları bitki içi olduğu için atmosferik dış şartlardan da az etkilenebileceği rahatlıkla söylenebilir. Her ne kadar bitki gelişimine teşvik çalışmamız konusu olmasa da iklim odası çalışmalarında A8Len1 izolatının diğer uygulama ve kontrollere göre yeşil aksam gelişimini arttırdığı ve gövde üzerinde harici köklenmelere neden olduğu gözlenmiştir (data verilmemiştir). Bundan dolayı özellikle bu izolat için bitki gelişimine teşvik çalışmalarının yapılmasının uygun olacağı görülmüştür. Bu konu üzerine yapılmış benzer çalışmalar da bulunmaktadır (Ait Barka et al. 2000; Şahin & Turan 2020).

Her ne kadar kimyasal mücadeleye alternatif olarak biyolojik mücadele düşünülüyor olsa da bazen aynı etmene bazen de farklı etmen gruplarına kimyasal mücadele yapmak kaçınılmaz olmaktadır. Bu durumda BKA'nın bu pestisitlerin varlığında canlılığını sürdürmesi gerekmektedir. Azoxystrobinin bağda *Plasmopara viticola*, *Phomopsis viticola* ve *Erysiphe necator* etmenlerine karşı ve cyprodinil + fludioxonilin ise *B. cinerea*'ya karşı ruhsatlı olmasından dolayı çalışmamızda bu fungusitler değerlendirilmiştir. Testlenen izolatların azoxystrobine karşı (2 katı dozuna kadar) dayanabildiği görülürken, bazı izolatların cyprodinil + fludioxonile karşı dayanımlarının diğerlerine göre nispeten az olduğunu belirlenmiştir. Bu da izolat seçiminde bu konunun önemini ortaya koymaktadır. Yapılan bir çalışmada bazı *Pseudomonas fluorescens* izolatlarının 6 fungusit, 10 insektisit ve 10 herbisit ile uyumu araştırılmış ve pestisitlere uyumu ile ilgili uyumlu, orta uyumlu ve düşük uyumlu olarak dağılım gösterdiği bulunmuştur (Hanuman & Bindu Madhavi 2018). Buna benzer olarak fungal ve bakteriyel bazı antagonistlerin üzerine 6 pestisit etkisinin araştırıldığı bir çalışmada *Pseudomonas* türlerinin *Bacillus* türlerine göre testlenen pestisitlerle daha uyumlu olduğu bildirilmiştir (Mohiddin & Khan 2013). Ancak *Bacillus* türlerinin oluşturduğu endosporları sayesinde her türlü çevresel ve kimyasal stresi tolere edebildiği bilinmektedir.

Çalışma genel olarak değerlendirildiğinde; bağ yaprak ve meyvelerinden yapılan izolasyon çalışmalarında antagonist bakteri olarak ağırlıklı *Bacillus* türleri karşımıza çıkmış ve özellikle *Bacillus velezensis* türü sayıca fazla bulunmuştur. Yine çalışma sırasında izole edilen hastalık etmenine karşı yapılan gerek *in-vitro* gerekse *in-vivo* testlerde; A8Len1, A1Len4 ve A7Len4 antagonist bakteri izolatlarının biyolojik etkinlikleri bakımında öne çıktıkları görülmüştür. Bu bakterilerin üçünün de bağ yapraklarında endofitik karakterli olduğu düşünüldüğünde özellikle bitki içindeki durumunun da gözden geçirilmesi iyi olacaktır. Ayrıca bazı bakterilerin bitki gelişimine olan etkileri de bu çalışmalar sırasında gözlenmiş fakat çalışma bu maksatla kurgulanmadığı için değerlendirilmemiştir. Özellikle bu izolatların bitki gelişimine teşvik ve uyarılmış dayanıklılık gibi mekanizmalarının çalışılması iyi olacaktır. Antagonist bakterilerin pestisitler ile uyumluluğu üzerinde durulması gereken başka bir konudur. Çalışmamız sırasında antagonistlerin özellikle azoxystrobine karşı uyumlu olduğu görülmüş ve çeşitli fungal hastalıklara karşı kullanılan bu fungusitten etkilenmediği bulunmuştur. Buna ek olarak çalışma sırasında etkili bulunan antagonistlerin diğer bağ fungal hastalıklarına karşı etkileri de çalışılması gereken başka bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır.

## Teşekkür

Bu çalışma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. Proje Numarası: ZRF-22012.

## Kaynaklar

- Abbott W. S., 1925. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18(2), 265–267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Ait Barka E., A. Belarbi, C. Hachet, J. Nowak & J. C., 2000. Enhancement of *in vitro* growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria . *FEMS Microbiology Letters*, 186(1), 91–95. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09087.x>
- Akça A. & E. Tozlu, 2022. Investigation of the Biocontrol Effectiveness of Some Bacterial Strains on Eggplant Gray Mold Disease (*Botrytis cinerea*) in *in-vitro* and *in-vivo* conditions. *KSU J. Agric Nat*, 25(5), 1098–1108. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdogavi>
- Anonymous, 2008. Bağda Kurşuni Küf. In *Zirai mücadele teknik talimatları* (pp. 273–275). Gıda Tarım ve hayvancılık bakanlığı tarımsal araştırmalar ve politikalar genel müdürlüğü bitki sağlığı araştırmaları daire başkanlığı.
- Bavaresco L., D. Petegolli, E. Cantù, M. Fergoni, G. Chiusa, & M. Trevisan, 1997. Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea*. *VITIS - Journal of Grapevine Research*, 36(2), 77–83. <https://doi.org/10.5073/VITIS.1997.36.77-83>
- Benlioğlu, K. & S. Benlioğlu, 1998. Pseudomonas syringae pv tomato'ya Karşı Bakır Dayanıklılığı Üzerinde Çalışmalar. Conference: Türkiye VIII. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, 21-25 Eylül 1998, Ankara, 52–56.
- Berg G., A. Fritze, N. Roskot & K. Smalla, 2001. Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb. *J Appl Microbiol*, 91(May), 963–971. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2001.01462.x> [pii]
- Berg G., S. Kurze, A. Buchner, E. M. Wellington & K. Smalla, 2000. Successful strategy for the selection of new strawberry-associated rhizobacteria antagonistic to *Verticillium wilt*. *Canadian Journal of Microbiology*, 46, 1128–1137. <https://doi.org/10.1139/w00-101>
- Bolívar-Anillo H. J., C. Garrido & I. G. Collado, 2020. Endophytic microorganisms for biocontrol of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry Reviews*, 19(3), 721–740. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09603-5>
- Bonaterra A., E. Badosa, N. Daranas, J. Francés, G. Roselló & E. Montesinos, 2022. Bacteria as Biological Control Agents of Plant Diseases. *Microorganisms*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10091759>
- Boubakri H., A. Hadj-Brahim, C. Schmitt, I. Soustre-Gacougnolle & A. Mliki, 2015. Biocontrol potential of chenodeoxycholic acid (CDCA) and endophytic *Bacillus subtilis* strains against the most destructive grapevine pathogens. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 43(4), 261–274. <https://doi.org/10.1080/01140671.2015.1049620>
- Bradbury J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plant. *Rev. Pl. Path.*, 49(5), 213–218.
- Buhur N. & Ü. Özyılmaz, 2013. Biberde kök boğazı yanıklığı hastalığının patojenisitesinin belirlenmesinde farklı yöntemler ve biyolojik mücadelesi üzerine çalışmalar. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 10(1), 25–29.
- Burçak A. A. & Delen N., 2000. Bağlardan izole edilen kurşuni küf (*Botrytis cinerea* Pers.) izolatlarının bazı fungusitlere duyarlılıkları üzerinde araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 40(3–4), 153–167.
- Calvo-Garrido C., J. Roudet, N. Aveline, L. Davidou, S. Dupin & M. Fermaud, 2019. Microbial antagonism toward *Botrytis* bunch rot of grapes in multiple field tests using



- one *Bacillus ginsengihumi* strain and formulated biological control products. *Frontiers in Plant Science*, 10(February). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00105>
- Cha J. S., C. Pujol & C. I. Kado, 1997. Identification and characterization of a *Pantoea citrea* gene encoding glucose dehydrogenase that is essential for causing pink disease of pineapple. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), 71–76. <https://doi.org/10.1128/aem.63.1.71-76.1997>
- Compant S., G. Brader, S. Muzammil, A. Sessitsch, A. Lebrühi & F. Mathieu, 2013. Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. *BioControl*, 58(4), 435–455. <https://doi.org/10.1007/s10526-012-9479-6>
- Çelik B. G. & F. Yıldız, 2021. Biological Control Studies of Gray Mold Disease on Strawberry. *The Journal of Turkish Phytopathology*, 50(2–3), 35–44.
- de Mendiburu F., 2021. agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R Package Version 1.3-5, <https://CRAN.R-Project.Org/Package=agricolae>.
- ECMA, 2023. *Standart ECMA-262, ECMAScript 2023 Language Specification, 14th edition*. Ecma International.
- Elad Y. & A. Stewart, 2007. Microbial Control of *Botrytis* spp. (Editör: Elad Y., B. Williamson, P. Tudzynski & N. Delen, *Botrytis: Biology, Pathology and Control* pp. 223–241). Springer.
- Eljounaidi K., S. K. Lee & H. Bae, 2016. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – Review and future prospects. *Biological Control*, 103, 62–68. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2016.07.013>
- Elmer P. A. G. & T. Reglinski, 2006. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*, 55(2), 155–177. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3059.2006.01348.X>
- Espinosa G., J. Hernández Gómez, J. Martínez, Y. Flores Gallardo, F. J Pacheco Aguilar, J. R. Ramos López, M. A Arvizu Gómez, J. L. Saldaña Gutierrez, C Rodríguez Morales, J. A. García Gutiérrez, J. González Espinosa, Y. Fernanda Hernández Gómez, Y. Javier Martínez, F. J. Flores Gallardo, J. R. Pacheco Aguilar, M. A. Ramos López, J. Lizzeta, A. Gómez, C. Saldaña Gutierrez & J. Campos Guillén, 2023. *Kosakonia cowanii* Ch1 Isolated from Mexican Chili Powder Reveals Growth Inhibition of Phytopathogenic Fungi. *Microorganisms* 2023, Vol. 11, Page 1758, 11(7), 1758. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11071758>
- Ferreira J. H. S., 1990. In vitro evaluation of epiphytic bacteria from table grapes for the suppression of *Botrytis cinerea*. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 11(1), 38–41.
- Foughalia A., Y. Bouaoud, C. Chandeysson, M. Djedidi, M. Tahirine, K. Aissat & P. Nicot, 2022. *Acinetobacter calcoaceticus* SJ19 and *Bacillus safensis* SJ4, two Algerian rhizobacteria protecting tomato plants against *Botrytis cinerea* and promoting their growth. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S41938-022-00511-Z/TABLES/2>
- Fravel D. R., 1988. Role Of Antibiosis In The Biocontrol Of Plant Diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 26(1), 75–91. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.26.1.75>
- Furuya S., M. Mochizuki, Y. Aoki, H. Kobayashi, T. Takayanagi, M. Shimizu & S. Suzuki, 2011. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* KS1 for the biocontrol of grapevine fungal diseases. *Biocontrol Science and Technology*, 21(6), 705–720. <https://doi.org/10.1080/09583157.2011.574208>
- Genç Kesici T. & M. F. Dönmez, 2022. Çilekte *Botrytis cinerea*'ya Karşı Bakterilerin Antagonist Etkilerinin *In-vitro* Koşullarda Belirlenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 27(3), 535–547. <https://doi.org/10.53433/yyufbed.1089390>
- Gruau C., P. Trotel-Aziz, S. Villaume, F. Rabenoelina, C. Clement, F. Baillieux & A. Aziz, 2015. *Pseudomonas fluorescens* PTA-CT2 triggers local and systemic immune response

