

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2013-YL-037

TÜRKİYE'DEN ELDE EDİLMİŞ YENİ BİR
ENTOMOPATOJEN NEMATOD İZOLATININ VE
MUTUALİSTİK BAKTERİSİNİN TANIMLANMASI

Harun ÇİMEN

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Selçuk HAZIR

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Harun ÇİMEN tarafından hazırlanan “Türkiye'den Elde Edilmiş Yeni Bir Entomopatojen Nematod İzolatının ve Mutualistik Bakterisinin Tanımlanması” başlıklı tez, 26.07.2013 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı,	Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan: Prof. Dr. Selçuk HAZIR		ADÜ Fen. Ed. Fak
Üye : Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN		ADÜ Tıp. Fak.
Üye : Yrd. Doç. Dr. Barış GÜLCÜ		Düzce Üni. Fen. Ed. Fak

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun sayılı kararıyla..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN

Enstitü Müdürü

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

26/07/2013

Harun ÇİMEN

ÖZET
TÜRKİYE'DEN ELDE EDİLMİŞ YENİ BİR ENTOMOPATOJEN
NEMATOD İZOLATININ VE MUTUALİSTİK BAKTERİSİNİN
TANIMLANMASI

Harun ÇİMEN

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Selçuk HAZIR

2013, 70 sayfa

Bu çalışma, Türkiye topraklarından izole edilmiş olan yeni bir entomopatojen nematod izolatı (izolat no. 48-02) ve mutualistik bakterisinin tanımlanması amacıyla yapılmıştır. Çalışmalar başta entomopatojen nematodun moleküler ve morfometrik analizlere dayanarak tanımlanması olmak üzere, moleküler ve biyokimyasal yöntemler ile de mutualistik bakterilerin tanımlanmasına yönelik olarak iki grup halinde yürütülmüştür.

Moleküler ve morfometrik verilerin bir arada değerlendirilmesi sonucunda izole edilen entomopatojen nematod izolatının (48-02) *Heterorhabditis bacteriophora* olduğu anlaşılmıştır.

Diğer çalışmada, moleküler ve biyokimyasal analizler sonucunda izole edilen simbiyotik bakteri *Photorhabdus luminescens* subsp. *lamondii* olarak tanımlanmıştır. İzole edilen *P. luminescens lamondii* 48-02 suşunun enfekte ettiği kadavranın rengini diğer *Photorhabdus* izolatları gibi kırmızı renge değil yeşil-gri renge çevirdiği ve kadavranın dokusunu sakızımsı hale getirmedeği belirlenmiştir. Antrakinin üreten gen bölgesinde mutasyon olduğu belirlenen *P. luminescens lamondii* 48-02 suşunun virulanslığının moleküler olarak benzer olan TT01 suşundan daha fazla olduğu ve konukçularını daha hızlı bir şekilde öldürdüğü saptanmıştır. Ayrıca yapılan çaprazlama testlerinde *P. luminescens lamondii* 48-02 suşunun *H. bacteriophora* TT01 nematod izolatına ait infektif juvenillerinde kolonize olabilirken, *P. luminescens lamondii* TT01 suşunun *H. bacteriophora* 48-02'nin infektif juvenillerinde kolonize olamadıkları belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Entomopatojenik nematodlar, *Heterorhabditis*, *Photorhabdus*.

ABSTRACT
IDENTIFICATION OF A NOVEL ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE
STRAIN AND ITS MUTUALISTIC BACTERIA ISOLATED FROM
TURKEY

Harun ÇİMEN

M.S. Thesis, Biology Department

Advisor: Prof. Dr. Selçuk HAZIR

2013, 70 pp.

This study has been conducted to identify a novel entomopathogenic nematode isolate (isolate no. 48-02) and its mutualistic bacteria isolated from Turkey. Entomopathogenic nematode was identified with molecular analyses and morphometric measurements. Mutualistic bacteria of novel EPN strain was identified with molecular and biochemical analyses.

According to molecular and morphometric data, new nematode isolate (48-02) was identified as *Heterorhabditis bacteriophora*.

In the second part of the study, according to molecular and biochemical analyses, isolated bacteria from novel EPN strain was identified as *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii*. The symbiotic bacteria of new *H. bacteriophora* isolate do not produce red pigment and host tissue not become gumminess. *P. luminescens laumondii* strain 48-02 was more virulent and killing its host faster than molecularly similar *P. luminescens laumondii* TT01 strain. On the other hand, cross breeding tests showed that *P. luminescens laumondii* strain 48-02 colonized in *H. bacteriophora* TT01 infective juveniles nematodes but the bacterial symbiont of TT01 did not colonized in *H. bacteriophora* 48-02 infective juveniles.

Key words: Entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis*, *Photorhabdus*.

ÖNSÖZ

Lisans döneminden bu yana insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli danışman hocam Prof. Dr. Selçuk HAZIR'a,

Nematodların tür teşhisi konusunda sahip olduğu engin tecrübelerini paylaşan Prof. Dr. S. Patricia STOCK (Amerika Birleşik Devletleri Arizona Üniversitesi)'a,

Amerika'daki laboratuvar çalışmalarım sırasında sahip olduğu bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren, moleküler verilerin analizleri konusunda yardımcı olan Ming-Min Lee'ye,

Bakterilerin tanımlanmasına ilişkin çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan Dr. David CLARKE (İrlanda Cork Üniversitesi)'a,

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen, birlikte çalışmaktan zevk aldığım dostlarım Arş. Gör. Derya ULUĞ ve Cem ASAN'a,

Tez çalışmamı FEF-13014 no'lu proje ile destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimine,

Bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan, haklarını ödeyemeyeceğim sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
1.GİRİŞ	1
1.1. Nematodlar.....	1
1.2. Entomopatojenik Nematodlar (Fam: Steinernematidae ve Heterorhabditidae.....	3
1.2.1. Steinernematid ve Heterorhabditid'lerin Genel Hayat Döngüsü.....	4
1.3. Entomopatojenik Nematod- Bakteri Simbiyozu	6
1.4. Entomopatojenik Nematodların Konukçu Dağılımı.....	7
1.5. Nematodların Tür Teşhisinde Kullanılan Moleküler Yöntemler	8
1.5.1. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)	8
1.5.2. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	8
1.5.3. DNA Sekanslama Hedef Bölgeleri.....	9
1.5.3.1. Nükleer Genler	9

1.5.3.2. Mitokondriyal Genler	9
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM	11
3.1. Entomopatojenik Nematod ve Simbiyotik Bakterisinin Teşhisine Yönelik Çalışmalar	11
3.1.1. Toprak Örneklerinin Alınması	11
3.1.2. Entomopatojenik Nematod Enfeksiyonuna Duyarlı Konukçunun Üretilmesi	11
3.1.3. Entomopatojenik Nematodların İzolasyonu	12
3.1.4. Entomopatojenik Nematodların Tür Teşhisinin Yapılması.....	12
3.1.4.1. Morfometrik Yöntem.....	12
3.1.4.2. Moleküler Yöntem.....	14
3.1.5. Simbiyotik Bakterilerin İzole Edilmesi ve Tanımlanması.....	18
3.1.5.1. Simbiyotik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu.....	18
3.1.5.2. Simbiyotik Bakterinin Fenotipik Karakterizasyonu	22
3.1.5.3. Büyüme eğrisinin saptanması.....	26
3.1.5.4. Patojenite testi	26
3.1.5.5. Koloni varyasyonlarının saptanması	27
3.1.5.6. Biyokimyasal testler	27
3.1.5.7. Çaprazlama testi (<i>in vitro</i>).....	28
3.1.5.8. Çaprazlama testi (<i>in vivo</i>).....	30

3.2. Konukçu Dağılımı Çalışmaları.....	30
4. BULGULAR	34
4.1. Entomopatojenik Nematodların Tür Teşhisine Yönelik Çalışmalar	34
4.2. Simbiyotik Bakterilerin Tanımlanmasına Yönelik Çalışmalar	37
4.2.1. Simbiyotik Bakterinin Fenotipik Karakterizasyonu	38
4.2.1.1. Pigmentasyon (Antrakininon üretimi).....	38
4.2.1.2. Antibiyotik üretimi	39
4.2.1.3. Biyolojik ışımaya (Biyoluminesens) aktivitesi	40
4.2.1.4. Boya alımı	41
4.2.1.5. Lipaz aktivitesi	43
4.2.1.6. Proteaz aktivitesi	44
4.2.1.7. Siderophore üretimi.....	44
4.2.1.8. Hareketlilik.....	45
4.2.1.9. İnfektif juvenillerde bakterilerin kolonize olması	46
4.2.2. Büyüme eğrisinin saptanması.....	46
4.2.3. Patojenite testi	47
4.2.4. Koloni varyasyonlarının saptanması	48
4.2.5. Biyokimyasal testler	50
4.2.6. Çaprazlama testi (<i>in vitro</i>).....	50
4.2.7. Çaprazlama testi (<i>in vivo</i>).....	51

4.3. Konukçu Dağılımı Çalışmaları.....	52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	53
5.1. Entomopatojenik Nematodların Tür Teşhisine Yönelik Çalışmalar	53
5.2. Simbiyotik Bakterilerin Tanımlanmasına Yönelik Çalışmalar.....	53
5.2.1 Simbiyotik Bakterilerin Fenotipik Karakterizasyonuna Yönelik Çalışmalar	53
KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	69

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
cm ²	Santimetre kare
dk	Dakika
EPN	Entomopatojenik Nematod
IJ	İnfektif juvenil
J2	2. Juvenil evre
J3	3. Juvenil evre
J4	4. Juvenil evre
l	Litre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
pH	Power of Hydrogen
sp.	Tür
subsp.	Alt tür
UV	Ultraviolet
vd.	ve diğerleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Photorhabdus</i> ve <i>Xenorhabdus</i> bakterilerinin entomopatojen nematodlarda kolonize oldukları bölgeler	5
Şekil 3.1. Morfometrik ölçümlerin gerçekleştirilmesi	13
Şekil 3.2. Yüzeyleri steril edilmiş infektif juvenillerin motorlu doku homojenizatörü kullanılarak parçalanması	18
Şekil 3.3. Boya alımının test edildiği çeşitli besi yerleri (NBTA, LB pyruvat agar, MacConkey agar, EMB agar), lipaz agar, proteaz agar ve siderophore agar	23
Şekil 3.4. Sıvı bakteri kültürünün enjekte edildiği bölge ve deney düzeneği	27
Şekil 3.5. Çaprazlama testi için hazırlanan deney düzeneği	29
Şekil 3.6. <i>S. littoralis</i> ile yapılan deneylerde kullanılan düzenek	31
Şekil 3.7. <i>C. elephas</i> ile yapılan deneylerde kullanılan düzenek	32
Şekil 4.1. Elde edilen <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (48-02) türüne ait ilk jenerasyon hermafrodit nematodların baş kısmı	36
Şekil 4.2. Elde edilen <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (48-02) türüne ait infektif juvenillerin kuyruk kısmı	36
Şekil 4.3. <i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> (48-02) suşuna ait tür dağılımını gösteren filogenetik ağaç	37
Şekil 4.4. <i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> 48-02 suşuna ait scanning elektron mikroskop (SEM) görüntüsü	38
Şekil 4.5. <i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> 48-02 suşu ile enfekte olmuş <i>G. mellonella</i> larvalarında renklenme	39
Şekil 4.6. <i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> 48-02 suşu tarafından antibiyotik üretimi	39

Şekil 4.7. <i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> 48-02 suşunun çeşitli besi yerlerindeki biyoluminesens aktiviteleri.....	40
Şekil 4.8. <i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> 48-02 suşu (alt) ve kontrol amaçlı kullanılan bir diğer <i>Photorhabdus luminescens</i> TT01 suşunun (üst) <i>in vivo</i> ortamdaki biyoluminesens aktivitelerinin karşılaştırılması	41
Şekil 4.9. NBTA besi ortamında üremiş olan <i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> 48-02 suşu.....	42
Şekil 4.10. McConkey besi ortamında üremiş olan <i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> 48-02 suşu.....	42
Şekil 4.11. Lipaz agar ortamındaki <i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> 48-02 suşları.....	43
Şekil 4.12. Proteaz agar ortamındaki <i>Photorhabdus</i> suşlarının (48-02 ve 09-43) proteaz aktiviteleri	44
Şekil 4.13. CAS agar ortamındaki <i>Photorhabdus</i> suşları (48-02 ve 09-43) tarafından siderophore üretimi	45
Şekil 4.14. <i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> 48-02 suşunun motility agar üzerindeki hareketliliği.....	45
Şekil 4.15. Besi ortamında üreyen <i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> 48-02 kolonilerinin sayımı	46
Şekil 4.16. <i>Photorhabdus</i> suşlarına (48-02 ve TT01) ait büyüme eğrisi.....	47
Şekil 4.17. İki farklı <i>Photorhabdus</i> suşunun (48-02 ve TT01) virulanslarını gösteren grafik	48
Şekil 4.18. İzole edilen <i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> 48-02 koloni varyasyonu	49

- Şekil 4.19. *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* TT01 suşunun koloni varyasyonu 49
- Şekil 4.20. *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 ve TT01 suşlarına ait Api 20E biyokimyasal test sonuçları ve görülen farklılıklar 50
- Şekil 4.21. Çaprazlama testinde (*in vitro*) kullanılan besi yerinde gelişmiş olan 48-02 izolatına ait hermafrodit birey 51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan besi yerleri.....	33
Çizelge 4.1. <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (izolat 48-02)'nin morfolometrik ölçüm (μm) sonuçları.....	35

1.GİRİŞ

1.1. Nematodlar

Nematodlar; boyutları mikrometre ile bir kaç metre arasında değişebilen, üreme, sinir, sindirim, boşaltım ve kas sistemleri olan ancak dolaşım ve solunum sistemleri olmayan segmentsiz canlılardır. Genelde silindirik ve uzun bir vücut yapısına sahiptirler (Viglierchio, 1991).