- against *Botrytis cinerea* in grapevine. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(10), 1117–1129. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-15-0092-R>
- Haidar R., C. Calvo-Garrido, J. Roudet, T. Gautier, A. Deschamps & M. Fermaud, 2016a. *In vitro* and *in vivo* screening of antagonistic bacterial strains from vineyards to control *Botrytis cinerea* in grapevine tissues. *Acta Horticulturae*, 1144, 85–92. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1144.12>
- Haidar R., M. Fermaud, C. Calvo-Garrido, J. Roudet, J. & A. Deschamps, 2016b. Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria. *Phytopathologia Mediterranea*, 55(3), 301–322. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-18079](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-18079)
- Hanuman L. N. & G. Bindu Madhavi, 2018. Compatibility of *Pseudomonas fluorescens* with Pesticides *in vitro*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(03), 3310–3315. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.703.381>
- Jeffries C. D., D. F. Holtmann & D. G. Guse, 1957. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acid. *J. Bact.*, 590–591.
- Kai M., 2020. Diversity and Distribution of Volatile Secondary Metabolites Throughout *Bacillus subtilis* Isolates. *Frontiers in Microbiology*, 11, 478645. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.00559/BIBTEX>
- Kasfi K., P. Taheri, B. Jafarpour & S. Tarighi, 2018. Identification of epiphytic yeasts and bacteria with potential for biocontrol of grey mold disease on table grapes caused by *Botrytis cinerea*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 16(1), 1–16. <https://doi.org/10.5424/sjar/2018161-11378>
- Khan M. S., J. Gao, X. Chen, M. Zhang, F. Yang, Y. Du, T. S. Moe, I. Munir, J. Xue & X. Zhang, 2020. The Endophytic Bacteria *Bacillus velezensis* Lle-9, Isolated from *Lilium leucanthum*, Harbors Antifungal Activity and Plant Growth-Promoting Effects. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 668. <https://doi.org/10.4014/JMB.1910.10021>
- Kızıllırmak S., 2019. Alternaria türlerindeki genetik varyasyonların tespit edilmesinde RAPD-PCR tekniğinin kullanımı. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 74 s.
- Kim H. J., S. H. Lee, C. S. Kim, E. K. Lim, K. H. Choi, H. G. Kong, D. W. Kim, S. W. Lee & B. J. Moon, 2007. Biological control of strawberry gray mold caused by *Botrytis cinerea* using *Bacillus licheniformis* N1 formulation. In *Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 17, Issue 3, pp. 438–444).
- King E. O., M. K. Ward & D. E. Raney, 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.*, 44(2), 301–307.
- Klement Z., 1968. Pathogenicity factors in regard to relationships of phytopathogenic bacteria. *Phytopathology*, 58, 1218–1222.
- Krechel A., A. Faupel, J. Hallmann, A. Ulrich & G. Berg, 2002. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(9), 772–786. <https://doi.org/10.1139/W02-071>
- Kurt Ş., 2016. *Bitki fungal hastalıkları*. Akademisyen kitabevi, Ankara.
- Lane D. J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. (Editör: Stackebrandt E. & M. Goodfellow, *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*). John Wiley and Sons Chichester.
- Lee J. P., S. W. Lee, C.S. Kim, J. H. Son, J. H. Song, K. Y. Lee, H. J. Kim, S. J. Jung & B. J. Moon, 2006. Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 37(3), 329–337. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2006.01.001>

- Leroux P., 2007. Chemical Control of *Botrytis* and its Resistance to Chemical Fungicides. (Editör: Elad Y., B. Williamson, P. Tudzynski & N. Delen, *Botrytis: Biology, Pathology and Control*). Springer.
- Li Z., J. Li, M Yu, P. Quandahor, T. Tian & T. Shen, 2023. *Bacillus velezensis* FX-6 suppresses the infection of *Botrytis cinerea* and increases the biomass of tomato plants. *PLOS ONE*, 18(6), e0286971. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0286971>
- Loqman S., E. A. Barka, C. Clément & Y. Ouhdouch, 2009. Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(1), 81–91. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9864-6>
- Maachia B., E. Rafik, F. Cherif, P. Nandal, T. Mohapatra & P. Bernard, 2015. Biological control of the grapevine diseases “grey mold” and “powdery mildew” by *Bacillus* B27 and B29 strains. *Indian J Exp Biol.*, 53(2), 109–115.
- Magnin-Robert M., P. Trotel-Aziz, D. Quantinet, S. Biagianti & A. Aziz, 2007. Biological control of *Botrytis cinerea* by selected grapevine-associated bacteria and stimulation of chitinase and  $\beta$ -1,3 glucanase activities under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 118(1), 43–57. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9111-2>
- Mohiddin F. A. & M. R. Khan, 2013. Tolerance of fungal and bacterial biocontrol agents to six pesticides commonly used in the control of soil borne plant pathogens. *Journal of African Agricultural Research*, 8(43), 5331–5334. <https://doi.org/10.5897/AJAR11.677>
- Moradali M. F., S. Ghods & B. H. A. Rehm, 2017. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(FEB), 249785. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2017.00039/BIBTEX>
- Morgulis A., G. Coulouris, Y. Raytselis, T. L. Madden, R. Agarwala & A. A. Schäffer, 2008. Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics*, 24(16), 1757–1764. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn322>
- Müller H., R. Meincke & G. Berg, 2004. *Serratia plymuthica* HRO-C48: Strategy to control *Verticillium dahliae* in oilseed rape and effects on the microbial community. *IOBC/WPRS Bulletin*, 27, 399–404.
- Nağme S., 2005. Sofralık sultani üzüm çeşidinde hasat sonrası fungal çürüklerin epifitik mayalarla biyolojik kontrolü. Doktora tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, İzmir, 170 s.
- Nigris S., E. Baldan, A. Tondello, F. Zanella, N. Vitulo, G. Favaro, V. Guidolin, N. Bordin, A. Telatin, E. Barizza, S. Marcato, M. Zottini, A. Squartini, G. Valle & B. Baldan, 2018. Biocontrol traits of *Bacillus licheniformis* GL174, a culturable endophyte of *Vitis vinifera* cv. Glera. *BMC Microbiology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/S12866-018-1306-5>
- Özyılmaz Ü., 2007. Aydın ilinde çilek kök hastalıklarına karşı antagonist bakterilerle biyolojik savaş. Doktora tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, 128 s.
- Özyılmaz Ü., 2018. Bitki Hastalıklarına Karşı Biyolojik Mücadele Çalışmalarında Kullanılan Mikroorganizmaların İnsan Sağlığı açısından Taşıdığı Riskler. Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi / 26-28 Ekim 2018, Aydın, 55–55.
- Özyılmaz Ü., 2019. Biberde *Phytophthora* Yanıklığına Karşı Antagonist Bakterilerle Biyolojik Mücadele. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 652–661. <https://doi.org/10.29133/yyutbd.597443>
- Pal K. K. & B. Mc Spadden Gardener, 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*, DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02. <http://dx.doi.org/10.1094/phi-a-2006-1117-02>
- Paul B., A. Chereyathmanjiyil, I. Masih, L. Chapuis & A. Benoît, 1998. Biological control of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grapevine and elicitation of stilbene phytoalexin (resveratrol) by a soil bacterium. *FEMS Microbiology Letters*, 165(1), 65–70. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00259-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00259-6)

- R Core Team., 2022. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*. URL <https://www.R-Project.org/>.
- Rabosto X., M. Carrau, A. Paz, E. Boido, E. Dellacassa & F. M. Carrau, 2006. Grapes and vineyard soils as sources of microorganisms for biological control of *Botrytis cinerea*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 332–338.
- Sang M. K., S. C. Chun & K. D. Kim, 2008. Biological control of *Phytophthora* blight of pepper by antagonistic rhizobacteria selected from a sequential screening procedure. *Biological Control*, 46, 424–433. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.03.017>
- Sharrar A. M., A. Crits-Christoph, R. Méheust, S. Diamond, E. P. Starr & J. F. Banfield, 2020. Bacterial secondary metabolite biosynthetic potential in soil varies with phylum, depth, and vegetation type. *MBio*, 11(3), 1–17. [https://doi.org/10.1128/MBIO.00416-20/SUPPL\\_FILE/MBIO.00416-20-ST004.XLSX](https://doi.org/10.1128/MBIO.00416-20/SUPPL_FILE/MBIO.00416-20-ST004.XLSX)
- Şahin F. & M. Turan, 2020. Üzüm bitkisi verim ve fizyolojik parametreleri üzerine bitki büyümesini teşvik eden kök bakterisi *Bacillus megaterium* (M3)'un etkileri. *Bitki Sağlığında Dost Mikroorganizmalar Çalıştayı, Aralık*, 17–30.
- Tekeli F., 2014. Amerikan asma anaçlarında köklenmeyi artırıcı bazı uygulamalar. Yüksek lisans tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, 87 s.
- Tekiner N., E. Tozlu, R. Kotan & F. Dadasoglu, 2020. Biological Control of *Botrytis cinerea* and *Alternaria Alternata* with Bioagent Bacteria and Fungi under *In-vitro* Conditions. *Fresenius Environmental Bulletin*, 29(01), 640–649.
- Towsend G. R. & J. W. Heuberger, 1943. Methods for estimating losses caused by disease in fungicide experiments. *Plant Disease Reporter*. <https://worldveg.tind.io/record/45569>
- Törün B., 2018. Aydın ve Mersin illerinden toplanan çileklerde *Botrytis cinerea* popülasyonlarındaki transpozon sıklığı ve fungusit dirençliliği. Doktora tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 141 s.
- Trotel-Aziz P., M. Couderchet, S. Biagiatti & A. Aziz, 2008. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany*, 64(1), 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.12.009>
- Wang F., J. Xiao, Y. Zhang, R. Li, L. Liu & Deng, 2021. Biocontrol ability and action mechanism of *Bacillus halotolerans* against *Botrytis cinerea* causing grey mould in postharvest strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 174, 111456. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2020.111456>
- Whiteman S. A. & A. Stewart, 1998. Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation on irradiated grape leaf tissue by the antagonistic bacterium *Serratia liquefaciens*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 26(4), 325–330. <https://doi.org/10.1080/01140671.1998.9514071>
- Yang X. J., S. Wang, J. M. Cao & J. H. Hou, 2018. Complete genome sequence of human pathogen *Kosakonia cowanii* type strain 888-76T. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(1), 16–17. <https://doi.org/10.1016/J.BJM.2017.03.010>
- Yıldız F., 1991. *In-vitro* Investigations on the Antagonistic Effects of several Isolates Against *Botrytis cinerea*. *J.Turk. Phytopath.*, 20(1), 11–22.
- Yıldız F., 2000. Studies on the Biological Control of Gray Mold Disease (*Botrytis cinerea* Pers.) of the Greenhouse Grown Tomatoes. *J. Turk. Phytopath.*, 29(2–3), 95–103.
- Yıldız F., M. Yıldız, N. Delen, A. Coşkuntuna, P. Kınay & H. Türküsay, 2007. The Effects of Biological and Chemical Treatment on Gray Mold Disease in Tomatoes Grown under Greenhouse Conditions. *Turk J Agric For*, 31(5), 319–325.
- Yıldız F., M. Yıldız, N. Delen, P. Kınay, M. Topuzoğlu & A. Akar, 2009. Sofralık Sultani Üzümlerde Nitelikli ve Güvenli Ürün Eldesinde Uygun Savaşım Programlarının Geliştirilmesi. TÜBİTAK TOVAG 1060767 sonuç raporu.

Zhang Z., S. Schwartz, L. Wagner & W. Miller, 2000. A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. *Journal of Computational Biology*, 7(1-2), 203-214. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>

**Özgün makale (Original article)**

**Antalya ili örtüaltı domates üretim alanlarında *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) larva parazitoitlerinin belirlenmesi üzerine araştırmalar\***

**The determination of larval parasitoids of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in greenhouses used for tomato cultivation in Antalya Province, Türkiye**

Yusuf YÜKSEKYAYLA <sup>1</sup>, Mahmut Mete KARACA <sup>2</sup>, Kamil KARUT <sup>2\*\*</sup>

**Abstract:** The aim of this study was to determine the larval parasitoids of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in greenhouses producing tomatoes in Antalya Province, Türkiye. The survey was conducted in the seven main tomato-producing districts of Antalya, namely Aksu, Demre, Elmalı, Finike, Korkuteli, Kumluca and Serik during the March to October growing season in 2021. Samples were taken from a total of 920 greenhouses and parasitoids were obtained from 10.43% of the samples. *Bracon* (*Habrobracon*) *didemie* Beyarslan (Hymenoptera: Braconidae) was identified as the only parasitoid of *T. absoluta* in the greenhouses. The highest percentage of parasitoid infestation was found in Elmalı (15%), followed by Korkuteli (12.5%), Finike (12.4%), Kumluca (11.43%), Serik (9.73%), Demre (8.97%) and Aksu (8.65%) districts. The first parasitoid individuals were detected in the 3<sup>rd</sup> week of May (Serik, Kumluca and Finike), and its emergence continued until October (Elmalı and Korkuteli). Even with the intensive application of insecticides to control *T. absoluta*, a larval parasitoid was identified within the Antalya greenhouses where tomato production takes place. This situation highlights the potential for increased parasitoid activity if environmentally friendly control approaches, that have minimal impact on natural enemies, are applied.

**Keywords:** *Tuta absoluta*, parasitoid, biological control, greenhouse, tomato, Antalya

**Öz:** Bu çalışma, Antalya ili sera üretiminin yapıldığı Aksu, Demre, Elmalı, Finike, Korkuteli, Kumluca ve Serik ilçelerinde zararlı Domates Güvesi, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)'nın larva parazitoitlerini belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Örneklemeler, örtüaltı domates yetiştiriciliğinin yoğun yapıldığı alanlarda, 2021 yılının mart ve ekim ayları arasında yapılmıştır. Antalya ilinde toplam 920 adet seradan örnek alınmış ve bu seraların %10.43'ünden parazitoit elde edilmiştir. Örnekleme yapılan

\* This study was produced from a part of the first author's master's thesis (Bu eser birinci yazarın yüksek lisans tez çalışmasından üretilmiştir).

<sup>1</sup> Bayer Crop Science, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup> Çukurova University, Agricultural Faculty, Department of Plant Protection, Adana, Türkiye

\*\* Corresponding author (Sorumlu yazar): karuti@cu.edu.tr

ORCID ID (Yazar sırasıyla): 0000-0001-5440-4551, 0000-0002-7486-5854, 0000-0002-1173-7265

Received (Alınış): 4 Ekim 2023

Accepted (Kabul ediliş): 3 Kasım 2023

ilçelerin tamamında Hymenoptera takımı Braconidae familyasına ait *Bracon (Habrobracon) didemie* Beyarslan, saptanan tek larva parazitoiti türü olmuştur. Parazitoit elde edilen sera oranı en yüksek Elmalı (%15) ilçesinde olmuş, bunu sırasıyla Korkuteli (%12.5), Finike (%12), Kumluca (%11.43), Serik (%9.73), Demre (%8.97) ve Aksu (%8.65) ilçeleri izlemiştir. İlk parazitoit bireyleri mayıs ayının üçüncü haftasında (Serik, Kumluca ve Finike) saptanmış, parazitoit çıkışları ekim ayına (Elmalı ve Korkuteli) kadar devam etmiştir. Antalya’da domates üretiminin yapıldığı seralarda, ana zararlı konumda olan *T. absoluta*’nın mücadelesinde yoğun insektisit kullanılmasına rağmen bir larva parazitoiti saptanmıştır. Bu durum, sera alanlarında görülen zararlılara karşı uygulanacak mücadele yöntemlerinde doğal düşmanlara etkisi az, çevre dostu yöntemler seçilmesi durumunda parazitoit aktivitesinin artabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Tuta absoluta*, parazitoit, biyolojik mücadele, örtüaltı, domates, Antalya

## Giriş

Dünyada ve Türkiye’de en çok üretilen kültür bitkilerinden birisi olan domates (*Solanum lycopersicum* L.) Solanaceae familyasının *Solanum* cinsi içerisinde bulunmaktadır. Anavatanı Peru olan domatesin, Dünya’ya Meksika’dan yayıldığı bilinmektedir (Gould 1983; Durmus et al. 2018). Dünya toplam yaş sebze üretiminin %16’sını oluşturan domates, ülkemizde yaş sebze tarımında %41’lik bir pay ile ilk sırada bulunmaktadır (FAO 2018). Türkiye’de en çok domates üretimi sırasıyla Akdeniz, Ege ve Marmara Bölgelerinde gerçekleşirken, illere göre bakıldığında ise 2.8 milyon ton üretim ve 193 bin dekar (%11.7) ekim alanıyla ilk sırayı Antalya almaktadır (TÜİK 2021).

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemiz tarımında da önemli bir yeri olan domatesin verimini ve kalitesini etkileyen birçok zararlı arthropod türü bulunmaktadır (Öngören et al. 1977; Yaşarakıncı & Hıncal 1997; Nawrocka 1999; Bulut & Göçmen 2000; Kılıç 2010; Canbay et al. 2011). Domates üretim alanlarında önemli verim ve kalite kayıplarına yol açan bu zararlılar arasında ise Domates Güvesi, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) ön plana çıkmaktadır (Siqueira et al. 2000; Pereyra & Sanchez 2006).

Güney Amerika Kıtası’nda 1964 yılında varlığı tespit edilen *T. absoluta*, 2000’li yılların ortasında Avrupa’da tespit edilmiştir. Avrupa’da ilk defa İspanya’da görülen zararlı daha sonra Akdeniz’e kıyısı olan ülkelere yayılmıştır (Garcia & Espul 1982; EPPO 2005; Urbaneja et al. 2007; Arno et al. 2009). *Tuta absoluta* Türkiye’de ise 2009 yılında İzmir iline bağlı Urla ilçesinde tespit edilmiş olup aynı yıl içerisinde yapılan çalışmalar neticesinde Çanakkale ilinde de rapor edilmiştir (EPPO 2010; Kılıç 2010). Bu yılı takip eden örtüaltı sezonunun başlamasıyla Ocak 2010’da Antalya ilinin Kumluca ilçesinde, Nisan 2010’da Mersin’in Adanalıoğlu beldesinde tespit edilmiştir. Günümüzde domates üretimi yapılan hemen hemen tüm örtüaltı ve açık alanların zararlı ile bulaşık olduğu bilinmektedir (Erler et al. 2010; Karut et al. 2011; Tatlı & Göçmen 2011; Ünlü 2011; Mamay & Yanık 2012; Bayram et al. 2014; Canbay et al. 2014; Aksoy & Karaca 2015; Aslan et al. 2017; Tanık et al. 2020).

Önemli popülasyonlar oluşturma yeteneğine sahip olan *T. absoluta*, tüm biyolojik dönemlerini domates bitkisinin yeşil aksamında ve meyvesinde bulmak mümkündür, ancak larva dönemleri zararlıdır. Larvalar bitkinin kök dışındaki tüm kısımlarıyla beslenir ve her gelişim döneminde zarar verirler. Yumurtadan çıkan larvalar, bitkinin büyüme uçlarında, yaprak, sap, gövde ve meyvelerde galeriler açarak zarar oluştururlar (Estay 2000; Arno et al. 2009; Cuthbertson et al. 2013; Guimapi et al. 2016).

*Tuta absoluta*, konukçu bitki türünün fazla olması ve geniş coğrafi bölgelere dağılılabilmek kabiliyetinden dolayı günümüzde hala yayılımına devam etmektedir. Zararlılığının mücadelesinde daha çok kimyasal mücadele tercih edilmekte ancak bu durum çevre ve insan sağlığını olumsuz etkilemektedir (Lietti et al. 2005). Zararlılığının gerek biyolojisi ve gerekse beslenme davranışı (bitki dokusu içerisinde galeri açarak) nedeniyle kimyasal mücadelede istenilen başarı elde edilememektedir. Bu sebepten dolayı insektisit uygulama sayısı ve dozu artmış ve buna bağlı olarak *T. absoluta* insektisitlere karşı dayanıklılık kazanmıştır (Siqueira et al. 2000; Lietti et al. 2005; Yalçın et al. 2015; Prasannakumar et al. 2020; İnak et al. 2021). Aynı zamanda kullanılan bu kimyasallar *Macrolophus pygmaeus* (Rambur 1839) ve *Nesidiocoris tenuis* (Reuter, 1895) (Hemiptera: Miridae) gibi doğal düşmanları olumsuz etkilemekte ve seralarda uygulanan tüm savaş programlarının bozulmasına neden olmaktadır (Arno & Gabarra 2011).

Başta Güney Amerika olmak üzere, zararlılığının görüldüğü coğrafi bölgelerde birçok parazitoit türü belirlenmiştir (Yu et al. 2006; Sánchez et al. 2009; Doğanlar & Yiğit 2011; Biondi et al. 2018). Bunların başında *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) cinsine ait yumurta parazitoitleri gelmektedir (Chailleux et al. 2012; Chailleux et al. 2013). Yumurta parazitoitleri dışında genellikle dış parazitoit olan larva parazitoitleri ile ilgili bulgular elde edilmiş ve bu türlerin büyük bir kısmının Hymenoptera takımının Eulophidae ve Braconidae familyalarına ait olduğu bildirilmiştir (Parra & Zucchi 2004; Zappala et al. 2013; El-Arnaouty et al. 2014).

Doğada mevcut doğal düşmanların korunması ve desteklenmesi biyolojik mücadelenin uygulama yöntemlerinden biridir. *Tuta absoluta* mücadelesinin daha etkin ve biyolojik mücadele gibi çevre dostu yöntemlerle yapılabilmesi için, zararlılığının doğal düşmanlarının ve yoğunluklarının belirlenmesi, bunlar üzerinde ayrıntılı çalışmaların yapılması ilk adım olarak görülmektedir. Bu çalışmanın amacı, Antalya ilinde örtüaltı domates yetiştiriciliği yapılan alanlarda *T. absoluta*'nın larva parazitoitlerini tespit ederek, bu zararlıya karşı yapılacak biyolojik mücadele çalışmalarına katkı sağlamaktır.

## Materyal ve Yöntem

### Sörvey çalışmaları

Antalya ili domates yetiştirilen sera alanlarında *T. absoluta* parazitoitlerini belirlemek amacıyla 2021 yılı üretim sezonunda; Aksu, Demre, Elmalı, Finike, Korkuteli, Kumluca ve Serik olmak üzere toplam 7 ilçeden örnekler alınmıştır. Kültür bitkisi ekim-dikim zamanına göre farklılık gösteren örneklemeler; Demre ve



Finike ilçelerinde mart-haziran ayları arasında, Aksu, Kumluca ve Serik ilçelerinde mart-temmuz ayları arasında, Elmalı ve Korkuteli'nde ise ağustos-ekim aylarında gerçekleştirilmiştir (Çizelge 1). Örnekleme, domates seralarının bulunduğu ilçelere yapılan, periyodik olmayan arazi çıkışları ile gerçekleştirilmiştir. Ziyaret edilen bu seralarda, *T. absoluta* larvaları ile bulaşık 100 domates yaprağı kese kağıdına alınarak, buz kutuları içerisinde parazitöitin elde edileceği oda koşullarına getirilmiştir. Yapraklar, bitkilerin farklı yerlerinden (alt, orta ve üst) rastgele seçilmiştir. Zararının larva dönemi ile bulaşık yapraklar parazitöit erginleri çıkıncaya kadar ince tül ile kaplı ve sadece bir kısmı ışık alan parazitöit elde etme kaplarında oda koşullarında bekletilmiştir. Yapraklarda başka bir zararının (Örn. *Liriomyza* spp.) neden olduğu galerilerin olmamasına dikkat edilmiştir. Her bir seradan alınan örnekler farklı popülasyon kabul edilerek farklı parazitöit elde etme kaplarına alınmıştır.

Yapılan günlük kontroller ile *T. absoluta*'nın larva dönemlerinden elde edilen ergin parazitöit örnekleri ağız aspiratörü yardımı ile toplanarak, %70'lik alkol bulunan Eppendorf tüplerine alınmıştır. Tüpler içerisine parazitöitlere ait etiket bilgileri yazılarak teşhisleri yapılmak üzere + 4 °C'de saklanmıştır. Çalışmalardan elde edilen parazitöit türleri, tanı için ilgili konu uzmanına gönderilmiştir.

#### Verilerin değerlendirilmesi

Yapılan sörveyler sonucunda Antalya ili domates seralarında *T. absoluta*'nın parazitlenme durumu öncelikle her ilçe için farklı tarihlerde örnek alınan sera sayısı, parazitöit elde edilen sera sayısı ve her seradan elde edilen birey sayısı bir arada olacak şekilde grafikler ile sunulmuş ve her ilçe için parazitöitin görülmeye başladığı ve son bulunduğu tarihler belirtilmiştir. Bunun dışında örnekleme yapılan her ilçe ve Antalya ili için olmak üzere parazitöit elde edilen sera oranları hesaplanmıştır. Bu değerleri elde etmek için parazitöit elde edilen sera sayısı örnekleme yapılan toplam sera sayısına bölünüp yüz ile çarpılmıştır.

#### Bulgular ve Tartışma

Örnekleme yapılan ilçelerin tamamında parazitöit elde edilmiş ve parazitöitlerin tamamının Hymenoptera takımı, Braconidae familyasından *Bracon (Habrobracon) didemie* (Beyarslan 2002) olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu daha önce Antalya ili için bildirilenlerden farklıdır. Topakçı et al. (2022), Antalya'nın Elmalı ve Korkuteli ilçesi sera alanlarında *B. concolorans* Marshall (Hymenoptera: Braconidae) ve *B. variegator* Spinola (Hymenoptera: Braconidae) olmak üzere iki parazitöit türü belirlediklerini ve *B. variegator* (Hymenoptera: Braconidae)'ın Türkiye için ilk kayıt niteliğinde olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışma ile Antalya ilinde ilk kez belirlenen *B. didemie*, 2002 yılında Beyarslan tarafından tanımlanmış, ardından Türkiye'den farklı araştırmacılar (Yu et al. 2006; Beyarslan et al. 2010) tarafından da konukçusu belirtilmeden kaydedilmiştir. Doğanlar & Yiğit (2011), bu türü Antakya'da ilk kez *T. absoluta* larvaları üzerinden saptamış daha sonra Altun & Çıkman (2019), *B. didemie*'yi *T. absoluta*'nın larva parazitöiti olarak bildirmişlerdir. Ayrıca Ameri et al. (2015), B.

didemie'nin İran için yeni kayıt olduğunu belirlemişlerdir. Son olarak Karut et al. (2023) *B. didemie*'yi Adana ili tarla domatesi üretim alanlarında saptamış ve domates güvesinin biyolojik mücadelesinde kullanılabilecek potansiyel doğal düşman olarak bildirmişlerdir.

*Tuta absoluta*'ya karşı biyolojik mücadele çalışmaları ana vatanı olan Güney Amerika'da başlamış, zararının 2000'li yılların ortalarında Avrupa'da rapor edilmesi ve devamında büyük zarar oranlarına ulaşmasıyla birlikte, doğal düşmanlarının belirlenmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır (Desneux et al. 2010; Abbas et al. 2013; Zappala et al. 2013; Ferracini et al. 2019; Arno et al. 2021). Bu bağlamda birçok parazitoit *T. absoluta*'nın doğal düşmanı olarak rapor edilmiştir (Desneux et al. 2010; Biondi et al. 2018). Bunlar arasında Braconidae familyasına ait türler *T. absoluta*'nın larva parazitoiti olarak hem Güney Amerika'da hem de Avrupa'da kaydedilmiş ve zararlıyla mücadelede ümit var sonuçlar elde edilmiştir (Marchiori et al. 2004; Bacci et al. 2008; Desneux et al. 2010; Loni et al. 2011; Ferracini et al. 2012; Gabarra et al. 2013; Zappala et al. 2013).