Nematodlar dünyada en fazla birey sayısı ile temsil edilen hayvanlardır. Yeryüzündeki her 5 çok hücreli organizmadan 4'ünün nematod olduğu düşünülmektedir (Crow, 2002). Nematodlar tatlı sulardan denizlere, sıcak su kaynaklarından buzullar ve çöller gibi ekstrem ortamlara kadar oldukça geniş bir habitat dağılımına sahiptirler (Kaya, 1993).

Yalancı tip vücut boşluğuna (pseudosölom) sahip olmalarından dolayı vücutları iç içe geçmiş iki tüp gibidir (Koppenhöfer, 2007). Solunumlarını gazlara geçirgen olan nemli vücut yüzeyleri ile yaparlar. Yalancı tip vücut boşluğu ise dolaşım sistemi olarak fonksiyon görmektedir (Viglierchio, 1991).

Nematodların vücut yüzeyi hücreli olmayan elastik bir kütikula ile örtülüdür. Nematod kütikulası abiyotik (toprak partikülü gibi) ve biyotik faktörlere (parazit, patojen ve predatör gibi) karşı bariyer olarak görev yapar. Bu kütikula yarı geçirgen bir membran olup sıvıların nematod vücudu içerisine ve dışarıya geçişine izin verir. Bu sayede nematod ile çevresi arasında doğrudan ilişki sağlanır. Kütikula tüm nematod yüzeyini sarar ve stoma, farinks, rektum, vulva, kloak, boşaltım deliği kanalı ve belirli duyu organlarını içerir (Chen et al.,2004).

Duyu organları genellikle vücudun ön kısmında bulunur ve bunlara papilla adı verilir. Ayrıca bir çift yan duyu çukuru 'Amphidler' vardır. Kuyruk tarafında da papillalar ve 'Phasmid' denilen yapılar bulunmaktadır. Bu karakterlerin sayı ve dizilimleri tür teşhisinde oldukça önemlidir (Hominick vd., 1997; Kaya ve Stock, 1997).

Nematodlarda sinir sistemi özofagusu çevreleyen bir sinir halkası “nerve ring” ve buradan çıkıp öne ve arkaya uzanan sinir iplikçiklerinden oluşur (Maggenti, 1981).

Nematodların çoğu ağız, stoma, özofagus, bağırsaklar, rektum ve anüsten oluşan iyi gelişmiş tam bir sindirim sistemine sahiptir (Koppenhöfer, 2000).

Nematodların boşaltım sistemleri çok basit yapılı hücre gruplarından oluşmuştur. Bu yapı serbest yaşayan formlarda ‘rennet bezi’, bir çok parazit türde ise ‘H’ ya da ‘U’ şeklindeki yanal kanal sistemi şeklindedir. Nematodlarda boşaltım sistemi azotlu atıkların atılımında ve vücut boşluğunun turgor basıncını ayarlamada görevlidir (Viglierchio, 1991).

Nematodlar, genellikle ayrı eşeylidirler. Erkeklerin üreme sistemleri ventralde yerleşmiş olan rektumdan oluşmuş bir kloak’a açılır. Bir ya da iki testisleri vardır. Çiftleşme organı olarak görev yapan bir çift spiküle sahiptirler. Ayrıca sklerotize olmuş çiftleşmede rol oynayan gubernakulum adı verilen bir yapı mevcuttur. Özel kaslar aracılığıyla hareket ettirilen bu yapılar, çiftleşme esnasında anüsten dışarı uzanarak, dişi eşey açıklığını açık tutar ve yanyana gelerek spermlerin buradan akabileceği bir kanal oluşturur. Bazı familyalarda (Heterorhabditidae, Strongyloideae) erkek bireylerin arka uçları “bursa” diye adlandırılan şemsiye şeklinde bir kese meydana getirir. Ergin dişiler de bir veya iki ovaryum bulunmaktadır. Bunlar ventral olarak ve hemen hemen vücudun orta kısmında yerleşmiş olan bir vulva ile dışarıya açılırlar (Kaya ve Stock, 1997).

Nematodların büyük bölümü genelde bakteri, fungus ve diğer mikroskobik organizmalarla beslenir. Ancak çok az bir bölümü bitki ve hayvanlarda patojendir. Bu nematodlardan bazıları ise böcek patojenidirler ve zararlı böceklerin kontrolünde aktif olarak kullanılırlar. Böcek-nematod ilişkileri rastlantısal olarak zorunlu ve kommensalden parazitliğe kadar oldukça çeşitlilik göstermektedir (Kaya, 1993). Günümüzde diğer omurgasızlar ve böceklerle parazitik ilişki içinde olduğu belirlenen nematodlar 30 familya içerisinde tanımlanmıştır (Stock ve Hunt, 2005). Bu familyalar içerisinde, böceklerin biyolojik kontrolünde kullanılmak üzere potansiyel role sahip olan 7 familya: Mermithidae ve Tetradenematidae (Ordo: Stichosomida); Allantonematidae, Phaenopsitylenchidae ve Sphaerulariidae (Ordo: Tylenchida); Heterorhabditidae ve Steinernematidae

(Ordo: Rhabditida)'dir (Koppenhöfer, 2007). Bunlardan Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarına ait olanlar kitlesel üretime uygundur ve bu nematodları ticari bir ürün olarak piyasada bulmak mümkündür. Dünyanın birçok yerinde bu nematodlar “böcek patojeni”, “böcek paraziti”, “entomopatojen” ya da bazen sadece “ faydalı nematodlar” olarak adlandırılırlar (Crow, 2002).

1.2. Entomopatojen Nematodlar (Fam: Steinernematidae ve Heterorhabditidae)

Blaxter ve arkadaşlarının (1998) moleküler filogenetik verilere dayanarak hazırladıkları taksonomik duruma göre entomopatojen nematodların sınıflandırması aşağıdaki gibidir:

Phylum: Nematoda

Class: Secernentea

Subclass: Rhabditia

Ordo: Rhabditida

Subordo: Rhabditina

Subordo: Cephalobuna

Superfamilya: Rhabditoidea

Superfamilya: Strongyloidea

Familya: Heterorhabditidae

Familya: Steinernematidae

Günümüze kadar 3 cinsin (*Steinernema*, *Heterorhabditis* ve *Neosteinerema*) bağlı bulunduğu iki entomopatojen nematod familyasından Steinernematidae'ye ait 70'den fazla tür ve Neosteinerema cinsine bağlı bir tür bulunmaktadır. Ayrıca Heterorhabditidae familyasına bağlı 18 tür tanımlanmıştır (Stock ve Goodrich-Blair, 2012). Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarına ait entomopatojen nematodlar sırasıyla *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* cinslerine ait bakteriler ile mutualistik ilişki içerisinde dirler (Poinar,1990). Sahip oldukları bu bakteriler ile konukçularını 48 saat gibi kısa bir süre içerisinde öldürebilme yeteneğine sahip olmaları, bu nematodların “entomopatojen” olarak adlandırılmalarına neden olmuştur (Kaya ve Gaugler, 1993; Goodrich-Blair ve Clarke, 2007).

Entomopatojen nematodlar (EPN) (Fam: Steinernematidae ve Heterorhabditidae) toprak organizmalarıdır ve dünyanın pek çok bölgesinde topraktan elde edilmektedirler (Hominick vd., 1996). Yeni tür bulmayı amaçlayan çok sayıda araştırma sürmekte ve bunların bazılarında yeni türler elde edilmektedir (Nguyen vd., 2008; Mracek vd. 2009; Plichta vd., 2009; Nguyen vd., 2010).

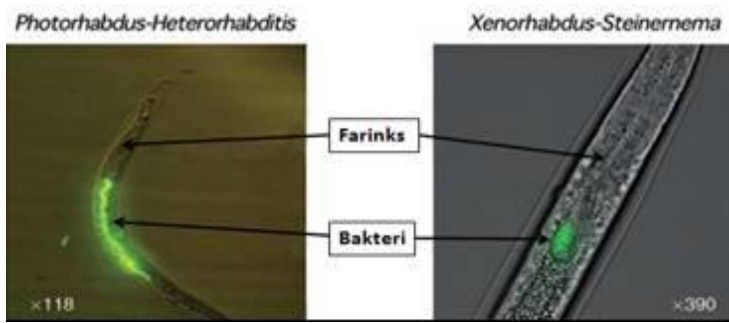
Günümüz sistematik çalışmalarında morfometrik ölçümlerin yanı sıra moleküler analizler ve elektron mikroskop incelemelerinin birarada değerlendirilmesi öngörülmektedir (Burnell ve Stock, 2000; Liu et vd., 2000).

Entomopatojen nematodlar ekonomik olarak önemli pek çok zararlı böceğin kontrolünde biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılan zorunlu böcek paraziti organizmalarıdır (Hazir vd., 2003). Bu familyalara ait *Steinernema* ve *Heterorhabditis* cinslerinin konvergent olarak evrimleşerek benzer morfoloji ve yaşam özellikleri kazandıkları düşünülmektedir (Poinar, 1993). Diğer pek çok araştırmacı tarafından da desteklenen bu görüşe göre *Heterorhabditis* ve *Steinernema* cinsleri tamamen farklı atalardan türeyerek sahip oldukları bakteriler ve konukçu böcekler ile ilişkili olarak evrimleşmişlerdir (Liu vd., 1997; Adams vd., 1998).

1.2.1. Steinernematid ve Heterorhabditid'lerin Genel Hayat Döngüsü

Steinernematidler ve Heterorhabditler genelde benzer bir hayat döngüsüne sahiptirler. Bunlarda yumurta, 4 farklı morfolojik larval dönem ve ergin dönem olmak üzere toplam 6 evre vardır (Kaya, 1993). Nematodların toprakta serbest olarak yaşayan tek evresi olan 3. juvenil (J3) evresi “infektif juvenil (IJ)” evre olarak adlandırılır. Nematodlar bu evredeyken beslenmez ve gelişmezler (Kaya ve Gaugler, 1993). Infektif juveniller toprak içerisinde uygun bir konukçu bulduktan sonra, konukçunun doğal açıklıklarından (ağız, anüs ve spirakıl) veya bazı durumlarda doğrudan kütikulanın ince kısımlarından (sadece *Heterorhabditis* cinsinde) konukçunun hemosölü içerisine girerek taşıdıkları simbiyotik bakterileri salarlar. Bu bakteriler *Steinernema* cinsine ait türlerde infektif juvenillerin bağırsaklarının ön kısmındaki özel bir kesede bulunurken, *Heterorhabditis* cinsine ait türlerde ise bağırsağın özellikle ilk 1/3'lük kısmında yoğun olarak taşınmaktadır (Martens ve Goodrich-Blair, 2005) (Şekil 1.1). Böceğin hemosölü

içerisine giren IJ'ler tarafından salınan bakteriler çoğalmaya başlar ve bu esnada salgıladıkları hücre dışı enzimler ve toksinler ile konukçunun septisemia'dan ayrıca nematodların neden olduğu toxemia'dan dolayı genelde 48 saat içerisinde ölmesine neden olurlar (Duchaud vd., 2003). Gelişimini sürdürüp gömlek değiştirerek J4 evresine geçen nematodlar oda sıcaklığında 2-3 gün içerisinde ergin evreye ulaşırlar (Wang ve Bedding, 1996). J4 dediğimiz 4. larval evrede ağız ve stoma açık olduğundan dolayı sindirim sistemi aktiftir. Bu evredeki nematodlar böcek hemosölünde üreyen bakteriler ve bu bakterilerin ürettikleri hidrolitik enzimler tarafından parçalanmış böcek dokularıyla beslenerek ergin dişi ve erkek bireylere gelişirler (Gaugler ve Kaya, 1990; Burnel ve Stock, 2000). Çiftleşmeden bir süre sonra erkek bireyler ölürlür. Genellikle nematodlar yumurta içerisinde ikinci juvenil (J2) evresine gelişirler. Nematodların yumurtadan çıkması dişinin vücudu içerisinde gerçekleşir. Bir süre sonra dişinin vücudu tamamen bu yeni nesil nematodlarla kaplanır ve bu evre "Endotokia matricida" evresi olarak adlandırılır (Ciche vd., 2008). Nematodların üremesi kadavradaki besin bitene kadar genellikle 2-3 jenerasyon boyunca devam eder (Kaya, 2002). Enfekte ettikleri konukçada besinin tükenmeye başlaması üzerine 3. evre juveniller incelmış konukçu kütikülünü parçalayarak dışarı çıkar ve yeni bir konukçu bulana kadar toprak içerisinde canlılığını aylarca sürdürebilir (Hazır vd., 2003).



Şekil 1.1. *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* bakterilerinin entomopatojen nematodlarda kolonize oldukları bölgeler (Goodrich-Blair ve Clarke, 2007).

Steinernematidler ve Heterorhabditler genelde benzer bir hayat döngüsüne sahip olmalarına rağmen aralarındaki en önemli fark *Heterorhabditis* erginlerinin

konukçu içerisindeki ilk jenerasyonda hermafrodit bireylerden oluşması, *Steinernema* erginlerinin ise bütün jenerasyonlarda ayrı eşeyli olmasıdır. Tek istisna, ilk jenerasyonda hermafrodit bireylere de rastlanmış olan *Steinernema hermaphroditum* türüdür (Stock vd., 2004). *Heterorhabditis* cinsinde birinci nesilden sonraki nesillerde hermafroditlerle birlikte ayrı eşeyli bireyler de görülmektedir (Gaugler ve Kaya, 1990).