*Tuta absoluta* parazitoitlerinin ve yaygınlıklarının belirlendiği bu çalışma kapsamında sadece bir tür saptanmıştır. Ancak bu konuda gerek Türkiye'de gerekse farklı ülkelerde yürütülen çalışmalarda belirlenen tür sayısının daha fazla olduğu görülmektedir. Örneğin; Doğanlar & Yiğit (2011), Hatay ilinde Hymenoptera takımının Eulophidae, Chalcididae, Pteromalidae ve Braconidae familyalarına ait 9 parazitoit türün bulunduğunu bildirmişlerdir. Karabüyük (2011), Doğu Akdeniz Bölgesi sebze alanlarında Hymenoptera takımına bağlı 5 familya (Mymaridae, Ichneumonidae, Chalcidoidea, Braconidae, Eulophidae) tespit etmiştir. Bayram et al. (2014), Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde (Şanlıurfa, Diyarbakır ve Mardin) zararlının iki larva parazitoidi, *B. hebetor* ve *Apanteles* sp. (Hymenoptera: Braconidae) ile bir larva pupa parazitoidi *Campoplex* sp. belirlemişlerdir. Bayram et al. (2016), *Necremnus cosmopterix* Ribeset Bernardo (Hymenoptera: Eulophidae)'i *T. absoluta*'nın larva paraziti olarak bildirmişlerdir.

Antalya ili sera domatesi üretiminin yoğun yapıldığı ilçelerde en fazla örnek 185 adet ile Aksu ve Serik ilçelerinden alınmış, bu ilçeleri 175 adet ile Finike izlemiştir. En az örnek Antalya'nın yüksek rakımlı ilçeleri olan Elmalı ve Korkuteli'nden alınmıştır. Bu ilçelerde ulaşımın zor ve üretim sezonunun kısa olması nedeniyle en fazla 40 seradan örnek alınabilmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Antalya ili sera alanlarında örnek alınan ilçeler, örnekleme periyodu ve örnek alınan sera sayıları.

Table 1. Sampling details of greenhouses of Antalya.

İlçe	Sezon	Sera Sayısı
Aksu	Mart-Temmuz, 2021	185
Demre	Mart-Haziran, 2021	145
Elmalı	Ağustos-Ekim, 2021	40
Finike	Mart-Haziran, 2021	150
Korkuteli	Ağustos-Ekim, 2021	40
Kumluca	Mart-Temmuz, 2021	175
Serik	Mart-Temmuz, 2021	185

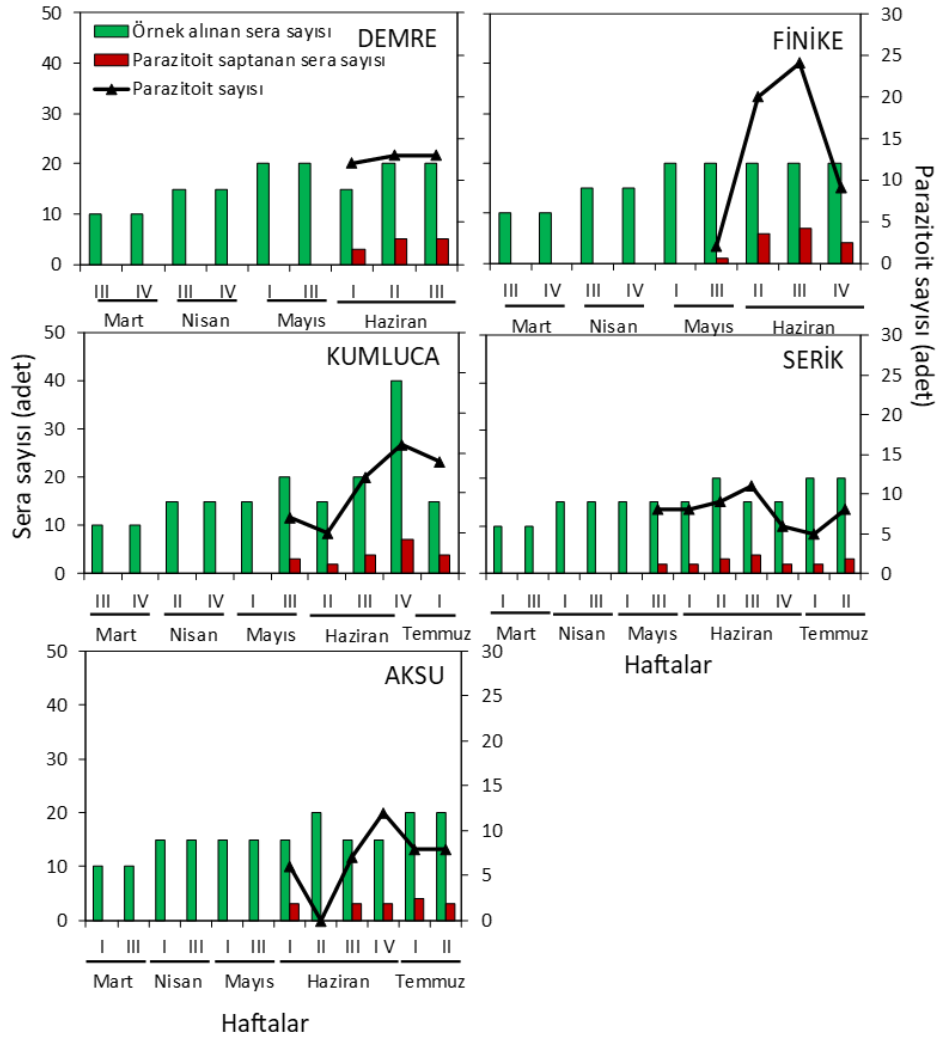
Demre ilçesinde örnekleme mart ayının 3. haftasında 10 adet sera ile başlamış, haziran ayının 3. haftasına kadar devam etmiştir. Mayıs ayında yüksek sera sayısına ulaşılmasına rağmen herhangi bir parazitoite rastlanmamıştır. Demre ilçesi seralarında ilk parazitoit bireyleri haziran ayının ilk haftasında (12 adet) elde edilmiştir. Ergin çıkışları haziran ayı süresince devam etmiş, 2 ve 3. haftalarda benzer sayıda (13 adet) parazitoit elde edilmiştir (Şekil 1).

Finike ilçesinde örnekleme mart ayının 3. haftasında başlamış, haziran ayının 4. haftasına kadar devam etmiştir. Örnek alınan sera sayısı mart ayında 10 adet ile başlarken, üretim sezonunun ilerlemesiyle bu sayı mayıs ayında 20 adede ulaşmıştır. Finike ilçesi seralarında ilk parazitoit bireyleri mayıs ayının 3. haftasında saptanmış, ergin çıkışları haziran ayının son haftasına kadar devam etmiştir. En yüksek parazitoit sayısı haziran ayının 3. haftasında saptanmış, haftalık parazitoit sayıları 2 ile 24 adet arasında değişmiştir (Şekil 1).

Kumluca ilçesinde örnekleme mart ayının 3. haftasında başlamış, temmuz ayının ilk haftasına kadar devam etmiştir. Kumluca ilçesi seralarında ilk parazitoit bireyleri mayıs ayının 3. haftasında saptanmış, çıkışlar temmuz ayının 1. haftasına kadar devam etmiştir. En yüksek parazitoit sayısı, 15 adet ile örnek alınan sera sayısının en yüksek olduğu (40 adet) haziran ayının 4. haftasında saptanmıştır (Şekil 1).

En yüksek örnek alınan sera sayısına ulaşılan iki ilçeden biri olan Serik'te mart ayının ilk haftasında başlayan sürveylerde, ilk parazitoit çıkışı mayıs ayının 3. haftasında toplanan örneklerden elde edilmiş ve sayısı haftalara bağlı olarak değişse de ergin çıkışları sürveyin son haftasına kadar devam etmiştir. En yüksek ergin parazitoit sayısı haziran ayının 3. haftasında saptanmış, diğer haftalarda bu sayı 5 ile 12 adet arasında değişmiştir (Şekil 1).

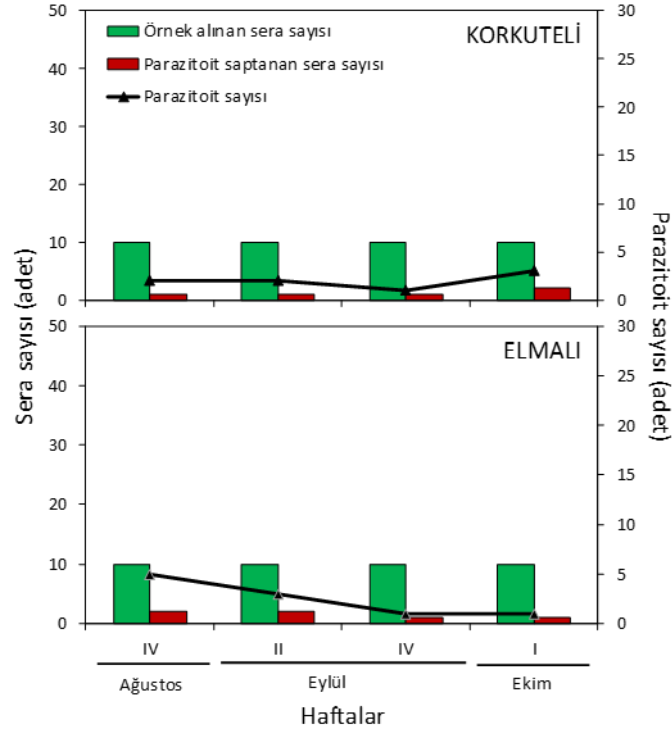
Aksu ilçesinde örnekleme mart ayının ilk haftasında başlamış, temmuz ayının 2. haftasına kadar devam etmiştir. Aksu ilçesi seralarında ilk parazitoit bireyleri haziran ayının ilk haftasında saptanmış, en yüksek parazitoit sayısı 12 adet ile haziran ayının 4. haftasında kaydedilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Antalya ili ilçelerinden örnek alınan, parazitoit saptanan ve buralardan elde edilen parazitoit sayıları.

Figure 1. The numbers of sampled, parasitoids obtained greenhouses and parasitoids in Antalya.

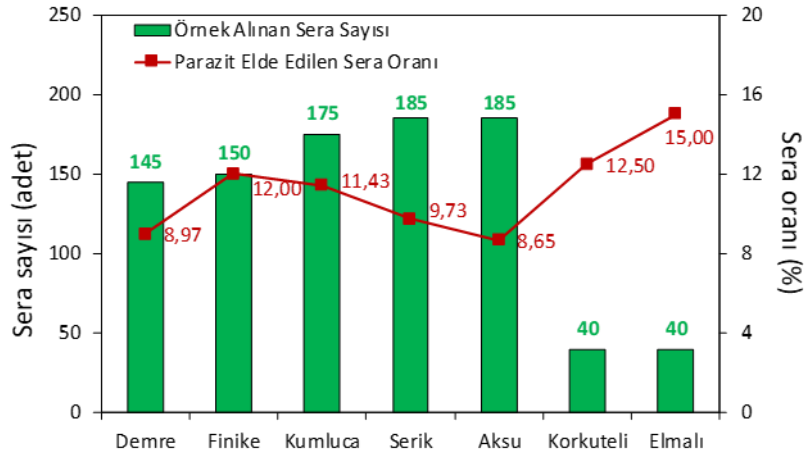
Korkuteli ilçesinde örnekleme ağustos ayının 4. haftasında başlamış, ekim ayının ilk haftasına kadar devam etmiştir. Korkuteli ilçesi seralarında ilk parazitoit bireyleri ağustos ayının 4. haftasında saptanmış, çıkışlar ekim ayının ilk haftasına kadar devam etmiştir. En yüksek parazitoit sayısı (3 adet) son örnekleme haftasında elde edilmiştir (Şekil 2). Elmalı ilçesinde, parazitoitler, ilk örnekleme haftasından (ağustos başı) itibaren saptanmış, düşük sayılarda da olsa ekim ayının ilk haftasına kadar devam etmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Antalya ili Korkuteli ve Elmalı ilçelerinden örnek alınan, parazitot saptanan ve elde edilen parazitot sayıları.

Figure 1. The numbers of sampled, parasitoids obtained greenhouses and parasitoids in Korkuteli and Elmalı, Antalya.

Antalya ili seralarında parazit elde edilen sera oranı %8.65 ile %15 arasında değişmiş, en yüksek Elmalı (%15) ilçesinde saptanmış, bunu sırasıyla Korkuteli (%12.5), Finike (%12), Kumluca (%11.43), Serik (%9.73), Demre (%8.97) ve Aksu (%8.65) ilçeleri izlemiştir. Toplam 920 adet seradan örnek alınmış ve bu seraların %10.43'ünde parazitot elde edilmiştir. (Şekil 3).



Şekil 3. Antalya ili farklı ilçelerinden örnek alınan sera sayıları ile parazitoit elde edilen sera oranları (%).

Figure 3. The numbers and rates of sampled and parasitoids obtained greenhouses in Antalya.