1.3. Entomopatojen Nematod- Bakteri Simbiyozu

Xenorhabdus ve *Photorhabdus* spp. Enterobacteriaceae familyasına ait gram-negatif bakterilerdir. Her iki bakteri de fakültatif anaerobik, çubuk şeklinde, spor oluşturmayan, oksidaz negatif ve hareketlidir (Thomas ve Poinar, 1979; Boemare ve Akhurst, 1988). İki bakteri cinsi arasındaki en belirgin farklılık *Photorhabdus* türlerinin biyolojik ışımaya (Bioluminescens) yapabiliyor; *Xenorhabdus*'ların yapamıyor olmasıdır. Ayrıca *Photorhabdus*'lar katalaz (+), *Xenorhabdus*'lar ise katalaz (-)'dirler. Bu bakterilerin en yakın oldukları cins ise *Proteus*'tur (Yarza vd., 2008).

Bugüne kadar bu bakterilerin topraktan ya da su kaynaklarından serbest yaşayan formları izole edilememiştir (Forst vd., 1997). Bu bulgular bakterilerin toprak habitatında hayatta kalabilmesi için nematodlarla simbiyotik ilişkinin gerekli olduğunu göstermektedir. Buna karşılık bakteriler de konukçunun etkili bir biçimde öldürülmesi ve nematodların hayat döngülerini tamamlaması için gerekli olan besinin sağlanmasında önemli rol oynamaktadır (Kaya ve Gaugler, 1993).

Her iki cinsine ait bakteriler, faz-I ve faz-II adı verilen farklı fenotipik formlar oluştururlar. Bunlardan faz-I, nematodlarla doğal ilişkide olan formdur. Faz-II ise bakteri kültürü durgunluk fazına girdiğinde oluşan formdur. Faz-II hücreleri doğal simbiyontları olan nematodlarda bulunmazlar (Boemare vd., 1996). Faz-I bakterileri antibiyotik üretirler, belirli boyaları absorblarlar ve hücre içinde büyük yapıları kristal proteinleri oluştururlar. Oysa faz-II bakterileri boya absorblamazlar ve antibiyotik üretmezler. Ayrıca faz-I ve faz-II bakterileri birbirinden oldukça farklı koloni morfolojisi gösterirler (Boemare vd., 1996, 1997; Boemare, 2002). Bakteriler durgun fazda iken böcek hemosölü içerisine lipaz, fosfolipaz, proteaz gibi enzimler ve geniş spektrumlu antibiyotikler gibi böceğin bağışıklık sistemini

baskılayacak pek çok hücre dışı madde salgırlar (Kaya, 2002; Griffin vd., 2005; Lewis ve Clarke, 2012). Salınan bu enzimler böcek kadavrasındaki makromolekülleri parçalayıp gelişmekte olan nematodlar için gerekli besini sağlarken, üretilen antibiyotikler ise kadavranın diğer mikroorganizmalar tarafından istila edilmesini engeller (Boemare, 2002).

1.4. Entomopatojen Nematodların Konukçu Dağılımı

Heterorhabditidae ve Steinernematidae familyalarına ait nematod türleri dünyanın pek çok ülkesinde kitlesel olarak üretilip çeşitli formülasyonlar ile ticari olarak satılmakta ve zararlı böceklerin mikrobiyal kontrolünde kullanılmaktadır (Grewal, 2002; Gaugler ve Han, 2002). Diğer familyalara ait böcek patojeni nematodların ise mikrobiyal kontrol potansiyelleri bu türlerin kültüre alınmasındaki zorluklar ya da konukçu spektrumlarının dar olmasından dolayı daha düşüktür (Koppenhöfer, 2007).

Üzerinde detaylı araştırmalar yapılmış olan entomopatojen nematod türlerinin (Örneğin *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *H. bacteriophora*) laboratuvar koşullarında geniş bir böcek grubuna karşı etkili olduğu saptanmıştır. Ancak laboratuvar ortamında çevre koşulları optimumdur ve nematodların etkinliğini kısıtlayacak hiçbir etken yoktur. Alan uygulamalarında ise konukçu dağılımının azaldığı görölmektedir (Koppenhöfer, 2000).

Bütün entomopatojen nematodların farklı böceklerin mücadelesinde etkinlikleri eşit değildir. Herhangi bir entomopatojen nematodun belirli bir böceği enfekte etme yeteneği böcek ve nematodun davranışı, fiziksel engeller ve immün cevaplarla belirlenir (Crow, 2002). *S. scapterisci* Orthoptera grubuna özellikle de *Gryllotalpidae* üyelerine adapte olmuştur (Grewal vd., 1993; Parkman ve Smart, 1996). *S. kushidai* ise daha çok Scarabeidae larvalarına adapte olmuş bir türdür (Mamiya ve Ogura, 1989; Tanada ve Kaya, 1993).

Toprak, entomopatojen nematodların doğal yaşam ortamlarıdır ve toprak içerisindeki zararlı böceklere karşı yapılacak başarılı bir biyolojik kontrol uygulaması için büyük avantaj sağlar (Shapiro-Ilan vd., 2005). Entomopatojen nematodlar toprak içerisinde konukçularını kemosenörlerini kullanarak ayrıca

böceklerin ürettikleri CO₂ ve elektriksel akımları algılayarak bulurlar (Shapiro-Ilan vd., 2012).

1.5. Nematodların Tür Teşhisinde Kullanılan Moleküler Yöntemler

Günümüzdeki sistematik çalışmalarda türler arasında yeteri kadar morfolojik farklılıkların olmamasından dolayı tür teşhisinde morfometrik ölçümlerin yanısıra moleküler analizler de kullanılmaktadır (Stock ve Hunt, 2005).

Entomopatojen nematodların tür teşhisinde en fazla kullanılan moleküler yöntemler RAPD, RFLP ve DNA sekanslama yöntemleridir (Stock ve Hunt, 2005).

1.5.1. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

RAPD-PCR yöntemi *Heterorhabditis* ve *Steinernema* türlerinin teşhisinde kullanılan ilk yöntemdir. Günümüzde de *Heterorhabditis* ve *Steinernema* izolatları arasındaki genetik farklılıkları ölçmede ve bu taksonlar arasındaki filogenetik ilişkileri değerlendirmede kullanılmaktadır. Fakat bu yöntem genellikle tercih edilmez çünkü kopyalanma yeteneği, DNA kalitesi, DNA konsantrasyonu ve PCR şartları gibi birçok faktörden kolayca etkilenir. Ayrıca RAPD markerlarını kullanarak tür içi ve türler arası farklılıkları belirtmek zordur. Bu yüzden yanlış teşhislere yol açabilir (Stock ve Hunt, 2005).

1.5.2. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Restriksiyon enzimleri ve PCR-RFLP *Steinernema* ve *Heterorhabditis*'ler için iyi bir yöntem olarak bilinir ve özellikle de *Steinernema* türlerinin ayırımında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Stock ve Hunt, 2005). *Steinernema* türlerinin teşhisinde kullanılan 17 tane restriksiyon enzimi mevcuttur. Bazı restriksiyon enzimleri benzer RFLP modelleri gösterirken (örneğin, *Hpa* II) bazıları teşhis gücü yüksek modeller gösterir (örneğin *Alu* I, *Dde* I, *Hha* I ve *Hinf* I) (Stock ve Hunt, 2005).

Son zamanlarda, nükleotid sekans analizleri hem farklı taksonomik seviyelerde iyi bir teşhis yaptığı için hem de filogenetik çalışmalarda önemli veriler sağladığı için en çok tercih edilen yöntemdir (Stock ve Hunt, 2005).

1.5.3. DNA Sekanslama Hedef Bölgeleri

1.5.3.1. Nüklear Genler

Ribozomal RNA (rRNA)'ların sahip olduğu nükleotid polimorfizmi düşük olduğu için özellikle nüklear ribozomal RNA (rRNA) 28S büyük alt ünitesinin (LSU) D2/D3 bölgeleri (*Steinernema*'larda) ile ITS (internal transcribed spacer) bölgeleri (*Heterorhabditis*'lerde) nematodların tür teşhisinde kullanılmaktadır (Stock vd., 2001).

28S rDNA Steinernematidler için en etkili ve en güvenilir bölge olarak bilinir. ITS ise entomopatojen nematodların sistematüğinde kullanılan değişken bir bölgedir. Bu bölge bir dizi marker'a sahiptir. *Heterorhabditidis*'lerde ITS-1 bölgesi türlerin ayırımında yeterli genetik varyasyonlara sahiptir ve türler arasındaki evrimsel ilişkiyi anlamada oldukça yararlı veriler sağlar (Stock ve Hunt, 2005).

1.5.3.2. Mitokondriyal Genler

Günümüzde, nematodlarda türler arası ve tür içi genetik varyasyonları çözmek için yapılan çalışmalarda kullanılan birkaç mitokondriyal gen vardır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda *Heterorhabditis marelata* populasyonları arasında ND4 mitokondriyal genleri kullanılarak tür içi varyasyonlar saptanmıştır. Diğer mitokondriyal genler COXII ve 16S rRNA, Szalanski ve arkadaşları (2000) tarafından çalışılmıştır. Bu bölgeler tür seviyesindeki varyasyonları ve seçilmiş *Steinernema* türleri arasındaki ayrımı iyi bir şekilde göstermiştir. Buna rağmen birkaç *S. feltiae* populasyonu ile çalıştıklarında tür içi seviyedeki varyasyonları göstermede başarısız olmuşlardır (Stock ve Hunt, 2005).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Hazır vd. (2003) tarafından yapılan ve Türkiye'nin tamamını kapsayan araştırma sonucunda toplam 1167 toprak örneği incelenmiş ve 24 entomopatojen nematod izolatu elde edilmiştir. Bu çalışmada pozitif çıkan toprakların oranı %2 olarak tespit edilmiştir.

Hazır vd. (2004), Türkiye topraklarından elde etmiş oldukları entomopatojen nematodlardan bakteri izolasyonu yaparak moleküler ve biyokimyasal testlere tabi tutmuşlardır. 16S rRNA gen bölgesi sekans analizi ve çeşitli biyokimyasal testler sonucunda iki yeni alttür olan *Photorhabdus luminescens* subsp. *kayaii* ve *Photorhabdus luminescens* subsp. *thracensis*'i teşhis etmişlerdir.

Plichta vd. (2009), ilk olarak Avustralya'da klinik bir vakadan izole edilen *Photorhabdus asymbiotica* türü ile simbiyotik ilişki içerisinde olduğu belirlenen ve yeni tür olan *Heterorhabditis gerrardi*'yi moleküler ve morfometrik verilere dayanarak teşhis etmişlerdir.

Orozco vd. (2013), *Heterorhabditis sonorensis* adlı entomopatojen nematod türünün simbiyotik bakterisi olan *Photorhabdus luminescens* subsp. *sonorensis*'i biyokimyasal testler ve 16S rRNA gen bölgesinin yanı sıra *gyrB*, *recA*, *gltX* ve *dnaN* adlı 4 farklı protein kodlayan gen bölgelerini kullanarak tanımlamışlardır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Entomopatojen Nematod ve Simbiyotik Bakterisinin Teşhisine Yönelik Çalışmalar

3.1.1. Toprak Örneklerinin Alınması

Toprak örnekleri Muğla iline bağlı Sarıgerme beldesinden alınmıştır. Örnek alınan yerler rastgele seçilmiştir. Toprak alınımında özel bir toprak alma aleti kullanılmış ve yüzeyden başlayıp 15-20 cm'lik derinliğe kadar olan bölge tercih edilmiştir (Mracek ve Becvar, 2000). Seçilen her alanda aralarında yaklaşık 4-5 metre mesafe bulunacak şekilde örnekler alınmış ve bu örnekler plastik bir torba içerisinde toplanmıştır. Toplam olarak her alandan yaklaşık 1kg kadar örnek alınmıştır. Ayrıca toprak örneği alınan bölgenin GPS verileri, vejetasyon tipi ve toprağın sıcaklığı kaydedilmiştir. Bir örnekleme alanından diğerine geçerken, toprak alma aleti yıkanmış ve %70'lik etil alkol ile steril edilmiştir (Hazır vd. 2003). Alınan toprak örnekleri laboratuvara ulaştırılana kadar kurumalarını önlemek amacıyla plastik poşetler içerisinde buzluğa konularak taşınmıştır (Kaya ve Stock, 1997).

3.1.2. Entomopatojen Nematod Enfeksiyonuna Duyarlı Konukçunun Üretilmesi

Topraktan entomopatojen nematodların izole edilmesinde kullanılan en yaygın yöntem, duyarlı bir konukçuyu toprak içerisine koyarak enfekte olmasını sağlamaktır (Stock vd., 1999; Nguyen vd., 2010; Malan vd., 2012). Bedding ve Akhurst (1975), büyük mum güvesi olarak bilinen *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarının son evrelerini kullanarak entomopatojen nematodların topraktan kolaylıkla izole edilebildiğini göstermişlerdir. *G. mellonella*, 25 ± 4 °C sıcaklıkta %11 bal, %11 gliserol, %22 un, %22 mısır unu, %11 süt tozu, %5,5 kuru maya ve %17,5 bal mumu içeren yapay besi yeri kullanılarak cam kavanozlar içerisinde üretilmiştir (Han ve Ehlers, 2000). Nematod izolasyonunda son evre *G. mellonella* larvaları kullanılmıştır.

3.1.3. Entomopatojen Nematodların İzolasyonu

Araziden toplanıp laboratuvara getirilen toprak örnekleri iyice karıştırıldıktan sonra 250 ml hacimli plastik kaplar içerisine alınmıştır. Hazırlanan her bir toprak örneği içerisine 5'er adet son evre *G. mellonella* larvası konulmuş ve larvalar toprağın altında kalacak şekilde kaplar ters çevrilmiştir (Griffin vd., 2000).

İncelemeye alınan toprak örnekleri oda sıcaklığında (23-24°C) tutulmuştur. Konulan *Galleria* larvalarının, enfekte olup olmadıklarını anlamak için 3'er gün arayla 15 gün boyunca kontrol edilmiştir (Yoshida vd., 1998).