Bu çalışma kapsamında amaç, *T. absoluta*'nın larva parazitoitlerini ve yaygınlıklarını belirlemek olduğundan saptanan türün parazitlenme oranları belirlenmemiştir. Ancak bu konuda daha önce yapılan çalışmalarda *T. absoluta*'nın parazitlenme oranlarının %1.1 ile %21 arasında değiştiği görülmektedir. Marchiori et al. (2004), Brezilya seralarında Braconidae familyasına ait 22, Chalcididae familyasına ait 13 tür belirlemiş, bu familyalara ait parazitlenme oranları da sırasıyla %4.2 ve %2.6 olarak bildirmişlerdir. Bacci et al. (2008), Brezilya'da *Bracon* cinsine ait bir türün *T. absoluta*'nın üçüncü larva dönemini %0-16.8 oranında parazitlediğini bildirmişlerdir. Doğanlar & Yiğit (2011), Antakya ilçesinde *B. hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) ve *B. didemie* türlerin parazitlenme oranlarını sırasıyla, %1.1 ve %7.0 olarak belirlemişlerdir. Luna et al. (2011), *Neochrysocharis formosa* (Westwood) (Hymenoptera: Eulophidae)'nın *T. absoluta*'yı parazitlenme oranının %1.5 ile %11.2 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Kinyanjui et al. (2021), *T. absoluta* ile bulaşık alanlarda yedi farklı parazitoit türün parazitlenme oranının %7.26, *Hockeria* sp. (Hymenoptera: Chalcididae)'ye bağlı türlerin yaygın olduğunu bildirmişlerdir. Sambo et al. (2022) *Stenomiesius* sp. near *japonicus* (Ashmead) (Hymenoptera: Eulophidae) ve *B. nigricans* (Hymenoptera: Braconidae) türlerini *T. absoluta* ile bulaşık alanlarda sırasıyla en yüksek %17 ve %21 oranlarında belirlemişlerdir.

Bu çalışmada, Antalya'da domates üretiminin yapıldığı seralarda, zararlıların mücadelesi için yapılan insektisit uygulamalarına (çoğunlukla Metaflumizone, Indoxacarb, Abamectin, Methoxyfenozide, Spinetoram, Spinosad, Cyantranilprole, Emamectin benzoate ve Flubendiamide) karşın bir larva parazitoiti *B. didemie* saptanmıştır. Bu durum, sera alanlarında zararlılarla mücadelede doğal düşmanlara etkisi az, çevre dostu yöntemler seçilmesi durumunda parazitoit aktivitelerinin artabileceğini göstermektedir. Elde edilen bu

sonuç, sera alanlarında uygulanacak biyolojik mücadele temelli tüm savaş çalışmalarıyla, domatesin ana zararlısı konumunda olan *T. absoluta*'nın bu konumundan uzaklaştırılmasına katkı sunabilecek son derece önemli ve ümitvar bir bulgu niteliğindedir.

## Teşekkür

Bu çalışmada parazitoit türün teşhislerini gerçekleştiren Emekli Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ahmet Beyarslan'a teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

- Abbes, K., A. Biondi, L. Zappalà & B. Chermiti, 2013. Fortuitous parasitoids of the invasive tomato leafminer *Tuta absoluta* in Tunisia. *Phytoparasitica*, 42: 85-92.
- Aksoy, A. & İ. Karaca, 2015. Uşak ilinde yoğun domates yetiştiriciliği yapılan alanlarda (Hatipler ve Koyunbeyli) sera ve açık alan koşullarında domates yaprak galeri güvesinin popülasyon gelişimi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 19(3): 80-84.
- Altun, A. A. & E. Çıkman, 2019. Şanlıurfa ili doğal üretim alanlarında Domates Güvesinin [*Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae)] doğal düşmanlarının belirlenmesi. *ADYUTAYAM Dergisi*, 7(2): 1-6.
- Ameri, A., A. A. Talebi, E. Rakhshani, A. Beyarslan & K. Kamalı, 2015. Additional evidence and new records of the genus *Bracon fabricius*, 1804 (Hymenoptera: Braconidae) in southern Iran. *Turkish Journal of Zoology*, 39(6): 1110-1120.
- Arno, J. & R. Gabarra, 2011. Side effects of selected insecticides on the *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) predators *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Pest Science*, 84:513-520.
- Arno, J., P. Molina, Y. Aparicio, C. Denis, R. Gabarra & J. Riudavets, 2021. Natural enemies associated with *Tuta absoluta* and functional biodiversity in vegetable crops. *BioControl*, 66: 613-623.
- Arno, J., R. Sorribas, M. Prat, M. Matas, C. Pozo, D. Rodriguez, A. Garreta, A. Gomez & R. Gabarra, 2009. *Tuta absoluta* a new pest in IPM tomatoes in the Northeast of Spain. *IOBC/WPRS Bulletin*, 49: 203-208.
- Aslan, M. M., S. Gençoğlan, G. Aygel & C. Ücük, 2017. Kahramanmaraş ilinde sera koşullarında *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) (Domates Güvesi)'nin popülasyon yoğunluğu. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi*, 20(4): 339-343.
- Bacci, L., M. C. Picanço, F. F. Sousa, E. M. Silva, M. R. Campos & H. V. V. Tomé, 2008. Inimigos naturais da traça do tomateiro. *Horticultura Brasileira*, 26: 2808-2812.
- Bayram, Y., Ö. Bektaş, M. Büyük, N. Bayram, M. Duman & Ç. Mutlu, 2014. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) ve doğal düşmanlarının surveyi ile popülasyon takibi. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 5(2): 99-110.
- Bayram, Y., Y. Güler, V. Fursov, M. Kodan & A. Öğreten, 2016. First record of *Necremnus cosmopterix* Ribeset Bernardo, 2015 (Hymenoptera: Eulophidae), as a larval parasitoid of the tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in Turkey. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 26(4): 853-854.

- Beyarslan, A., O. Çetin Erdogan & M. Aydogdu, 2010. A synopsis of *Bracon* species of Turkey with description of a new species (Hymenoptera: Braconidae: Braconinae). *Biologia*, 65(1):104-109.
- Biondi, A., R. N. C. Guedes, F. Wan & N. Desneux, 2018. Ecology, worldwide spread, and management of the invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*: past, present, and future. *Annual Review of Entomology*, 63: 239-258.
- Bulut, E. & H. Göçmen, 2000. Pests and their natural enemies on greenhouse vegetables in Antalya. *IOBC/WPRS Bulletin*, 23(1): 33-37.
- Canbay, A., İ. Alaserhat & Ö. Tohma, 2014. Erzincan ve Iğdır illeri domates alanlarında zararlı *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep.: Gelechiidae) ve predatörlerinin popülasyon takibi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 45(1): 79-97.
- Canbay, A., Ö. Bozbek, H. Alıcı & İ. F. Çakırbey, 2011. Erzincan ili örtüaltında yetiştirilen domates ve hıyarlarda görülen zararlı türlerin tespiti ve popülasyon gelişimi. *Bitki Koruma Bülteni*, 51(2): 119-146.
- Chailleux, A., N. Desneux, J. Seguret, H. Do Thi Khanh, P. Maignet & E. Tabone, 2012. Assessing European egg parasitoids as a mean of controlling the invasive South American tomato pinworm *Tuta absoluta*. *PLOS ONE*, 7: e48068.
- Chailleux, A., P. Bearez, J. Pizzol, E. Amiens-Desneux, R. Ramirez-Romero & N. Desneux, 2013. Potential for combined use of parasitoids and generalist predators for biological control of the key invasive tomato pest *Tuta absoluta*. *Journal of Pest Science*, 86(3): 533-541.
- Cuthbertson, A. G. S., J. J. Mathers, L. F. Blackburn, A. Korycinska, W. Luo, R. J. Jacobson & P. Northing, 2013. Population development of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) under simulated UK glasshouse conditions. *Insects*, 4(2):185-197.
- Desneux, N., E. Wajnberg, A. G. Kris, G. Wyckhuys Burgio, G. Arpaia, C. Vasques, J. Cabrera, D. Ruescas, E. Tabone, J. Fransom, J. Pizzol, T. Cabello & A. Urbaneja, 2010. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *Journal of Pest Science*, 83: 197-215.
- Doğanlar, M. & A. Yigit, 2011. Parasitoid complex of the Tomato Leaf Miner, *Tuta absoluta* (Meyrick 1917), (Lepidoptera: Gelechiidae) in Hatay, Turkey. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi*, 14(4): 28-37.
- Durmus, M., O. Yetgin, M. M. Abed, K. E. Haji & K. Akcay, 2018. Domates bitkisi, besin içeriği ve sağlık açısından değerlendirmesi. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 1(2): 59-74.
- El-Arnaouty, S. A., J. Pizzol, H. H. Galal, M. N. Kortam, A. I. Afifi, V. Beyssat, N. Desneux, A. Biondi & I. H. Heikal 2014. Assessment of two *Trichogramma* species for the control of *Tuta absoluta* in North African tomato greenhouses. *African Entomology*, 22(4): 801-809.
- EPPO, 2005. Data sheets on quarantinepests: *Tuta absoluta*. *OEPP/ EPPO Bulletin*, 35:434-435.
- EPPO, 2010. First record of *Tuta absoluta* in Turkey. EPPO Reporting Service no. 11-2010 Num. article: 2010/208.
- Erlor, F., M. Can, M. Erdoğan, A. Ö. Ateş & T. Pradier, 2010. New record of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) on greenhouse-grown tomato in Southwestern Turkey (Antalya). *Journal Entomology Sciences*, 45(4): 392-393.
- Estay, P., 2000. Polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick). Santiago: Informativo INIA La Platina. no. 9. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/4505> (28 Ağustos 2022).
- FAO, 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/>. (Erişim tarihi: 24 Haziran 2020).



- Ferracini, C., B. L. Ingegno, M. Mosti, P. Navone, L. Tavella & A. Alma, 2012. Promising native candidates for biological control of *Tuta absoluta* in Italy. *IOBC/WPRS Bulletin*, 80: 51-55.
- Ferracini, C., V. H. P. Bueno, M. L. Dindo, B. L. Ingegno, M. G. Luna, N. G. S. Gervasio, N. E. Sánchez, G. Siscaro, J. C. van Lenteren, L. Zappalà & L. Tavella, 2019. Natural enemies of *Tuta absoluta* in the Mediterranean basin, Europe and South America. *Biocontrol Science and Technology*, 29(6): 578-609.
- Gabarra, R., J. Arno, L. Lara, M. J. Verdu', A. Ribes, F. Beitia, A. Urbaneja, M. M. Tellez, O. Molla' & J. Riudavets, 2013. Native parasitoids associated with *Tuta absoluta* in the tomato production areas of the Spanish Mediterranean Coast. *BioControl*, 59(1): 45-54.
- Garcia, M. F. & J. C. Espul, 1982. Bioecología de la polilla del tomate (*Scrobipalpula absoluta*) en Mendoza, República Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 17(2): 135-146.
- Gould, W. A., 1983. Tomato Production. Processing and Quality Evaluation. Avi Publishing Company, 445.
- Guimapi, R. Y. A., S. A. Mohamed, G. O. Okeyo, F. T. Ndjomatchoua, S. Ekesi & H. E. Z. Tonnang, 2016. Modeling the risk of invasion and spread of *Tuta absoluta* in Africa. *Ecological Complexity*, 28: 77-93.
- İnak, E., E. Özdemir, A. E. Atış, F. R. Zelyüt, A. İnak, Ü. Demir, E. Roditakis & J. Vontas, 2021. Population structure and insecticide resistance status of *Tuta absoluta* populations from Turkey. *Pest Management Science*, 77(10):4741-4748.
- Karabüyük, F., 2011. Doğu Akdeniz Bölgesi sebze alanlarında Domates Yaprak Galeri Güvesi [*Tuta absoluta* (Meyrick)]'nin popülasyon gelişmesi, yayılışı, konukçuları ile parazitöit ve predatörlerinin saptanması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma, Adana, Yüksek lisans tezi, 33s.
- Karut, K., C. Kazak, I. Döker & M. R. Ulusoy, 2011. Mersin ili domates seralarında Domates Yaprak Galeri Güvesi *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae)'nin yaygınlığı ve zarar durumu. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 35 (2): 339-347.
- Karut, K., M. M. Karaca, İ. Döker & C. Kazak, 2023. Two promising larval parasitoids, *Bracon* (*Habrobracon*) *didemie* and *Dolichogenidea* *appellator* (Hymenoptera: Braconidae) for biological control of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 33:49
- Kılıç, T., 2010. First record of *Tuta absoluta* in Turkey. *Phytoparasitica*, 38(3): 243-244.
- Kinyanjui, G., F. Khamis, F. Ombura, E. Kenya, S. Ekesi & S. Mohamed, 2021. Distribution, abundance and natural enemies of the invasive tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick) in Kenya. *Bulletin of Entomological Research*, 111(6): 658-673.
- Lietti, M. M. M., E. Botto & R. A. Alzogaray, 2005. Insecticide resistance in Argentine populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotropical Entomology*, 34(1): 113-119.
- Loni, A., E. Rossi & K. van Achterberg, 2011. First report of *Agathis fuscipennis* in Europe as parasitoid of the tomato leafminer *Tuta absoluta*. *Bulletin of Insectology*, 64(1): 115-117.
- Luna, M. G., V. I. Wada, J. La Salle & N. E. Sanchez, 2011. *Neochrysocharis formosa* (Westwood) (Hymenoptera: Eulophidae), a newly recorded parasitoid of the Tomato Moth, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), in Argentina. *Neotropical Entomology*, 40(3): 412-414.
- Mamay, M. & E. Yanık, 2012. Şanlıurfa'da domates alanlarında Domates Güvesi [*Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)]'nin ergin popülasyon gelişimi. *Türkiye Entomoloji Bülteni*, 2(3): 189-198.