Enfekte olduğu tespit edilen ölü larvalar topraktan alınıp yüzeyleri steril distile su ile yıkandıktan sonra White trap (White, 1927) adı verilen ortama alınmışlardır. Bu ortamda küçük bir petri kabı (6 cm çaplı) büyük bir petri kabı (9 cm çaplı) içerisine yerleştirilmiştir. Büyük olanın içerisinde su, küçük olanın içerisinde ise filtre kağıdı bulunmaktadır. Enfekte olduğu belirlenen larvalar bu filtre kağıdı üzerine yerleştirilmiştir. Yeni nesil nematodlar kadavra içerisinde üreyip konağı terk etmeye başladıklarında filtre kağıdı üzerinde hareket ederek büyük petrideki suya geçmişlerdir. Suya yalnızca infektif juvenil evredeki nematodlar geçiş yaptığı için bu suyun alınmasıyla yeni jenerasyon infektif juveniller elde edilmiştir. Elde edilen infektif juveniller bir beherin içerisinde toplanarak 3 kez distile su ile yıkanmıştır. Yüzeyleri kısmen temizlenen nematodlar tetrapak kutuları içerisine alınarak 10-15°C'lik iklim dolabında saklanmışlardır (Gulcu ve Hazir, 2012).

Elde edilen nematodların kesin olarak entomopatojen olup olmadıklarının anlaşılması için sağlıklı *G. mellonella* larvaları üzerinde tekrar infektivite testi yapılmıştır (Kaya ve Stock, 1997).

3.1.4. Entomopatojen Nematodların Tür Teşhisinin Yapılması

3.1.4.1. Morfometrik Yöntem

Morfolojik çalışmalarda, infektif juveniller, birinci jenerasyon hermafrodit bireyler ile ikinci jenerasyona ait dişi ve erkek bireyler kullanılmıştır. İlk jenerasyona ait hermafrodit bireyler 4-5 günlük, ikinci jenerasyonda ortaya çıkan dişi ve erkek bireyler ise 7-8 günlük enfekte kadvralar parçalanarak elde edilmiştir. Infektif juveniller ise enfekte ettikleri konukçuyu terk etmeye başladıkları ilk 2 gün

içerisinde toplanmışlardır (Plichta vd., 2009). Toplanan nematodlar önce Ringer's solüsyonu içerisine alınmış ve daha sonra 60°C'lik su banyosunda 2 dakika bekletilerek cansız hale gelmeleri sağlanmıştır. Sonraki aşamada ise nematodlar triethanolamine-formalin (TAF) fiksatifine içerisine alınmış ve daha sonra morfometrik ölçümlerinin yapılabilmesi için gliserin yöntemi (Seinhorst, 1959) uygulanmıştır (Kaya ve Stock,1997). Her bir yaşam evresinden 20'şer adet nematod ölçülmüştür (Plichta vd., 2009). Ölçümlerde Olympus BX51 mikroskobu ve AnalySIS Image software (Soft Imaging System Corp., California, USA) programı kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Morfometrik ölçümlerin gerçekleştirilmesi.

Morfometrik ölçümlerde kullanılan ortak kriterler: toplam vücut uzunluğu (TU), maksimum vücut genişliği (MG), baştan boşaltım deliğine olan uzaklık (EP), baştan sinir halkası sonuna olan uzaklık (NR), baştan özofagusun kaidesine olan uzaklık (ES), kuyruk uzunluğu (TL), anüs genişliği (AG), %D (anterior sonu ile boşaltım deliği arasındaki mesafenin baştan özofagus kaidesine olan uzaklığa oranı X 100) ve %E (anterior sonu ile boşaltım deliği arasındaki mesafenin kuyruk uzunluğuna oranı X 100) dir. Dişi nematodlar için anterior sondan vulvaya olan

uzaklık (V) ve %V (anterior sondan vulvaya olan uzaklığın toplam vücut uzunluğuna oranı X 100) ölçümleri yapılmaktadır. Erkek nematodlar için testislerin pozisyonu (TRF), spikül uzunluğu (SU), gubernaculum uzunluğu (Gub.U), %SW (spikül uzunluğunun anüs genişliğine oranı X 100), %GS (gubernaculum uzunluğunun spikül uzunluğuna oranı X 100) ölçülmüştür (Plichta vd., 2009). İnfektif juveniller için ise "a" oranı (toplam vücut uzunluğunun maksimum vücut genişliğine oranı), "b" oranı (toplam vücut uzunluğunun özofagus uzunluğuna oranı) ve "c" oranı (toplam vücut uzunluğunun kuyruk uzunluğuna oranı) nin ölçümleri yapılmaktadır (Hazir, 2002).

Morfometrik ölçümler Amerika Birleşik Devletleri'nin Arizona Üniversitesi Entomoloji bölümünde Prof. Dr. S. Patricia Stock'un laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.4.2 Moleküler Yöntem

Morfolojik çalışmalara ek olarak elde edilen nematod izolatu moleküler yönden de analiz edilmiştir. Sekans analizleri için ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesi kullanılmıştır (Liu vd., 2000; Stock vd., 2001).

Nükleik asit amplifikasyonu için, 4-5 günlük enfekte *Galleria* larvaları parçalanarak ilk jenerasyona ait hermafrodit bireyler elde edilmiştir. Elde edilen bu nematodlar 1.7 ml'lik eppendorf tüplerine alınıp üzerine lizis tamponu eklenmiştir.

Lizis tamponu: 500 µl TE (10 mM tris- 1 mM EDTA, pH 8.0)

15 µl %20'lik SDS

20 µl proteinaz K (Stok solüsyon 10mg/ml)

1. Tüpler 56°C'lik sıcak su banyosunda 24 saat bekletilmiştir.
2. Parçalanma periyodik olarak kontrol edilmiştir. Eğer bir gece sonra parçalanma tam değilse 15 µl proteinaz K daha eklenmiş ve bir gece daha sıcak su banyosunda bekletilmiştir.
3. Bu uygulamalar sonucu her bir örneğe 10µl RNAaz eklenmiştir.

4. Tüpler vortekslenip 37°C 'de 1 saat bekletilmiştir.
5. Tüpler 2 dakika süreyle 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
6. Üstteki süpernatant alınıp başka bir boş tüp içerisine aktarılmıştır.
7. Her bir tüpün içerdiği hacime eşit miktarda tüplerin üzerine fenol eklenmiş ve her tüp önce kısa süreyle vortekslenip daha sonra 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir.
8. Tüplerin üzerindeki süpernatant dikkatlice alınmış ve yeni bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır.
9. Bu tüpler içerisine aynı hacimde 24:1 oranında kloroform/isoamylalkol eklenmiş ve önce vorteks sonra da santrifüjlenmiştir.
10. Üstteki süpernatant toplanıp yeni bir tüp içerisine aktarılmış ve bu tüpe her 100 µl için 3M 10 µl Sodyum asetat eklenmiştir.
11. Tüplerin üzeri tamamen doluncaya kadar %100'lük etil alkol eklenmiş ve bu tüpler bir gece buzdolabında bekletilmiştir.
12. Bir gece sonunda bu tüpler 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
13. Üstteki sıvı alınmış ve tüpün dip kısmındaki materyal kurumaya bırakılmıştır.
14. Örnekler kuruduktan sonra her bir tüpe 25 µl TE ilave edilerek spektrofotometrik okuma için hazır hale getirilmiştir.
15. Spektrofotometrik ölçümden sonra her bir örnek için yeni bir DNA konsantrasyonu hazırlanmıştır (20 µl'lik hacimde 100ng / µl konsantrasyonda).
16. Yeni konsantrasyondaki DNA'lar PCR için hazır hale gelmiştir (DNA'lar PCR yapılana kadar +4°C'de bekletilmiştir).
17. DNA'ları içeren tüpler buzdolabından çıkarılarak kısa bir süre vorteksten sonra 30 sn süreyle santrifüj edilmiştir.
18. Her bir örnek için 0.2 ml'lik özel PCR tüpleri kullanılmıştır.

16

19. PCR yapılacak örnek *Heterorhabditis* olduğu için 0.2 ml'lik boş eppendorf tüpüne;

9.5 µl steril dH₂O

12.5 µl Red taq (Sigma-Aldrich)

1 µl Primer 93 (10mM)

1 µl Primer 94 (10mM)

94 (forward) 5'- TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3'

93 (reverse) 5'-TTGAACCGGGTAAAAGTCG-3' (Plichta vd., 2009) eklenmiş ve bu bileşenler pipetaj işlemi ile karıştırılmıştır.

20. PCR için gerekli maddelerin eklendiği bu tüplerin her birine önceden elde edilen DNA'dan 1 µl ilave edilmiştir.

21. Hazır hale gelen tüpler MyCycler thermal cycler (Bio-Rad)'a yerleştirilerek işlem başlatılmıştır. Bu program, denatürasyon için 94 °C'de 3 dk, 34 döngü olmak üzere 94 °C'de 30 sn, 60 °C'de 30 sn ve 72 °C'de 1 dk 15 sn, amplifikasyon sonrası uzama için 72 °C'de 5 dk olmak üzere hazırlanmıştır (Plichta vd., 2009).

Agaroz jel düzeneğinin hazırlanması:

%1'lik Agaroz jel hazırlamak için;

0.42 gr Agaroz (Omnipur)

42 ml 1X TAE (40 mM Tris-acetate with 1 mM EDTA, pH 8.0) kullanılmıştır.

Agaroz 1X TAE içerisinde eritilip soğutulduktan sonra kalıba aktararak 15 dk donması beklenmiştir. Bu süre zarfında PCR ürünleri buz içerisinde bekletilmiştir. Hazırlanan jel içerisinde 1X TAE bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiştir.

Jel, örnekleri yüklemek için hazır hale geldiğinde;

1 µl tracking dye (mavi renkli yükleme boyası)

2 µl SYBR Green (Sigma-Aldrich)

3 µl PCR ürünü

bu örneklerin yanı sıra bir de DNA ladder hazırlanmıştır. Bunun için;

1 µl tracking dye

2 µl SYBR Green

3 µl DNA ladder (farklı uzunluktaki DNA fragmanlarından oluşan kullanıma hazır referanslar) ilave edilmiştir. Örnekler ve DNA ladder pipet ile karıştırılarak jele yüklenmiş ve elektroforez tankının kapağı kapatılarak 80 voltta 30 dk çalıştırılmıştır. Daha sonra jel UV görüntüleme sistemine yerleştirilerek görüntülenmiştir.

Agaroz jel elektroforeziyle DNA miktarı saptandıktan sonra sekans analizi için içerisinde;

5 µl PCR ürünü

2 µl exoSAP-IT (100 bp'den büyük 20 kb'dan küçük olan PCR ürünlerini temizlemek için kullanılır.) bulunan 0.2 ml'lik yeni PCR tüpleri hazırlanmış ve bu tüpler 37 °C'de 15 dk ve 80 °C'de 15 dk olmak üzere birer döngü PCR cihazında tutulmuştur.

Elde edilen PCR ürünleriyle sekans analizi yapılmıştır ve sekans sonuçları SeqEdit (DNA Star Inc., Madison, WI) yazılımı kullanılarak düzeltilmiştir.

Moleküler düzeyde yapılan çalışmalar Amerika Birleşik Devletleri'nin Arizona Üniversitesi Entomoloji bölümünde Prof. Dr. S. Patricia Stock'un laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.5. Simbiyotik Bakterilerin İzole Edilmesi ve Tanımlanması

İnfektif juvenil evre nematodların yüzeyleri %0.4 Hyamine (Fluka) ile 2 dk steril edildikten sonra 3 kez steril PBS (fosfat tamponlu tuzlu çözelti) çözeltisi ile yıkanmıştır. Steril uçlu motorlu doku homojenizatörü (Techmate Ltd.) kullanılarak içerisinde 10 µl steril PBS bulunan 1.5 ml'lik eppendorf tüpü içerisinde parçalanmıştır (Şekil 3.2). Bunun sonucunda açığa çıkan bakteriler daha önceden hazırlanan Nutrient agar + bromtimol mavisi + tetrazolium klorid (NBTA) ortamına aktarılmıştır.



Şekil 3.2. Yüzeyleri steril edilmiş infektif juvenillerin motorlu doku homojenizatörü kullanılarak parçalanması.

Simbiyotik bakterilerin aktarıldığı NBTA ortamı 28°C'de 48 saat süreyle inkübasyona tabi tutulmuştur (Orozco vd., 2013) Saf kültür olarak izole edilen simbiyotik bakteriler %0,1 Sodyum pyruvate (Sigma) ile zenginleştirilmiş LB broth ortamında 28°C'de, 200 rpm'de üretilmiş ve %40'lık glycerol ile eşit oranda karıştırılarak 2 ml'lik cryo tüpler içerisinde -80 °C'lik derin dondurucularda stok olarak saklanmıştır (Orozco vd., 2013).

3.1.5.1. Simbiyotik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu

Total bakteriyal genomik DNA'yı izole etmek için, LB broth (Merck) ortamında 24 saat süreyle üretilmiş bakteri kültürü kullanılmıştır. Hazırlanan bu kültürden

alınan 1 ml'lik bakteri süspansiyonuna aşağıda belirtilen basamakları içeren DNA izolasyon yöntemi uygulanmıştır.

1. 1 ml bakteri kültürü 1.7 ml'lik eppendorf tüpüne aktarılarak 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.

2. Santrifügasyon sonunda üstteki süpernatant alttaki pelete dokunulmadan aspire edilmiştir.

3. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra peletin üzerine lizis tamponu konmuştur.

Lizis tamponu: 500 µl TE (10 mM tris- 1 mM EDTA, pH 8.0)

15 µl %20'lik SDS

20 µl proteinaz K (stok solüsyon 10mg/ml)

4. Tüpler 56°C'lik sıcak su banyosunda bir gece bekletilmiştir.

5. Parçalanma periyodik olarak kontrol edilmiştir. Eğer bir gece sonra parçalanma tam değilse 15 µl proteinaz K daha eklenmiş ve bir gece daha sıcak su banyosunda bekletilmiştir.