- Marchiori, C. H., C. G. Silva & A. P. Lobo, 2004. Parasitoids of *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) collected on tomato plants in lavras, State of Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 64(3A): 551-552.
- Nawrocka, B., 1999. The bionomics harmfulness and control of the Western Thrips *F. occidentalis* (Pergande) occurring on vegetables grown under glass in Poland. Instytut Warzywnictwa (Research Institute of Vegetable Crops RIVC), 102 p.
- Öngörenler, K., N. Kaya & Ş. Türkmen, 1977. Ege Bölgesi'nde domateslerde zarar yapan Yeşilkurt (*Heliothis armigera* Hubner)'un morfolojisi, biyolojisi ve mücadelesi üzerinde araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 17(1): 3-28.
- Parra, J. R. & R. A. Zucchi, 2004. *Trichogramma* in Brazil: feasibility of use after twenty years of research. *Neotropical Entomology*, 33(3): 271-281.
- Pereyra, P. C. & N. E. Sanchez, 2006. Effect of two Solanaceous plants on developmental and population parameters of the Tomato Leaf Miner *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotropical Entomology*, 35(5): 671-676.
- Prasannakumar, N. R., N. Jyothi, S. Saroja & G. R. Kumar, 2020. Relative toxicity and insecticide resistance of different field population of tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick). *International Journal of Tropical Insect Science*, 41: 1397-1405.
- Sambo, S. M., S. Ndlela, H. du Plessis, F. Obala & S. A. Mohamed, 2022. Identification, microhabitat, and ecological niche prediction of two promising native parasitoids of *Tuta absoluta* in Kenya. *Insects*, 13(6): 496.
- Sánchez, N. E., P. C. Pereyra & M. G. Luna, 2009. Spatial patterns of parasitism of the solitary of parasitoid *Pseudoapanteles dignus* (Hymenoptera: Braconidae) on *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Environmental Entomology*, 38(2): 365-374.
- Siqueira, H. A. A., R. N. C. Guedes & M. C. Picanço, 2000. Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Agricultural and Forest Entomology*, 2(2): 147-153.
- Tanık, R., Y. Çelikpençe & İ. Karaca, 2020. Afyonkarahisar ili domates serasında önemli zararlı popülasyonlarının renkli yapışkan tuzaklar ile izlenmesi. *Türk Bilim ve Mühendislik Dergisi*, 2(2): 71-77.
- Tatlı, E. & H. Göçmen, 2011. Domates Güvesi [*Tuta absoluta* (Meyrick)] (Lepidoptera: Gelechiidae)'nin Batı Akdeniz Bölgesi domates üretim alanlarında yayılışının ve popülasyon değişiminin izlenmesi. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi (28-30 Haziran 2011, Kahramanmaraş) Bildirileri, 496 s.
- Topakçı, N., U. Yukselbaba & H. Göçmen, 2022. Determination of the natural enemies and population fluctuation of *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) in highland greenhouses in Antalya, Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 31(6): 5451-5462.
- TÜİK, 2021. Türkiye İstatistik Kurumu. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/>. (Erişim tarihi: 21 Temmuz 2022).
- Urbaneja, A., R. Vercher, V. Navarro, F. García Marí & J. L. Porcuna, 2007. La polilla del tomate, *Tuta absoluta*. *Phytoma-España*, 194: 16-23.
- Ünlü, L., 2011. Domates Güvesi, *Tuta absoluta* (Meyrick)'nın Konya ilinde örtüaltında yetiştirilen domateslerdeki varlığı ve popülasyon değişimi. *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 25(4): 27-29.
- Yalçın, M., S. Mermer, L. D. Kozacı & C. Turgut, 2015. Insecticide resistance in two populations of *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) from Turkey. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 39(2): 137-145.
- Yaşarakıncı, N. & P. Hıncal, 1997. İzmir'de örtüaltında yetiştirilen domates, hıyar, biber ve marul da bulunan zararlı ve yararlı türler ile bunların popülasyon yoğunlukları üzerinde araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 37(1-2): 79-89.

- Yu, D. S., C. Achterberg & K. Horstmann, 2006. Interactive Catalogue of World Ichneumonoidea, Taxonomy, Biology, Morphology and Distribution. Compact Disc. (Master Version), Taxapad, Canada.
- Zappala, L., A. Biondi, A. Alma, I. J. Al-Jboory, J. Arno`, A. Bayram, A. Chailleux, A. El-Arnaouty, D. Gerling, Y. Guenaoui, L. Shaltiel-Harpaz, G. Siscaro, M. Stavrínides, L. Tavella, R. V. Aznar, A. Urbaneja & N. Desneux, 2013. Natural enemies of the South American moth, *Tuta absoluta*, in Europe, North Africa and Middle East, and their potential use in pest control strategies. *Journal of Pest Science*, (86): 635-647.

*Özgün makale (Original article)*

## Çanakkale İli'nde tarım dışı bir habitat olan Çardak Lagünü'ndeki afidofag syrphidler (Diptera: Syrphidae)\*

Şahin KÖK<sup>1\*\*</sup> İsmail KASAP<sup>2</sup>

**Aphidofagous syrphids (Diptera: Syrphidae) from the Çardak Lagoon area, a non-agricultural habitat in Çanakkale Province, Türkiye**

**Abstract:** The present study aimed to determine the aphidophagous syrphids (Diptera: Syrphidae) in the Çardak Lagoon area, which is close to agricultural areas in Çanakkale Province, Türkiye. Sampling was done during the spring and summer in 2020. Five syrphid species belonging to five genera were associated with seven aphid species (Hemiptera: Aphididae) on eight host plants were collected. *Episyrphus balteatus* (de Geer) was the most polyphagous syrphid, being associated with the five host aphid species, whereas *Eupeodes corollae* (Fabricius) was associated with only one host aphid species. These results revealed that non-agricultural habitats such as a lagoon and wetland, which are close to agricultural fields, are an important refuge for aphidophagous syrphids, and highly likely for other predators and parasitoids. Consequently, this study suggests that the Çardak Lagoon and associated wetland constitute an important biodiversity resource and their protection should be a high priority, including as a refuge for fauna that can contribute to the biological control of pests in nearby agricultural areas.

**Keywords:** Syrphid, aphid, interaction, non-agricultural, lagoon, Çanakkale

**Öz:** Bu çalışma ile Çanakkale İli'nde tarım alanlarına yakın olan Çardak Lagünü'ndeki afidofag syrphidler (Diptera: Syrphidae) belirlenmesi amaçlanmıştır. Örneklemeler 2020 yılının bahar ve yaz ayları boyunca gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda, sekiz farklı konukçu bitki üzerindeki Hemiptera takımı Aphididae familyasından yedi afit türü ile ilişkili, Syrphidae familyasındaki beş cins içerisinde toplam beş afidofag syrphid tespit edilmiştir. Tespit edilen türler arasında, beş konukçu afit türü ile ilişki olan *Episyrphus*

\* Bu eser 3. Uluslararası Biyoçeşitlilik Araştırmaları Sempozyumunda sözlü bildiri olarak sunulmuştur (This study was presented as an oral presentation at the 3rd International Symposium on Biodiversity Research, ISBR-2021).

<sup>1</sup> Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Lâpseki Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Bitki Koruma Programı, Çanakkale, Türkiye

<sup>2</sup> Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Çanakkale, Türkiye

\*\* Sorumlu yazar (Corresponding author): sahinkok@comu.edu.tr

ORCID ID (Yazar sırasıyla): 0000-0002-1092-8596, 0000-0002-0015-4558

Received (Alınış): 20 Ekim 2023

Accepted (Kabul ediliş): 23 Kasım 2023

*balteatus* (de Geer) en yaygın bulunan Syrphidae türü olmuştur. Diğer taraftan, *Eupeodes corollae* (Fabricius)'nin sadece bir konukçu afit türü ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, tarım alanlarına oldukça yakın konumda olan lagün ve sulak alanlar gibi tarım dışı habitatların afidofag syrphidler varlığı açısından zengin bir potansiyele sahip olduğunu ortaya koymuştur. Sonuç olarak, bu verilerin afidofag syrphidler korunmasına ve tarımsal ürünlerdeki zararlı afitlerin biyolojik mücadelesinde daha etkin kullanımına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Syrphid, afit, etkileşim, tarım dışı, lagün, Çanakkale

## Giriş

Afitler (Hemiptera: Aphididae) dünyada tarım ürünleri yetiştiriciliğinde ciddi ekonomik kayıplara sebep olabilen en önemli zararlı böcek gruplarından biri olarak bilinmektedir. Afitler bitki özsuyu ile beslenmeleri, salgıladıkları toksinlerden dolayı gal ve şekil bozukluklarına sebep olmaları, salgıladıkları tatlımsı madde ile fumajine sebep olmaları ve 270'ten fazla bitki virüs hastalık etmenine vektörlük yapmalarından dolayı tarım ürünlerinde önemli zararlara sebep olmaktadır (Katis et al. 2007). Tarımsal üretimi yapılan bitkilerin neredeyse tamamının en az bir zararlı afit türüne konukçuluk yaptığı bilinmektedir (Peters et al. 1991). Afitler farklı konukçu bitkiler üzerinde yaşamlarını devam ettirseler de belirli konukçu bitkilere özelleştikleri bilinmektedir. Afitler çeşitlilik, tür zenginliği, bulunma oranı, bitki etkileşimleri ve doğal düşman çeşitliliği açısından tarım, tarım dışı ve kentsel habitatlarda farklı tepkiler ortaya koyabilmektedirler (Janković et al. 2017; Kök et al. 2020; Doğan & Kök 2023). Ayrıca, anız ve mera alanları, yol kenarları, kentsel ve peyzaj alanları gibi tarım dışı habitatlar yıl içerisinde konukçu değiştirerek göç eden yaşam döngüsüne sahip afitler için alternatif barınma alanları olması açısından önemlidir (Wilkaniec et al. 2015).

Dünyada 2000'den fazla arthropoda türünün zararlı türlerin biyolojik mücadelesinde etkili olduğu bildirilmiştir (van Lenteren et al. 2006; Kaser & Heimpel 2018; Iturralde-García et al. 2020; Tiftikçi et al. 2020). Afit popülasyonları da diğer zararlı böcek gruplarında olduğu gibi predatör, parazitoit ve patojen gibi doğal düşmanlar tarafından baskı altında tutulmaktadır (Völkl et al. 2007; Gontijo et al. 2015; Mohammed & Hatcher 2017). Bu doğal düşman gruplarından Syrphidae (Diptera) familyasındaki türlerin erginleri polinatör olarak ve bazı türlerin larvaları ise afitler başta olmak üzere birçok böcek grubunun predatörü olarak önemli bir rol oynamaktadır (Dunn et al. 2020). Bazı syrphid türlerinin erginleri beslenmek için çiçekli bitkilerin nektar ve polenine ihtiyaç duyarlar ve böylece tozlaşmaya da dolaylı olarak katkı sunmaktadırlar (Lefebvre et al. 2014). Diğer taraftan, Syrphinae (Syrphidae) altfamilyasına ait türler ise doğal düşman olarak tarımsal ürünlerde zararlı afitlerin popülasyonlarının baskılanmasında önemlidir (Speight 2008; Rodriguez-Gasol et al. 2020). Bu türlerin larvalarının afitler ile beslenmesinin yanı sıra bazı türlerin erginleri avlarının feromonlarını algılayarak kolay bir şekilde avını bulma özelliğine

sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı afidofag syrphidler afitlerin doğal düşmanları olarak önemli bir potansiyele sahiptir (Dib et al. 2010).

Tarım dışı alanlarda bulunan çiçekli yabancı otlar, çalı ve ağaç formundaki bitkiler zararlı böcek türlerinin yanı sıra onların doğal düşmanlarına da ev sahipliği yaparak hem biyoçeşitlilik hem de tarım alanlarındaki biyolojik mücadeleye olumlu katkılar sağlamaktadır (Landis et al. 2000; Amoabeng et al. 2020). Bu yönden bakıldığında, tarım alanlarında yakın konumda bulunan tarım dışı alanlardaki uygun habitat yönetimi hem doğal düşmanlara alternatif av veya konukçu sağlaması hem de doğal düşmanların olumsuz etkilerden korunması açısından önemlidir. Ayrıca tarım dışı habitatlardaki doğal düşmanların korunması ve desteklenmesi istilacı zararlı türlerin olumsuz etkilerinin de en aza indirilmesine katkı sağlamaktadır (Jonsson et al. 2010). Dünyada ve Türkiye'deki tarım dışı habitatlar arasında, sulak alanlar hem faunal hem de floral çeşitliliğin yüksek olduğu korunan alanların başında gelmektedir. Lagünlerin de içerisinde bulunduğu kıyı sulak alanları, birçok zararlı tür ve bunların doğal düşmanları için besin, barınma ve kışlama alanlarına ev sahipliği yapan nadir jeomorfolojik oluşumlardır. Birçoğu tarım alanlarına oldukça yakın konumda olan bu habitatlar hem zararlı türlere hem de doğal düşmanlarına rezerv alan olması açısından oldukça önemlidir (Tomanović et al. 2012).