6. Uygulamalar sonucu her bir örneğe 10µl RNAaz (20µg/ml) eklenmiştir.

7. Tüpler vortekslenip 37°C 'de 1 saat bekletilmiştir.

8. Tüpler 2 dakika süreyle 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

9. Üstteki süpernatant alınıp başka bir boş tüp içerisine aktarılmıştır.

10. Her bir tüpün içerdiği hacime eşit miktarda tüplerin üzerine fenol eklenmiş ve her tüp önce kısa süreyle vortekslenip daha sonra 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir.

11. Tüplerin üzerindeki süpernatant dikkatlice alınmış ve yeni bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır.

12. Bu tüpler içerisine aynı hacimde 24:1 oranında kloroform/isoamylalkol eklenmiş ve önce vorteks sonra da santrifüjlenmiştir.

13. Üstteki süpernatant toplanıp yeni bir tüp içerisine aktarılmış ve bu tüpe her 100 µl için 3M 10 µl Sodyum asetat eklenmiştir.

14. Tüplerin üzeri tamamen doluncaya kadar %100'lük etil alkol eklenmiş ve bu tüpler bir gece buzdolabında bekletilmiştir.

15. Bir gece sonunda bu tüpler 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

16. Üstteki sıvı alınmış ve tüpün dip kısmındaki metaryal kurumaya bırakılmıştır.

17. Örnekler kuruduktan sonra her bir tüpe 25 µl TE ilave edilerek spektrofotometrik okuma için hazır hale getirilmiştir.

18. Spektrofotometrik ölçümden sonra her bir örnek için yeni bir DNA konsantrasyonu hazırlanmıştır (20 µl'lik hacimde 100ng / µl konsantrasyonda).

19. Yeni konsantrasyondaki DNA'lar PCR için hazır hale gelmiştir (DNA'lar PCR yapılana kadar +4°C'de bekletilmiştir).

20. DNA'ları içeren tüpler buzdolabından çıkarılarak kısa bir süre vorteksten sonra 30 sn süreyle santrifüj edilmiştir.

21. Her bir örnek için 0.2 ml'lik özel PCR tüpleri kullanılmıştır.

22. PCR yapılacak bakteri örneği için 0.2 ml'lik boş eppendorf tüpüne;

9.5 µl steril dH₂O

12.5 µl Red taq

1 µl Primer 1 (10mM)

1 µl Primer 2 (10mM)

16SP1 (forward) 5'- GAAGAGTTGATCATGGCTC-3'

16SP2 (reverse) 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' (Tailliez vd., 2010).

23. PCR için gerekli maddelerin eklendiği bu tüplerin her birine önceden elde edilen DNA'dan 1 µl ilave edilmiştir.

24. Hazır hale gelen tüpler MyCycler thermal cycler (Bio-Rad)'a yerleştirilmiş ve 16S programı seçilerek işlem başlatılmıştır. Bu program, denatürasyon için 94 °C'de 5 dk, 30 döngü olmak üzere 94 °C'de 1 dk, 60 °C'de 1 dk ve 72 °C'de 2 dk, amplifikasyon sonrası uzama için 72 °C'de 5 dk olmak üzere hazırlanmıştır (Tailliez vd., 2010).

PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünleri, %1'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutularak incelenmiştir.

Agaroz jel elektroforeziyle DNA miktarı saptandıktan sonra sekans analizi için içerisinde;

10 µl PCR ürünü

4 µl exoSAP-IT bulunan 0.2 ml'lik yeni PCR tüpleri hazırlanmış ve bu tüpler 37°C'de 15 dk ve 80°C'de 15 dk olmak üzere birer döngü PCR cihazında tutulmuştur.

Elde edilen PCR ürünleri sekans analizine tabi tutulmuştur.

Simbiyotik bakterilerin sekans sonuçları SeqEdit (DNA Star Inc., Madison, WI) yazılımı kullanılarak düzeltilmiştir. Çoklu sekans hizalaması ClustalX v1.83.1 kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Thompson vd., 1997). Hizalamadaki uyumsuzluklar Mesquite v2.6 programı kullanılarak düzeltilmiştir (Maddison ve Maddison, 2009). Filogenetik analizler için PAUP v 4.0b10 kullanılmıştır (Swofford, 2002). Sıralanmış veriler MrModel Test programında uygun modeller kullanılarak kısımlara ayrılmıştır (Nylander, 2004). Son olarak Bayesian analizi standart sapma değeri 0.01'e ulaşana kadar Markov-Chain Monte-Carlo'nun iki tekrarı ile uygulanmıştır (Huelsenbeck vd., 2001).

Simbiyotik bakterilerin teşhisi için moleküler düzeyde yapılan çalışmalar Amerika Birleşik Devletleri'nin Arizona Üniversitesi Entomoloji bölümünde Prof. Dr. S. Patricia Stock'un laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.5.2. Simbiyotik Bakterinin Fenotipik Karakterizasyonu

Moleküler olarak tanımlanan *Photorhabdus* sp. suşuna, aşağıda belirtilen standart fenotipik analizler uygulanmıştır.

1. Pigmentasyon (Antrakininon üretimi)

İzole edilen simbiyotik bakterinin LB broth ortamında hazırlanmış bir gecelik kültüründen 10⁷ ar µl alınarak 10 adet *G. mellonella* larvasının 1. ve 2. çift bacakların olduğu bölgeden enjekte edilmiştir (Akhurst, 1980, 1982). Larvalar 25°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sentezlenen antrakininon miktarı enfekte olan larvaların pigmentasyon düzeyine bağlı olarak tayin edilmiştir.

2. Antibiyotik üretimi

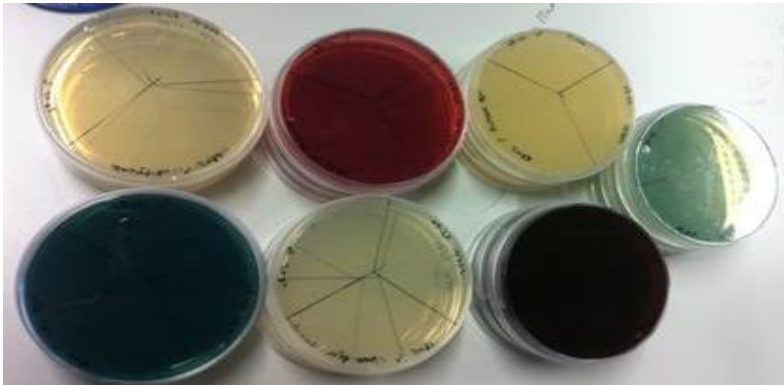
İzole edilen simbiyotik bakterinin hazırlanmış bir gecelik sıvı kültürü spektrofotometre (Shimadzu UV mini-1240) kullanılarak 600 nm'de 1 absorbans değerine (OD₆₀₀:1) ulaşmaya kadar seyreltilmiş ve LB pyruvat agar bulunan petrinin tam ortasına nokta şeklinde 5 µl ekilmiştir. Hazırlanan petriler 30 °C'de 3 gün süreyle inkübe edilmiştir. Simbiyotik bakterilerin oluşturduğu bu kolonilerin daha fazla büyümesini durdurmak için, petrilerin kapağı alınıp ters çevrilerek 5 dk UV ışığına maruz bırakılmıştır. Bu esnada LB broth besiyerine 7.5 g/l agar (Merck) eklenerek soft agar hazırlanmıştır (Stock ve Goodrich-Blair, 2012). Otoklavdan çıkan soft agarın *Micrococcus luteus*'un bir gecelik sıvı kültürünün eklenebilmesi için uygun sıcaklığa geldiğinde son konsantrasyon %1 olacak şekilde bakteri kültürü eklenmiştir. Hazırlanan bu soft agar *Photorhabdus* kolonisinin üzerini tamamen örtecek şekilde petriye dökülmüş ve 30 °C'lik inkübatöre yerleştirilmeden önce soft agarın katılması beklenmiştir. Antibiyotik üretim düzeyi, 3 gün inkübasyondan sonra *Photorhabdus* kolonisi etrafındaki *M. luteus* bakterisinin üreyemediği temiz zon ölçülerek belirlenmiştir (Volgyi vd., 1998).

3. Biyolojik ışım (Biyoluminesens) aktivitesi

LB pyruvat agar, Lipaz agar, Proteaz agar ve NBTA agar gibi çeşitli besi ortamlarında 72 saat inkübasyon süreci sonunda gelişen *Photorhabdus* kolonileri ve bu bakterilerin sıvı besiyerinde üretilmiş kültürlerinden alınarak enfekte edilmiş *Galleria* larvalarının biyoluminesens aktiviteleri In Vitro Imaging System (IVIS-100, Xenogen Alameda, CA, USA) kullanılarak ölçülmüştür. *Photorhabdus* bakterilerinin *in vivo* ortamda yani *G.mellonella* larvası içinde biyoluminesens aktivitelerinin ölçümünde biyoluminesent olduğu bilinen bir başka *Photorhabdus* suşu kontrol amaçlı kullanılmıştır. Tüm ölçümlerde bakterilerin cihazda maruz kalma süreleri 1 sn olarak ayarlanmıştır. Ölçümler yapılırken, ölçüm modülünde bakteri kolonilerinin yanı sıra ölçümün doğruluğundan emin olmak amacıyla besiyerinin orta yani bakteri gelişiminin olmadığı kısımda seçilerek gerçekleştirilmiştir (Stock ve Goodrich-Blair, 2012).

4. Boya alımı

Boya alımı çeşitli ayırt edici besi yerleri kullanılarak test edilmiştir (Şekil 3.3). Her besi yeri için bir gecelik sıvı bakteri kültürü absorbans değeri 600 nm’de 1 olacak şekilde seyreltikten sonra 5 µl alınarak nokta şeklinde besi yerlerine ekilmiş ve 30°C’de 72 saat inkübe edilmiştir. Her bir besiyerinden 3’er adet hazırlanmıştır.



Şekil 3.3. Boya alımının test edildiği çeşitli besi yerleri (NBTA, LB pyruvat agar, MacConkey agar, EMB agar), lipaz agar, proteaz agar ve siderophore agar.

NBT agar

Photorhabdus suşlarının bromthymol blue'yu hücre içerisine alıp almadıklarını test etmek amacıyla LB broth besi yerinde hazırlanmış bir gecelik kültürlerinden 5 µl alınarak, içerisinde %0,004 triphenyltetrazolium chloride (TTC) ve %0,0025 bromthymol blue (BTB) bulunan nutrient agar (NBTA) ortamına ekilmiştir (Orozco vd., 2013).

MacConkey agar

Photorhabdus suşlarının nötral kırmızı boyayı absorblamasını test amacıyla hazırlanan bir gecelik sıvı kültürlerden alınarak özel bir besiyeri olan MacConkey agara ekilmiştir (Sergeant vd., 2006).

EMB (Eosin Methylene Blue Lactose) agar

Photorhabdus suşlarının eosin Y ve methylen blue boyalarını absorblamalarını ve besi yerinde bulunan laktozu parçalamalarını test etmek amacıyla EMB agar kullanılmıştır. Hazırlanan gecelik sıvı kültürlerden alınan 5 µl bakteri süspansiyonu EMB agara ekilmiştir.

5. Lipaz aktivitesi

Nutrient agar içerisine Tween 80 (Sigma) eklenerek hazırlanan lipaz agar ortamına *Photorhabdus* suşlarının bir gecelik sıvı kültüründen 5 µl alınarak nokta şeklinde ekilmiştir. *Photorhabdus*'un lipolitik aktivitesi Tween 80'e karşı ölçülmüştür. Aktivitenin düzeyi *Photorhabdus* kolonilerinin etrafında beliren zonlara bakılarak belirlenmiştir. Lipaz aktivitesi inokulasyondan 3 gün sonra ölçülmüştür (Stock ve Goodrich-Blair, 2012).

6. Proteaz aktivitesi

LB pyruvat agar (Sigma) içerisine skim milk eklenerek hazırlanan proteaz agar ortamına *Photorhabdus* suşlarının bir gecelik sıvı kültüründen 5 µl alınarak nokta şeklinde ekilmiştir. Proteaz aktivitesi, proteaz agarda bulunan skim milk'e karşı

ölçülmüştür. Proteaz aktivitesi sonucu oluşan zonlar inokulasyondan 3 gün sonra ölçülmüştür (Boemare vd., 1997).

7. Siderophore üretimi

Siderophore üretimini ölçmek üzere *Photorhabdus* suşlarının sıvı kültürleri, içerisinde özel bir boya (chrome azurol sulphate) ve demir çözeltisi (1mM FeCl₃.6H₂O, 10 mM HCl) bulunan LB agar ortamına nokta şeklinde ekilmiştir. Siderophore üretimi inokulasyondan 3 gün sonra ölçülmüştür (Watson vd., 2005).

8. Hareketlilik

Motility agar [LB broth + %0.3 agar] deneyin yapılacağı zaman taze olarak hazırlanarak petrilere dökülmüştür. Petriler agar yüzeyinin katılması için kapakları açık bir şekilde bir süre bekletilmiştir. Konsantrasyonu ayarlanan (OD₆₀₀:1) sıvı bakteri kültüründen 5µl alınarak agarın tam orta noktasına damlatılarak petrileri ters çevirmeden 30°C'lik inkübatöre aktarılmışlardır. Yüzme hareketliliği 24 saat sonra koloninin büyüklüğüne bakılarak ölçülmüştür (Easom ve Clarke, 2008).

9. İnfektif juvenillerde bakterilerin kolonize olması

Yüzeyleri, steril 1.5 ml'lik eppendorf tüp içerisinde %0.4 Hyamine ile 2 dk bekletilerek temizlenmiş infektif juveniller 3 kez steril PBS çözeltisi ile yıkandıktan sonra herbir izolata ait 10'ar adet infektif juvenilden ayrı ayrı bakteri izolasyonu yapılmıştır. Tek bir infektif juvenil 100 µl steril PBS çözeltisi bulunan 1.5 ml'lik eppendorfa aktarılmış ve motorlu el homojenizatörü ile 1 dk süreyle parçalanmıştır. Lizatın 50 µl'si LB pyruvate agara ekilerek 30°C'de 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Herbir suş için hazırlanan 10 adet petrideki bakteri kolonileri sayılarak ortalamaları alınmış ve herbir infektif juvenilin taşıdığı bakteri sayısı belirlenmiştir.

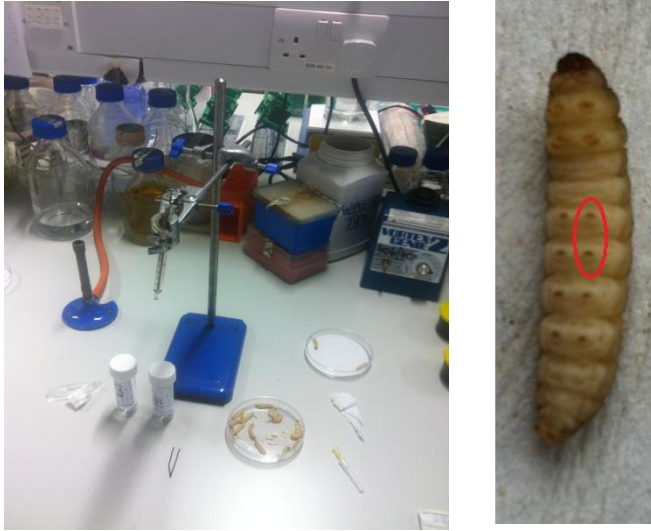
Bu aşamadan sonra yapılan tüm deneylerde, izole edilen *Photorhabdus* suşuna (48-02) moleküler olarak çok yakın ve iyi bilinen bir başka *Photorhabdus* suşu (TT01) kontrol amaçlı olarak eşlik etmiştir.

3.1.5.3. Büyüme eğrisinin saptanması

Büyüme eğrisinin saptanması için *Photorhadus* suşlarına (48-02 ve TT01) ait bir gecelik sıvı kültürler hazırlanmıştır. Bu sıvı kültürlerden 0.5 ml alınarak daha önceden hazırlanmış 250 ml'lik erlen içerisindeki 50 ml LB broth besiyerine ekilmiştir. Ekim işlemini takiben bakteri süspansiyonunun optik yoğunluğu spektrofotometre (Shimadzu UV mini-1240) kullanılarak ölçülmüştür. Bakteriler çalkalamalı inkübatöre yerleştirilerek 30°C'de 200 rpm hızda inkübasyona bırakılmıştır. Optik yoğunluğu ölçme işlemi 1'er saat arayla 9 saat boyunca yapılmıştır. Optik yoğunluk OD₆₀₀'de 1'e ulaştığında, bu yoğunluktaki bakteri sayısını saptayabilmek amacıyla bakteri süspansiyonları seriler halinde seyreltilerek LB pyruvate agarı ekilmiştir. Ayrıca optik yoğunluk arttıkça (>OD₆₀₀:1) daha güvenilir sonuçlar alabilmek için ölçümler bakteri süspansiyonu seyreltilerek gerçekleştirilmiştir. Deney 3 kez tekrarlanmıştır.

3.1.5.4. Patojenite testi

Bakteriyal suşların patojenitelerini test etmek için, bu suşlara ait LB broth'da bir gecelik sıvı kültürler hazırlanmış ve optik yoğunlukları PBS ile OD₆₀₀'de 1'e seyreltilmiştir. Büyüme eğrisinin saptanması sırasında elde edilen verilere dayanılarak (OD₆₀₀:1'de 2x10⁸ bakteri/ml) bakteri süspansiyonunun yoğunluğu 100 bakteri/10 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Konsantrasyonları ayarlanan bakteri suşları 100 µl'lik enjektör (Hamilton) içerisinde BD Microlance™ 3 30G x ½" iğne (0.3mmx13mm) kullanılarak 10'ar adet son dönem *G. mellonella* larvasına 1. ve 2. çift bacakların bulunduğu bölgeden enjekte edilmiştir (Şekil 3.4). Enjekte edilecek bakteri suşları değiştirilmeden önce şırınga ilk önce %70'lik alkol ile steril edilmiştir. Alkol ise steril PBS ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Deneyde negatif kontrol olarak 10'ar adet *G.mellonella* larvasına 10µl steril PBS enjekte edilmiştir. Larvalar 25°C'de inkübasyona bırakılarak, LT₅₀ değerinin saptanabilmesi için 72 saat boyunca belirli aralıklarla kontrol edilmiştir.



Şekil 3.4. Sıvı bakteri kültürünün enjekte edildiği bölge ve deney düzeneği.

3.1.5.5. Koloni varyasyonlarının saptanması

İki farklı *Photorhabdus* suşunu taşıyan infektif juvenillerin yüzeyleri steril edildikten sonra, 100 μ l PBS içeren 1.5 ml'lik eppendorf tüpünde motorlu el homojenizatörü kullanılarak tek infektif juvenilden bakteri izolasyonu yapılmıştır. Her iki izolata ait 10'ar adet infektif juvenil parçalandıktan sonra 50 μ l lizat LB pyruvat besi yerine ekilmiştir. Besi yerleri 30°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra her iki bakteri suşuna ait koloni varyasyonu saptanmıştır.

3.1.5.6. Biyokimyasal testler

Bakteri suşlarının biyokimyasal analizleri için API 20E (BioMerieux, Inc. Durham, NC) kiti kullanılmıştır.

Biyokimyasal testlere tabi tutulacak olan *Photorhabdus* suşları (48-02 ve TT01) LB pyruvat agar ortamına ekilmişlerdir. Daha sonra, API test sistemine uygun olarak inkübasyon kutusu (tepsi ve kuyucuk) hazırlanmış ve nemli atmosfer yaratmak için tepsi kuyucuklarına yaklaşık 5 ml distile su dağıtılmıştır.

İnkübasyon kutusunun üzerine suşlara ait referans numaraları yazılmıştır. Stripler inkübasyon kutusuna yerleştirilmiştir. Steril pastör pipeti kullanılarak LB pyruvat agar ortamındaki 24 saatlik kültürden, tek bir koloni alınarak steril distile su ortamında ezilmiştir. Hazırlanan homojen bakteri süspansiyonu, bekletilmeden kullanılmıştır. Stribin inokulasyonu yapılırken tüpün dibinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek pipetle strip tüplerine bakteri süspansiyonu dağıtılmıştır. Sitrat kullanımı, asetoin üretimi ve jelatinaz testlerine ait tüplerin tamamı, diğer testlerin sadece tüp bölümleri bakteriyal süspansiyon ile doldurulmuştur.

Arjinin dihidrolaz, Lizin dekarboksilaz, Omithin dekarboksilaz, H₂S üretimi ve üreaz testlerinde anaerobik ortam oluşturmak için tüpler mineral yağ ile kaplanmıştır. İnkübasyon kutusu kapatılıp 24 saat süreyle 30⁰C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinden sonra, strip okuma tablosuna göre okunmuştur.

Triptofan DeAminaz (TDA) testi: Kitler üzerindeki kuyucuğa bir damla TDA reaktifi eklenmiş ve kırmızı kahverengi bir renk ortaya çıktığında sonuç şemasına pozitif olarak kaydedilmiştir.

İndol (IND) üretimi testi: IND kuyucuğuna bir damla JAMES reaktifi eklenmiş pembe renk oluşması durumunda sonuç şemasına pozitif olarak kaydedilmiştir.

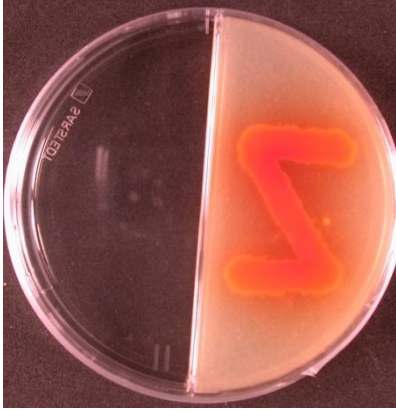
Voges Proskauer (VP) testi: VP1 ve VP2 reaktiflerinin her birinden birer damla eklenmiş, 10 dk beklendikten sonra pembe veya kırmızı renk oluşması durumunda sonuç şemasına pozitif olarak kaydedilmiştir.

Glukoz (GLU) testi: GLU tüpüne NIT1 ve NIT2'den 1'er damla eklenmiş ve 5 dk beklenmiştir. Kırmızı renk oluşumu pozitif, sarı renk oluşumu ise negatif olarak kabul edilmiştir.

3.1.5.7. Çaprazlama testi (in vitro)

İlk olarak test edilecek *Photorhabdus* bakteri suşlarının (48-02 ve TT01) bir gecelik sıvı kültürleri OD₆₀₀'de 1'e seyreltilmiştir. Çaprazlamayı *in vitro* olarak test etmek için lipid agar ve TSA agar (Oxoid) besi ortamları seçilmiştir. Bu besi

yerlerinden deney ve kontrol grupları için 10'ar adet olmak üzere toplam 80 tane 9 cm'lik plastik petri içerisinde hazırlanmıştır. Besi yerleri taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır. Petrilere dökülen besi yerlerinin yüzeylerindeki nem 15 dk kadar bekletilip kurutulduktan sonra bakteriler "Z" şeklinde ekilmiştir (Şekil 3.5). Bu işlem 50 µl bakteri kültürünün eşit aralıklarla petrinin ortasına bırakılıp steril öze ile dağıtılmasıyla gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.5. Çaprazlama testi için hazırlanan deney düzeneği.

Bakteri ekilmiş besi yerlerinin orta kısımlarına yüzeyleri steril edilmiş 50'şer infeksiif juvenil eklenmeden önce 30°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. İzole edilen *Photorhabdus* suşunun (48-02) ekildiği besi yerlerine TT01 suşuna ait infeksiif juveniller, kontrol amaçlı kullanılan *Photorhabdus* suşunun (TT01) ekildiği besi yerlerine ise 48-02 suşuna ait infeksiif juveniller eklenmiştir. Kontrol grubunda ise infeksiif juveniller simbiyotik ilişkide buldukları *Photorhabdus* suşlarının ekili bulunduğu petrilere eklenmişlerdir. Her bir petri nem kaybını minimize etmek için 2 kat parafilm ile sarılarak 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Kullanılan petrilere iki bölmedir. Bir tarafta besi ortamı varken diğer tarafa steril 1X PBS çözeltisi konmuştur. Üç hafta sonra PBS çözeltisine geçen yeni jenerasyon infeksiif juveniller toplanmıştır. Elde edilen infeksiif juvenillerden bakteri izolasyonu yapılarak kolonize olan bakteriler tespit edilmiştir.

3.1.5.8. Çaprazlama testi (*in vivo*)

Bu test için konukçu olarak son dönem *G. mellonella* larvaları kullanılmıştır. İlk olarak her bir *Photorhabdus* suşu için hazırlanan bir gecelik sıvı kültür 10 μ l'de 100 bakteri olacak şekilde seyreltilmiştir. Daha sonra seyreltilen bu bakteri kültürleri enjektör ile 10'ar adet larvanın 1. veya 2. Çift bacağından enjekte edilmiştir. Bu işlemin bitimini takiben petrilere konan larvaların üzerine, enjekte edilen bakteri suşundan farklı bir bakteri taşıyan infektif juveniller (1000 IJ/ml)'den 1 ml eklenmiştir. Enfekte olan larvalar White trap sistemine aktarılmıştır. Elde edilen yüzeyleri steril edilmiş yeni jenerasyon infektif juvenillerden tek bir infektif juvenile ait bakteri izolasyonu yapılarak hangi bakteri suşunun daha iyi kolonize olabildiği belirlenmiştir.

Ayrıca enfekte larvalar yeni jenerasyon infektif juveniller elde edildikten sonra yüzeyleri %70'lik alkol ile steril edilerek içerisinde 4 mm çaplı 5 adet cam bilye (Fisher, USA) ve 5 ml steril PBS bulunan 25 ml'lik falcon tüpüne aktarılmıştır. Bu tp, larvaları homojenize etmek için 2 dk boyunca vortekslenmiştir. Cam bilyelerin larvaları mekanik olarak parçalamaları sonucu açığa çıkan bakteriler seyreltilerek LB pyruvate ortamına ekilmiştir. 30°C'de 2 gün inkübasyondan sonra petrilere oluşan koloniler sayılarak hangi bakteri suşunun larva içerisinde daha iyi kolonize olduğu belirlenmiştir.

3.2. Konukçu Dağılımı alışmaları

İzole edilen entomopatojen nematod (48-02) ile başta nematodun izole edildiği bölgeden toplanmış olan Scarabaeidae familyasından *Anomala* sp. olmak üzere *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) ve *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae) zararlıları üzerinde konukçu dağılımı çalışmaları yapılmıştır.

İzole edilen entomopatojen nematodun *S. littoralis*'e karşı etkinliğini ölçmek için ilerinde steril kum bulunan 10 adet 50 ml hacimli plastik kapların herbirine birer adet sağlıklı son dönem larva konmuştur (şekil 3.6). Daha sonra nematodların konsantrasyonu distile su ile 25 IJ/cm² olacak şekilde hazırlanıp uygulanmıştır. Kontrol grubu için ise nematod uygulamasında uygulanan doz ile aynı miktarda distile su uygulanmıştır. Etkinlik denemesi 3 kez tekrarlanmıştır.



Şekil 3.6. *Spodoptera littoralis* ile yapılan deneylerde kullanılan düzenek.

EPN izolatının *Anomala* sp.'ye karşı etkinliğini ölçmek için çeşitli dönemlerdeki sağlıklı larvalar seçilerek yarısından fazlası steril toprak ile dolu olan 250 ml'lik plastik kaplar kullanılmıştır. Deney düzeneği 5'er tane larva olmak üzere üç deney grubu ve bir kontrol grubu olarak kurulmuştur. Nematod uygulamasından önce larvaların sağlıklı olduklarından emin olmak için toprağa dalmaları beklenmiştir. Daha sonra deney gruplarına konsantrasyonu 75 IJ/cm² olarak hazırlanmış nematod süspanyonu uygulanmıştır. Kontrol grubu için ise aynı miktarda yalnızca distile su uygulanmıştır.