Üç tarafı denizler ile çevrili olan Türkiye'de tarım alanlarına oldukça yakın konumda çok sayıda kıyı sulak alanı veya lagün bulunmaktadır. Bu alanlarda yürütülen hem floral hem de faunal çalışmalar oldukça sınırlı kalmıştır. Özellikle bu alanlardaki zararlı afit ve doğal düşmanları üzerine çok sınırlı veriler bulunmaktadır. Bu doğrultuda bu çalışma ile Çanakkale İli'ne tarım alanlarına oldukça yakın konumda olan Çardak Lagünü'nde konukçu bitkiler üzerindeki afidofag syrphid-afit etkileşimlerinin ve syrphidler tarım alanlarındaki zararlı afitlerin biyolojik mücadelesinde kullanım potansiyellerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Yöntem

### Örnekleme bölgesi

Çardak Lagünü Avrupa ve Asya kıtalarını birbirinden ayıran iki su yolundan biri olan Çanakkale Boğazı'nın Marmara Denizi'ne açılan kuzey kısmında 40° 22' 36"-40° 23' 36" N ve 26° 42' 45"-26° 44' 18" E koordinatlarında yer almaktadır. Çardak Lagünü deniz içerisinde uzanan bir kara parçası ve anakara ile arasında bulunan bir lagün gölünden oluşmaktadır. Lagünün toprak yapısı alüvyon, kahverengi orman toprağı ve kumul topraktan oluşmaktadır. Bu alan Akdeniz ve Karadeniz ikliminin geçiş noktası konumundadır. Çardak Lagünü etrafında çok sayıda tahıl, sebze ve meyvelikleri içeren tarım alanları bulunmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. Çanakkale İli'nde bulunan Çardak Lagünü örnekleme bölgesi.  
Figure 1. The sampling area in the Çardak Lagoon in the Çanakkale Province.

### **Afidofag syrphid, konukçu afit ve konukçu bitkilerin toplanması, preparasyonu ve teşhisleri**

Bu çalışma kapsamında, Çardak Lagününden afidofag syrphid ve afit bireyleri ile konukçu bitkilerin örnekleme 2020 yılı bahar aylarında (Mart, Nisan, Mayıs) haftada bir ve yaz aylarında (Haziran, Temmuz, Ağustos) ise 15 günde bir olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Lagün alanı üzerindeki çiçekli yabancı ot, çalı ve ağaç formundaki bitkilerden afitler ile bulaşık olduğu belirlenen bitkiler belirlenmiş ve afit kolonisi üzerinde ve etrafında tespit edilen ergin syrphid bireyleri küçük atrap veya emgi tüpü ile yakalanıp örnekleme kavanozları içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Bulaşık afit kolonileri üzerinde tespit edilen syrphid larvalarının örnekleme için ise, bulaşık bitki kısımları budama makası ile kesilip önce bir gazete kağıdına sarılmış daha sonra polietilen torba içerisine koyularak buz kutularında laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen bulaşık bitki kısımları, afit kolonisi üzerindeki larvalardan ergin syrphid bireylerinin elde edilmesi için üst kısmı nemlenmenin önlenmesi amacıyla bir tül ile kapatılmış plastik kutular içerisinde iklim odası koşullarında [ $25\pm 2$  °C,  $65\pm 10$  nem ve 16:8

(aydınlık:karanlık)] kültüre alınmıştır. Sonraki günlerde yapılan kontrollerde bu plastik kutulardan elde edilen ve daha önce örnekleme alanından laboratuvara getirilen ergin syrphid bireyleri pamuğa emdirilmiş etil asetat kullanılarak cam kavanozlar içerisinde öldürülmüştür. Daha sonra bu bireyler vücudunun uygun yerinden böcek iğnesi kullanılarak iğnelenmiş ve etiket bilgileri de yazılarak teşhise hazır hale getirilmiştir. Teşhis için hazırlanan ergin syrphid bireyleri teşhis için uzmanına gönderilmiştir.

Diğer taraftan, konukçu afitlerin teşhis edilebilmesi için arazi koşullarında toplanan veya laboratuvara getirilen bulaşık bitkiler üzerinden elde edilen afit kolonilerindeki yeterli sayıda kanatlı ve kanatsız dönemdeki afitler bir fırça yardımı ile içerisinde %96 etil alkol bulunan eppendorf tüpleri içerisine alınmıştır. Etiket bilgileri de tüpler üzerine eklenerek teşhise hazır hale getirilmiştir. Lagün alanından örnekleme yapılan konukçu afitlerin preparasyon ve teşhisi için Hille Ris Lambers (1950)'in önerdiği yöntem kullanılmıştır. Afitlerin teşhisleri, HD kamerası bulunan LEICA DM 2500 model ışık mikroskobu ile LAS 4.1 paket programı kullanılarak Blackman & Eastop (2006; 2023)'a göre yapılmıştır. Bu çalışma kapsamında toplanan konukçu afitlerin teşhisleri sorumlu yazar tarafından gerçekleştirilmiştir. Ayrıca konukçu bitkilerden yabancı ot formunda olanların teşhis için herbaryumları yapılmış, çalı ve ağaç formunda olanların da ayrıntılı fotoğrafları çekilerek konu uzmanı tarafından teşhisleri gerçekleştirilmiştir.

### **Afidofag syrphid-konukçu afit-konukçu bitki etkileşimleri**

Çardak Lagünü alanında tespit edilen afidofag syrphid-konukçu afit-konukçu bitki etkileşimlerinin ortaya koyulması amacıyla, tüm örnekleme sürecinde konukçu bitkiler üzerinde tespit edilen syrphid ve afitlerin toplam birey sayıları esas alınarak R (3.6.1) programı içerisindeki “bipartite” paketinin “plotweb2” fonksiyonu kullanılarak tripartite etkileşim grafiği oluşturulmuştur (R Development Core Team 2023).

## **Bulgular ve Tartışma**

Bu çalışmada, Çanakkale İli'nde tarım alanlarına oldukça yakın bir konumda olan bir tarım dışı habitat ve sulak alan olan Çardak Lagününde, sekiz farklı konukçu bitki üzerindeki Aphididae familyasından yedi afit türü ile ilişkili, Syrphidae familyasındaki beş cins içerisinde toplam beş afidofag syrphid türü tespit edilmiştir.

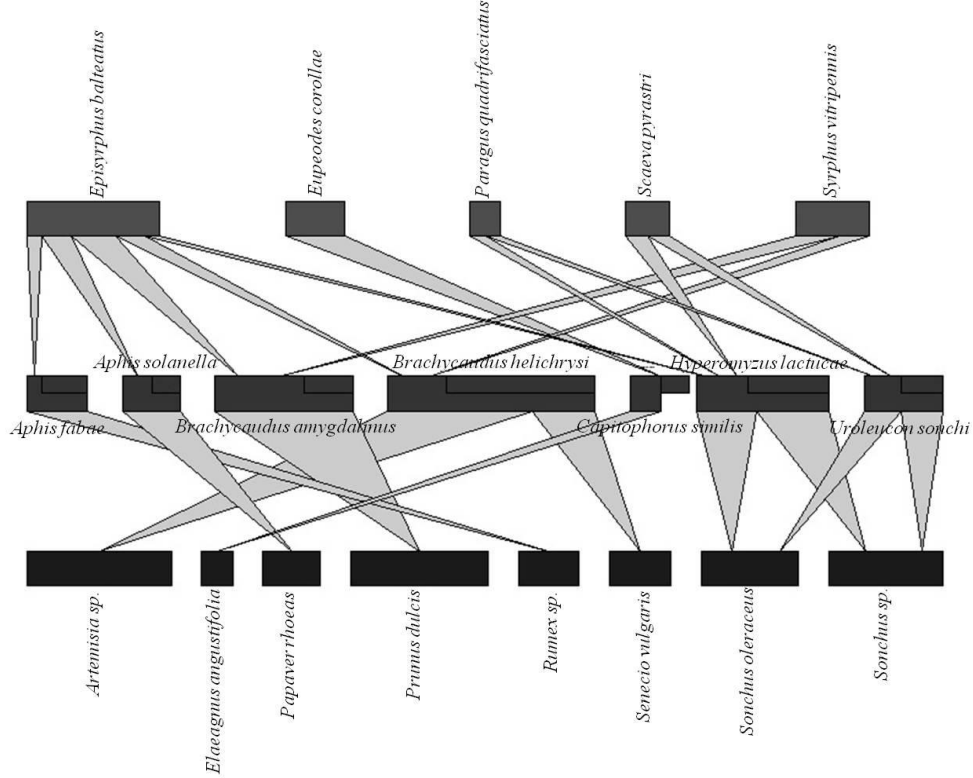
Tespit edilen türler Çizelge 1'de verilmiştir.



Çizelge 1. Çanakkale İli Çardak Lagünü'nde tespit edilen konukçu bitki türleri, afidofag syrphid türleri ve konukçu afit türleri  
Table 1. The host plant species, aphidofagous syrphid species and host aphid species in the Çardak Lagoon in the Çanakkale Province

<b>Konukçu Bitki Türleri</b>
<i>Artemisia</i> sp. (Asteraceae)
<i>Elaeagnus angustifolia</i> L. (Elaeagnaceae)
<i>Papaver rhoeas</i> L. (Papaveraceae)
<i>Prunus dulcis</i> (Mill.) (Rosaceae)
<i>Rumex</i> sp. (Polygonaceae)
<i>Senecio vulgaris</i> L. (Asteraceae)
<i>Sonchus oleraceus</i> (L.) (Asteraceae)
<i>Sonchus</i> sp. (Asteraceae)
<b>Afidofag Syrphid Türleri</b>
<i>Episyrphus balteatus</i> (de Geer)
<i>Eupeodes corollae</i> (Fabricius)
<i>Paragus quadrifasciatus</i> Meigen
<i>Scaeva pyrastris</i> (Linnaeus)
<i>Syrphus vitripennis</i> Meigen
<b>Konukçu Afit Türleri</b>
<i>Aphis fabae</i> Scopoli
<i>Aphis solanella</i> Theobald
<i>Brachycaudus helichrysi</i> (Kaltenbach)
<i>Brachycaudus amygdalinus</i> (Schouteden)
<i>Capitophorus similis</i> van der Goot
<i>Hyperomyzus lactucae</i> (Linnaeus)
<i>Uroleucon sonchi</i> (Linnaeus)

Bu çalışma sonucunda beş farklı afit türü üzerinde tespit edilen *E. balteatus* en yaygın afidofag syrphid türü olarak belirlenmiştir. Diğer syrphidlerden, *P. quadrifasciatus*, *S. pyrastris* ve *S. vitripennis* iki farklı afit türü üzerinde tespit edilmiştir. *Eupeodes corollae* ise sadece bir afit türü üzerinde tespit edilmiştir. Afit türlerinin etkileşimleri göz önüne alındığında ise *H. lactucae*'nin üç farklı afidofag syrphid türüne konukçuluk yaptığı belirlenmiştir. Diğer afitlerden, *B. amygdalinus*, *B. helichrysi* ve *U. sonchi* ikişer farklı syrphid türüne konukçuluk yaparken *A. fabae*, *A. solanella* ve *C. similis* üzerinde ise sadece bir syrphid türü tespit edilmiştir. Konukçu bitkiler göz önüne alındığında, *Sonchus* sp. ve *S. oleraceus* üzerinde beşer farklı afidofag syrphid-afit etkileşimi görülürken, *E. angustifolia*, *P. rhoeas* ve *Rumex* sp. üzerinde ise sadece birer farklı afidofag syrphid-afit etkileşimi tespit edilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Çanakkale İli Çardak Lagünündeki afidofag syrphid (üst), konukçu afit (orta) ve konukçu bitki (alt) türlerinin tripartite etkileşim grafiği (Siyah barlar türlerin bulunma oranlarını ve gri barlar türlerin etkileşimlerini göstermektedir.).

Figure 2. The graph of tripartite interactions of aphidofagous syrphids (top), host aphids (mid) and host plants (bottom) species in the Çardak Lagoon in the Çanakkale Province (Black bars in the graph shows the abundance of the species and gray bars shows the interactions.).