Son olarak da entomopatojen nematod izolatının *Curculio elephas* zararlısına karşı etkinliğini ölçmek için her bir gözenğinde 0.5 g steril kum bulunan 24 gözenekli hücre kültür kapları kullanılmıştır (Şekil 3.7). Her bir gözeneğe sağlıklı birer larva yerleştirilerek konsantrasyonu 50 IJ/60 µl distile su olarak hazırlanmış nematod süspanyonu uygulanmıştır. Kontrol grubu için ise larvaların bulunduğu gözeneklere yalnızca 60 µl distile su uygulanmıştır (Karagöz vd., 2009). Etkinlik denemesi 3 kez tekrarlanmıştır.

Konukçu dağılımı çalışmalarının tümü oda sıcaklığında (23-24 °C) yürütülmüştür.



Şekil 3.7. *Curculio elephas* larvaları ile yapılan deneylerde kullanılan düzenek.

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan besi yerleri

Besi ortamı	İçerik	Kullanım amacı
LB broth	LB granulleri (Merck) 25g/l	Rutin bakteri kültür üretimi
LB agar	LB granulleri (Merck) 25g/l Agar (Merck) 15g/l	Rutin bakteri kültür üretimi
LB pyruvate agar	LB granulleri (Merck) 25g/l Pyruvate (Sigma) 1g/l Agar (Merck) 15g/l	<i>Photorhabdus</i> suşlarının rutin kültür yapımı
EMB (Eosin Methylene Blue)	Eosin methylene blue agar (Oxoid) 37.5g/l	Boya alımı için fenotipik test
NBTA	Nutrient agar (Oxoid) 28g/l Bromothymol blue (BDH chemicals) 15mg/l 2,3,5 triphenly tetrazolium salt (Merck) 30mg/l	Boya alımı için fenotipik test
MacConkey agar	MacConkey agar (Merck) 50g/l	Boya alımı için fenotipik test
Lipase agar	Nutrient agar (Oxoid) 28g/l Tween 80 (Fisher scientific) 0.5%	Tween 80'e karşı lipaz aktivitesinin belirlenmesi
Protease agar	LB pyruvate agar + 1% skim milk, 10x stok solusyondan (distile su ile hazırlanmış 10% skim milk, 115°C 10 dk otoklavlanmış)	Proteaz aktivitenin belirlenmesi
CAS agar	50 ml dH ₂ O'da 60.5mg Chrome Azurol S + 10ml demir (III) çözeltisi (1mM FeCl ₃ .6H ₂ O, 10 mM HCl)= çözelti A; 40ml dH ₂ O'da 72.9 mg CTAB = solution B; Çözelti A ve B karışımı = CAS çözeltisi, otoklav; LB agar CAS çözeltisiyle 1:10 oranında karıştırılır.	Siderophore üretiminin belirlenmesi
Soft agar	LB broth 25g/l Agar 7.5g/l	Antibiyotik üretiminde <i>M. luteus</i> 'un eklenmesinde
Motility agar (%0.3 agar)	LB granules (Merck) 25g/l Agar (Merck) 3g/l	Yüzme hareketliliğinin belirlenmesi
Lipid agar	Mısır şurubu (Karo) 10g/l Yeast Extract (Bacto™) 5g/l Nutrient agar (Oxoid) 25g/l Sıvı yağ 10ml/l MgCl ₂ .6H ₂ O (Fisher scientific) 2g/l	Cross-breeding test (in vitro)

4. BULGULAR

4.1. Entomopatojen Nematodların Tür Teşhisine Yönelik Çalışmalar

Alınan toprak örneklerinden iki farklı entomopatojen nematod izole edilmiştir. İleri çalışmalar için bu izolatlardan bir tanesi kullanılmıştır.

Morfometrik ve moleküler verilerin bir arada değerlendirilmesi sonucu elde edilen entomopatojen nematod izolatının *Heterorhabditis bacteriophora* olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).

Tür adı: *Heterorhabditis bacteriophora*

İzolat no: 48-02

Çizelge 4.1. *Heterorhabditis bacteriophora* (izolat 48-02)'nin morfometrik ölçüm (μm) sonuçları İnfektif juveniller

	TU	MG	ES	EP	NR	TL	AG	a	b	c	%D	%E
Min	512.7	19.3	117.8	90.3	88.2	74.2	12.1	19.6	4.3	6.1	71.4	99.7
Ort	567.9	24.7	123.8	95.3	98.2	87.4	13.8	23.2	4.6	6.5	77.0	109.6
Maks	608.6	30.8	130.9	105.7	107.2	96.8	16.4	28.0	4.8	7.4	86.4	133.3
Ss	26.3	2.8	3.2	3.4	5.4	6.4	1.1	2.0	0.1	0.3	3.5	9.3

Erkek nematodlar

	TU	MG	ES	EP	NR	TL	AG
Min	494.1	25.7	75.4	113.6	61.3	22.2	14.3
Ort	614.0	31.3	100.8	123.0	67.7	33.6	22.4
Maks	805.6	42.6	107.3	133.3	107.2	42.5	25.8
Ss	89.8	4.3	5.3	8.3	7.4	4.3	2.1

	SU	Gub. U	%SW	%GS	D	E
Min	31.6	16.0	132	40.6	97.2	259.4
Ort	39.9	18.7	176	50.6	116.5	328.3
Maks	42.8	21.8	263	63.8	165.7	451.1
Ss	3.1	2.8	25	5.2	16.3	32.6

Çizelge 4.1. *Heterorhabditis bacteriophora* (izolat 48-02)'nin morfometrik ölçüm (μm) sonuçları İnfektif juveniller (Devamı)

Dişi nematodlar

	TU	MG	ES	EP	NR
Min	1386.7	67.3	112.6	105.3	71.2
Ort	1852.9	98.7	131.3	126.3	93.6
Maks	2421.6	148.8	167.8	151.7	135.9
Ss	247.3	14.5	11.7	9.4	13.3

	TL	AG	%V	%D	%E
Min	61.7	19.3	39.3	74.2	118.2
Ort	78.9	28.7	42.2	93.2	158.6
Maks	93.6	36.8	51.7	109.9	191.7
Ss	8.3	2.8	2.1	8.3	18.4

Hermafrodit nematodlar

	TU	MG	ES	EP	NR
Min	3205.7	156.8	176.5	142.2	123.1
Ort	4470.4	203.5	197.1	177.9	146.4
Maks	5216.4	231.5	216.5	207.8	163.8
Ss	543.0	19.4	11.0	19.9	9.0

	TL	AG	%V	%D	%E
Min	68.1	42.8	35.1	77.8	169.9
Ort	86.3	59.0	40.3	89.8	207.1
Maks	103.8	70.3	44.1	98.8	253.0
Ss	8.6	6.8	1.9	7.2	23.4

Min: Minimum

Ort: Ortalama

Max: Maksimum

Ss: Standart sapma



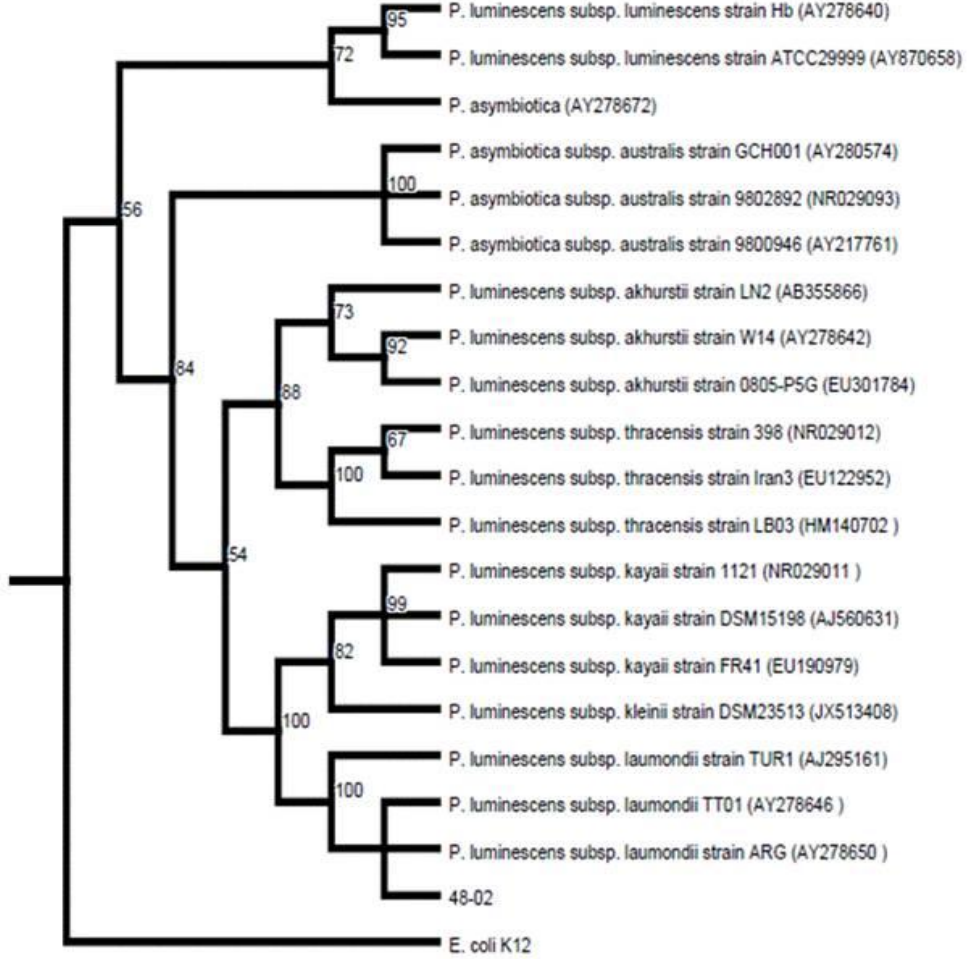
Şekil 4.1. Elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora* (48-02) türüne ait ilk jenerasyon hermafrodit nematodların baş kısmı.



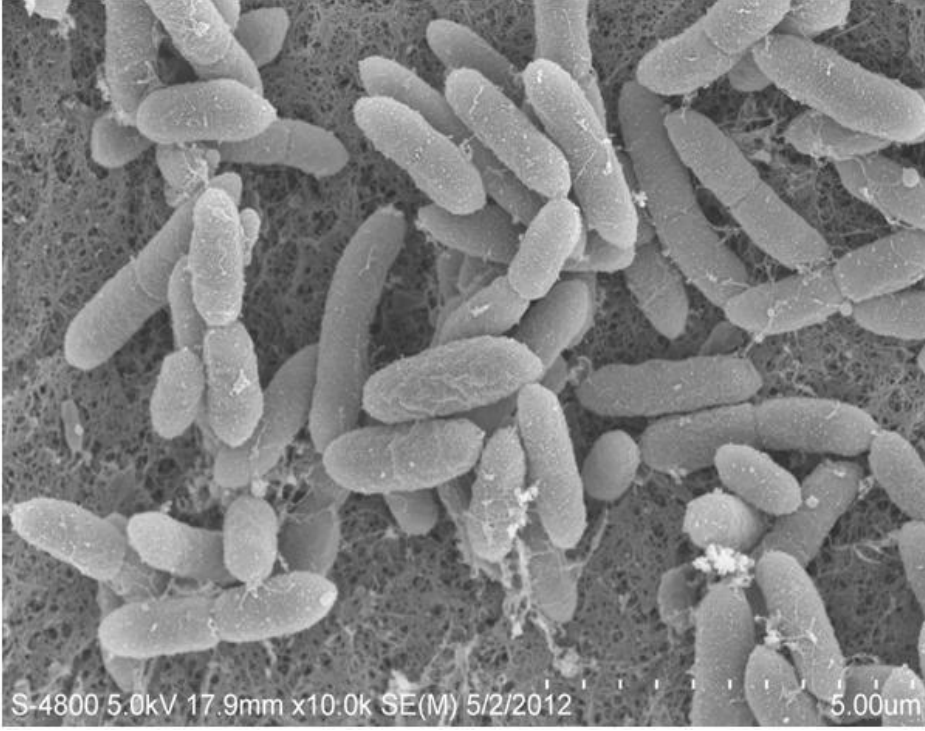
Şekil 4.2. Elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora* (48-02) türüne ait infeksiif juvenillerin kuyruk kısmı.

4.2. Simbiyotik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu

Yapılan moleküler işlemler sonucu *H. bacteriophora* (izolat 48-02)'nın simbiyotik bakterisinin *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* olduğu belirlenmiştir ve sekans analizi sonuçlarına dayanarak filogenetik ağaç çizilmiştir (Şekil 4.3 ve 4.4).



Şekil 4.3. *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşuna ait tür dağılımını gösteren filogenetik ağaç.



Şekil 4.4. *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşuna ait scanning elektron mikroskop (SEM) görüntüsü (SEM görüntüsü Arizona Üniversitesi USIF Görüntüleme Merkezinde çekilmiştir).

4.2.1. Simbiyotik Bakterinin Fenotipik Karakterizasyonu

4.2.1.1. Pigmentasyon (Antrakininon üretimi)

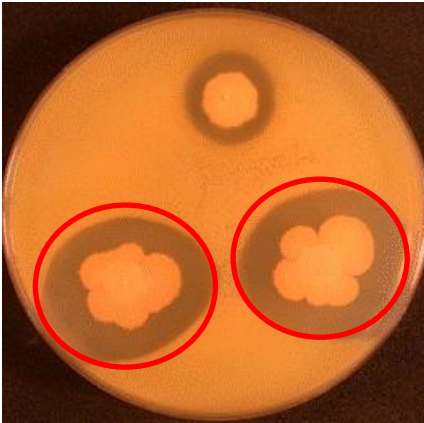
İzole edilen simbiyotik bakteri ile enfekte olan *G.mellonella* larvasının 72 saat sonunda yeşilimsi gri bir renk aldığı gözlenmiştir (Şekil 4.5). Bu gözleme dayanarak *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşunun antrakininon üretmediği saptanmıştır.