Tarım alanlarında fonksiyonel çeşitliliğin ve ekosistem hizmetlerinin sürdürülmesinde tarım dışı habitatlar oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Medeiros et al. (2018) tahıl yetiştirilen alanların etrafındaki habitat farklılıklarının tarımsal ekosistemlerdeki syrphidler üzerindeki etkilerini habitat karmaşıklığı derecesine göre araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda syrphidler tür zenginliği ve bolluğunun tarım dışı habitatların oranı ile pozitif olarak ilişkili olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Ayrıca, syrphid türlerinin çeşitliliğinin de tarım dışı habitatlar ile ilişkili olduğu ve bu habitatların azalmasının tür kaybına sebep olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuca paralel olarak, bu çalışmada tarım alanlarına oldukça yakın konumdaki çok küçük bir alan olan Lagün habitatından beş farklı afidofag syrphid türü elde etmemiz tarım dışı habitatların sağladığı potansiyeli destekler

niteliktedir. Syrphid türlerinin tarım dışı habitatlardaki varlığını destekleyen faktörlerin başında av mevcudiyeti gelirken, tarım alanlarındaki hasat, pestisit uygulaması ve kaynak mevcudiyetinin düşük olduğu dönemlerde tarım dışı habitatlar syrphidler için önemli sığınak alanlarıdır (Tscharntke et al. 2007; 2012). Ayrıca tarım dışı alanlar ergin syrphidler için önemli besin kaynakları olan çok sayıda çiçekli bitkilere de ev sahipliği yapmaktadır. Bu çalışmada lagün alanında tespit ettiğimiz *Artemisia* sp., *P. rhoeas* ve *S. vulgaris* gibi çiçekli yabancı otlar üzerinde barındırdığı afit kolonileri ile hem afidofag syrphidler larvalarına besin sağlarken hem de çiçekleri ile ergin syrphid türlerine kaynak oluşturmaktadır. Wojciechowicz-Żytko & Wilk (2023) tarafından elma bahçeleri ve etrafındaki yarı doğal habitatlarda yürütülen çalışmada, etraftaki tarım dışı habitatlardan toplanan syrphid sayısının elma bahçelerine göre oldukça fazla olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmada syrphidler meyve bahçesinin yakınındaki yarı doğal habitatlarda çiçek açan bitkiler tarafından çekildiğini ve daha sonra meyve bahçesine göç ederek afit kolonilerini azalttığını ortaya koymuşlardır. Burada bahsedilen çalışmaların ve bizim çalışmamızda ortaya koyduğumuz sonuçlar tarım dışı habitatların afidofag syrphidler için önemli bir potansiyele sahip olduğunu gösterebilir. Ayrıca, tarım dışı habitatlardan biri olan ve genellikle tarım alanlarına oldukça yakın konumda olan sulak alanlar afidofag syrphidler çeşitliliğine önemli katkılar sunabilir. Tarım alanları etrafında bulunan tarım dışı habitatlarda yürütülen çalışmalar afidofag türler başta olmak üzere sulak alanların diğer tarım dışı habitatlar ile kıyaslandığında syrphidler tür zenginliği açısından önemli bir potansiyele sahip olduğunu gösterebilir (Djellab et al. 2013; Moquet et al. 2018; Toikkanen et al. 2022).

Diğer taraftan tarım dışı habitatlar tarımsal zararlı afitlerin biyolojik mücadelesinde en etkin sonuçları sağlayan bazı afidofag syrphid türleri için de önemli sığınak ve av alanları oluşturmaktadır (Bayrak & Hayat 2008; Kök et al. 2020). Bu afidofag syrphidlerden biri olan, *E. balteatus* larvalarının konukçu sayısı oldukça geniş olup 100'den fazla afit türü üzerinde beslenmektedir (Sadeghi & Gilbert 2000). Yapılan çalışmalar hem tarım alanlarında hem de sulak alanlar gibi tarım dışı habitatlarda afidofag syrphidlerden baskın olan türün *E. balteatus* olduğunu ortaya koymaktadır (Moquet et al. 2018; Wojciechowicz-Żytko & Wilk 2023). Bu çalışmada elde ettiğimiz *E. balteatus*'un tarım dışı bir habitat olan sulak bir alanda baskın tür olması da bu çalışmalardaki sonuçları desteklemektedir.

Bu çalışmada elde edilen veriler tarım alanlarına yakın olan lagün ve sulak alanlar gibi tarım dışı habitatların afidofag syrphidler tür zenginliği ve bolluğu açısından önemli bir potansiyele sahip olabileceğini ortaya koymuştur. Tarım alanlarına oldukça yakın bir alandan elde edilen bu sonuçların, afidofag syrphidler tarım alanlarında zararlı afitlere karşı daha etkin bir biyolojik mücadele aracı olarak kullanılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu çalışmadaki sonuçlara dayanarak, tarım alanlarındaki doğal düşmanların korunması ve desteklenmesinde farklı tarım dışı habitatların önemi ortaya çıkmaktadır. Sonuç olarak, tarımsal habitatlarda afidofag syrphidler başta olmak üzere yüksek düzeyde doğal düşman biyoçeşitliliğini garanti altına almak için, tarım alanlarının

etrafındaki tarım dışı habitatların korunmasının ve habitat yönetiminin teşvik edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

## Teşekkür

Bu çalışmadaki afidofag syrphid türlerinin teşhisleri için Dr. Zorica Nedeljkovic (Universidad De Alicante, Instituto Universitario De Investigación - CIBIO, Alicante, Spain)'e ve konukçu bitkilerin teşhisleri için Prof. Dr. Ersin KARABACAK (Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü)'a teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

- Amoabeng B. W., P. C. Stevenson, B. M. Mochiah, K. P. Asare & G. M. Gurr, 2020. Scope for non-crop plants to promote conservation biological control of crop pests and serve as sources of botanical insecticides. *Scientific Reports*, 10: 6951.
- Bayrak N. & R. Hayat, 2008. Faunistic studies on the species of Syrphidae (Diptera) in Kayseri province. *Plant Protection Bulletin*, 48(4): 35-49.
- Blackman R. L. & V. F. Eastop, 2006. Aphid's on the world's herbaceous plants and shrubs: an identification and information guide. Vol. 1. Host Lists and Keys. Vol. 2. The Aphids. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, West Sussex, 1456 p.
- Blackman R. L. & V. F. Eastop, 2023. Aphids on the world's plants. An online identification and information guide. URL:<http://www.aphidsonworldsplants.info/> (Erişim tarihi: 10 Ekim 2023).
- Dib H., S. Simon, B. Sauphanor & Y. Capowiez, 2010. The role of natural enemies on the population dynamics of the rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea* Passerini (Hemiptera: Aphididae) in organic apple orchards in south-eastern France. *Biological Control*, 55: 97-109.
- Djellab S., A. Van Eck & B. Samraoui, 2013. A survey of the hoverflies of northeastern Algeria (Diptera: Syrphidae). *Egyptian Journal of Biology*, 15: 1-12.
- Doğan B. & Ş. Kök, 2023. The diversity and host interactions of aphids (Hemiptera: Aphididae) on different plant communities in an urban ecosystem. *Turkish Journal of Entomology*, 47(4): 459-470.
- Dunn L., M. Lequerica, C. R. Reid & T. Latty, 2020. Dual ecosystem services of syrphid flies (Diptera: Syrphidae): pollinators and biological control agents. *Pest management science*, 76(6): 1973-1979.
- Gontijo L. M., E. H. Beers & W. E. Snyder, 2015. Complementary suppression of aphids by predators and parasitoids. *Biological Control*, 90: 83-91.
- Hille Ris Lambers D., 1950. On mounting aphids and other soft skinned insects. *Entomologische Berichten*, 13: 55-58.
- Iturralde-García R. D., J. Riudavets & C. Castañé, 2020. Biological control of *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Chrysomelidae) in stored chickpeas through the release of natural enemies. *Biological Control*, 149, 104322.
- Janković M., M. Plečaš, D. Sandić, A. Popović, A. Petrović, O. Petrović-Obradović, Ž. Tomanović & V. Gagić, 2017. Functional role of different habitat types at local and

- landscape scales for aphids and their natural enemies. *Journal of Pest Science*, 90: 261-273.
- Jonsson M., S. D. Wratten, D. A. Landis, J. M. L. Tompkins & R. Cullen, 2010. Habitat manipulation to mitigate the impacts of invasive arthropod pests. *Biological Invasions*, 12 (9): 2933-2945.
- Kaser J. M. & G. E. Heimpel, 2018. Impact of the parasitoid *Aphelinus certus* on soybean aphid populations. *Biological Control*, 127: 17-24.
- Katis N. I., J. A. Tsitsipis, M. Stevens & G. Powell, 2007. Transmission of plant viruses (Eds. van Emden H. F. & R. Harrington, Aphids as Crop Pests). CABI Publishing, London, 353-390.
- Kök Ş., Ž. Tomanović, Z. Nedeljković, D. Şenal & İ. Kasap, 2020. Biodiversity of the natural enemies of aphids (Hemiptera: Aphididae) in Northwest Turkey. *Phytoparasitica*, 48(1): 51-61.
- Landis D. A., S. D. Wratten & G. M. Gurr, 2000. Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. *Annual Review of Entomology*, 45: 175-201.
- Lefebvre V., C. Fontaine, C. Villemant & C. Daugeron, 2014. Are empidine dance flies major flower visitors in alpine environments? A case study in the Alps, France. *Biology Letters*, 10(11): 20140742.
- Medeiros H. R., A. T. Hoshino, M. C. Ribeiro, M. N. Morales, F. Martello, O. C. P. Neto, D. W. Carstensen & A. O. Menezes Junior, 2018. Non-crop habitats modulate alpha and beta diversity of flower flies (Diptera, Syrphidae) in Brazilian agricultural landscapes. *Biodiversity and Conservation*, 27: 1309-1326.
- Mohammed A. A. & P. E. Hatcher, 2017. Combining entomopathogenic fungi and parasitoids to control the green peach aphid *Myzus persicae*. *Biological Control*, 110: 44-55.
- Moquet L., E. Laurent, R. Bacchetta & A. L. Jacquemart, 2018. Conservation of hoverflies (Diptera, Syrphidae) requires complementary resources at the landscape and local scales. *Insect Conservation and Diversity*, 11(1): 72-87.
- Peters D. C., J. A. Webster & C. S. Chlouber, 1991. Aphid-Plant Interactions: Populations to Molecules. Oklahoma Agricultural Experimental Station, Stillwater, 335 p.
- R Development Core Team, 2023. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. URL: <https://www.R-project.org/> (Erişim tarihi: 10 Ekim 2023).
- Rodriguez-Gasol N., G. Alins, E. Veronesi & S. Wratten, 2020. The ecology of hoverflies as ecosystem service providers in agricultural systems. *Biological Control*, 151: 104405.
- Sadeghi H. & F. Gilbert, 2000. Aphid suitability and its relationship to oviposition preference in predatory hoverflies. *Journal of Animal Ecology*, 69(5): 771-784.
- Speight M. C. D., 2008. Database of Irish Syrphidae (Diptera). Irish Wildlife Manuals, N. 36. National Parks and Wildlife Service, Department of Environment, Heritage and Local Government, Dublin, Ireland, 338 p.
- Tiftikçi P., Ş. Kök & İ. Kasap, 2020. Biological control of twospotted spider mites [*Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)] using *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) at different ratios of release on field-grown tomatos. *Biological control*, 151: 104404.
- Toikkanen J., P. Halme, J. Kahanpää & M. Toivonen, 2022. Effects of landscape composition on hoverflies (Diptera: Syrphidae) in mass-flowering crop fields within forest-dominated landscapes. *Journal of Insect Conservation*, 26(6): 907-918.

- Tomanović Ž., P. Starý, N. G. Kavallieratos, V. Gagi, M. Plećaš, M. Jankovic, E. Rakhshani, A. Četković & A. Petrović, 2012. Aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) in wetland habitats in the western Palaearctic: Key and associated aphid parasitoid guilds. *Annales- Societe Entomologique De France*, 48(1-2): 189-198.
- Tscharntke, T., J. M. Tylianakis, T. A. Rand, R. K. Didham, L. Fahrig, P. Batáry, J. Bengtsson, Y. Clough, T. O. Crist, C. F. Dormann, R. W. Ewers, J. Fründ, R. D. Holt, A. Holzschuh, A. M. Klein, D. Kleijn, C. Kremen, D. A. Landis, W. Laurance, D. Lindenmayer, C. Scherber, N. Sodhi, I. Stefan-Dewenter, C. Thies, W. H. Van Der Putten & C. Westphal, 2012. Landscape moderation of biodiversity patterns and processes-eight hypotheses. *Biological Reviews*, 87: 661-685.
- Tscharntke T., R. Bommarco, Y. Clough, T. O. Crist, D. Kleijn, T. A. Rand, J. M. Tylianakis, S. van Nouhuys & S. Vidal, 2007. Conservation biological control and enemy diversity on a landscape scale. *Biological Control*, 43: 294-309.
- van Lenteren J. C., J. Bale, F. Bigler, H. M. T. Hokkanen & A. J. M. Loomans, 2006. Assessing risks of releasing exotic biological control agents of arthropod pests. *Annual Review of Entomology*, 51: 609-634.
- Völkl W., M. Mackauer, J. K. Pell & J. Brodeur, 2007. Predators, parasitoids and pathogens (Editors: Van Emden H. V. & R. Harrington, Aphids as Crop Pests). CABI, Wallingford, 187-233.
- Wilkaniec B., B. Borowiak-Sobkowiak, A. Wilkaniec, W. Kubasik, M. Kozłowska & E. Dolańska-Niedbała, 2015. Aphid migrant activity in refuge habitats of the Wielkopolska agricultural landscape. *Journal of Plant Protection Research*, 55(1): 69-79.
- Wojciechowicz-Żytka E. & E. Wilk, 2023. Surrounding semi-natural vegetation as a source of aphidophagous syrphids (Diptera, Syrphidae) for aphid control in apple orchards. *Agriculture*, 13(5): 1040.