Şekil 4.5. *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşu ile enfekte olmuş *Galleria mellonella* larvalarında renklenme.

4.2.1.2. Antibiyotik üretimi

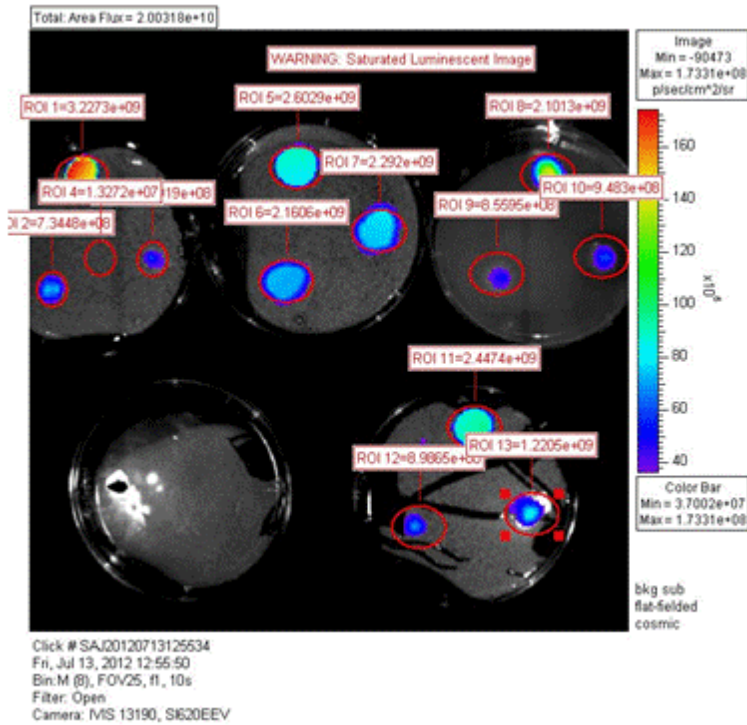
Yürütülen deneyler sonucunda *Micrococcus luteus* bakterisinin üreyemediği temiz zonlar elde edilerek izole edilen *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşunun oldukça etkili antibiyotik sentezlediği saptanmıştır (Şekil 4.6).



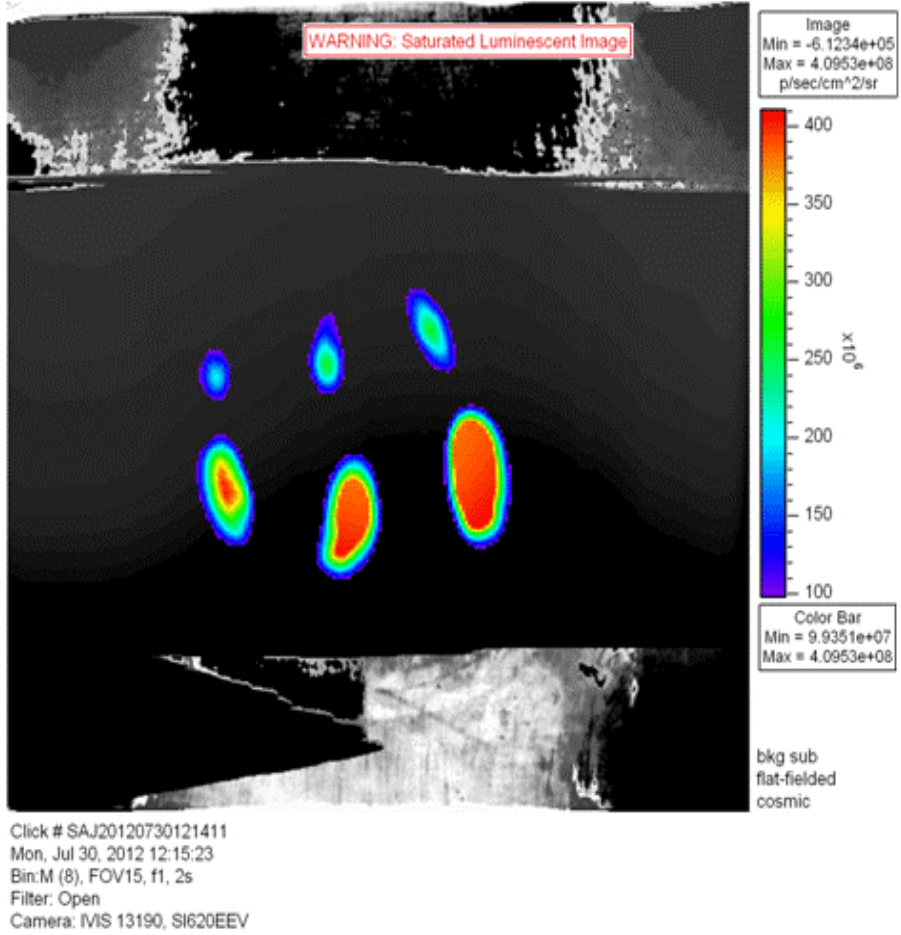
Şekil 4.6. *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşu tarafından antibiyotik üretimi.

4.2.1.3. Biyolojik ışınma (Biyoluminesens) aktivitesi

NBTA, MacConkey agar, Lipaz agar, Proteaz agar ve EMB agarda üreyen *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* kolonilerinde EMB agar haricindeki tüm besi yerlerinde biyoluminesens aktivite tespit edilmiştir (Şekil 4.7). NBTA ortamında bulunan bakteri kolonilerinin biyoluminesens aktivitelerinin diğer besi yerlerine göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Ayrıca *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşunun biyoluminesens aktivitesi enfekte *G. mellonella* larvaları kullanılarak *in vivo* ortamda da tespit edilmiştir. *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşunun biyoluminesent olduğu bilinen ve kontrol amaçlı kullanılan bir diğer *Photorhabdus luminescens* TT01 suşundan daha fazla biyoluminesens aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşunun çeşitli besi yerlerindeki biyoluminesens aktivitesi.

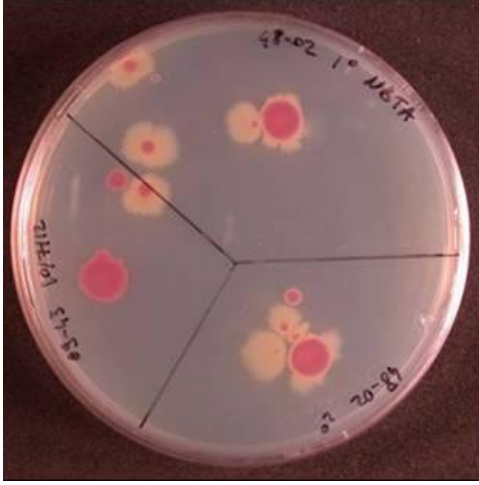


Şekil 4.8. *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşu (alt) ve kontrol amaçlı kullanılan *Photorhabdus luminescens* TT01 suşunun (üst) *in vivo* ortamdaki biyoluminesens aktivitelerinin karşılaştırılması.

4.2.1.4. Boya alımı

NBT agar

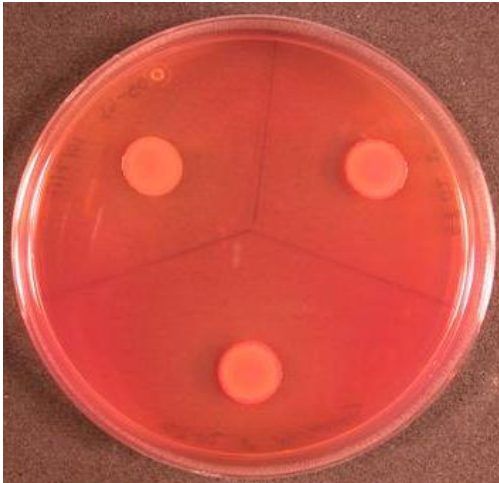
İzole edilen *Photorhabdus* kolonileri NBTA ortamında 72 saat inkübasyon sonrasında kırmızı renkte gözlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. NBTA besi ortamında üremiş olan *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşu.

MacConkey agar

İzole edilen *Photorhabdus* kolonileri McConkey agar ortamında 72 saat inkübasyon sonrasında besi yerindeki boyayı absorbladığı gözlenmiştir (Şekil 4.10).



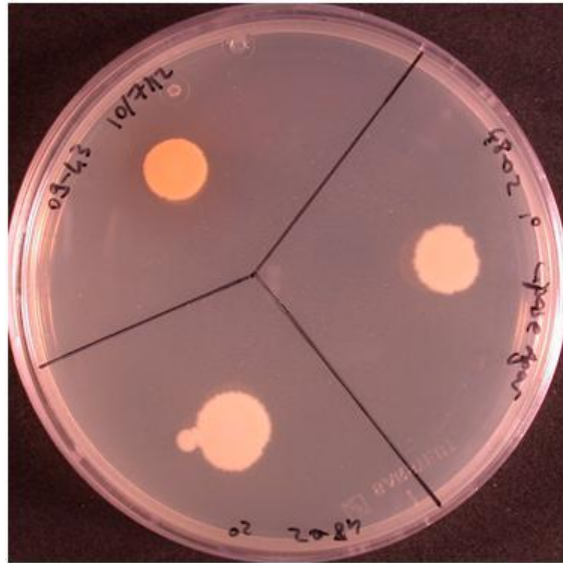
Şekil 4.10. McConkey besi ortamında üremiş olan *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşu

EMB agar

Photorhabdus luminescens subsp. *laumondii* 48-02 suşu EMB agar ortamında ürememiştir.

4.2.1.5. Lipaz aktivitesi

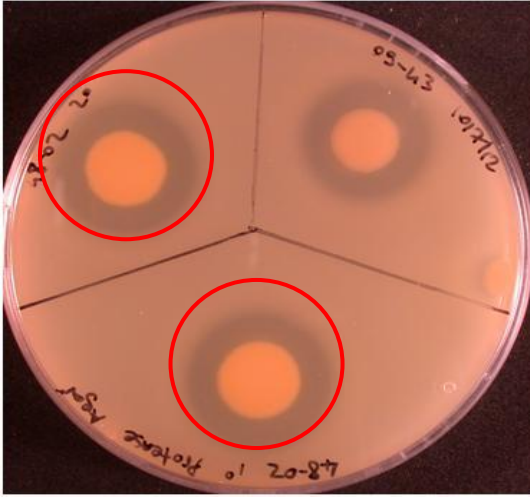
Photorhabdus luminescens subsp. *laumondii* 48-02 suşunun 72 saat sonunda Lipaz agarda bulunan Tween 80'e karşı lipolitik aktivitesinin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Lipaz agar ortamındaki *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* (48-02) suşları.

4.2.1.6. Proteaz aktivitesi

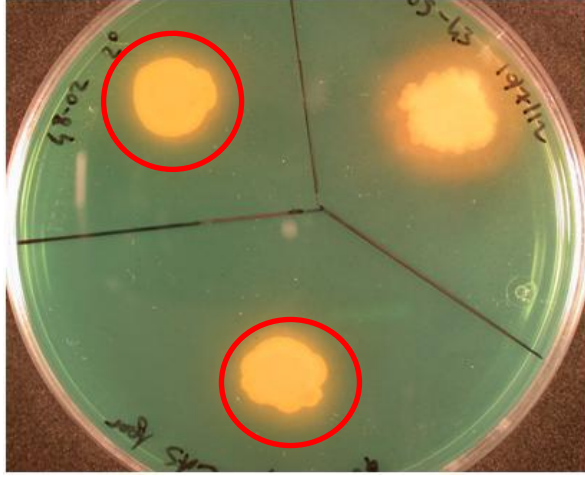
Photorhabdus luminescens subsp. *laumondii* 48-02 suşunun 72 saat sonunda Proteaz agarda bulunan skim milk'e karşı proteaz aktivitesinin olduğu ve kolonilerin etrafında temiz zonlar oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Proteaz agar ortamındaki *Photorhabdus* suşunun (48-02) proteaz aktivitelemi.

4.2.1.7. Siderophore üretimi

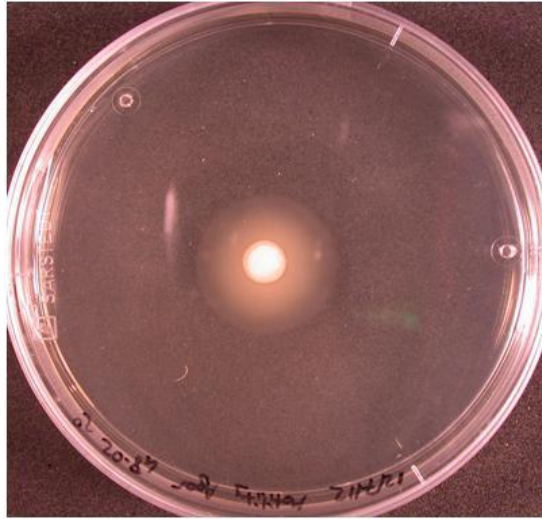
Photorhabdus 48-02 suşu az miktarda siderophore üreterek besiyerinde bulunan demiri bağlamış ve turuncu renkte gözlenen ince zonlar oluşturmuştur (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. CAS agar ortamındaki *Photorhabdus* suşu (48-02) tarafından siderophore üretimi.

4.2.1.8. Hareketlilik

Motility agar ortamına ekilen *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşunun hareketli olduğu 24 saat sonunda yapılan incelemeyle belirlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşunun Motility agar üzerindeki hareketliliği.

4.2.1.9. İnfektif juvenillerde bakterilerin kolonize olması

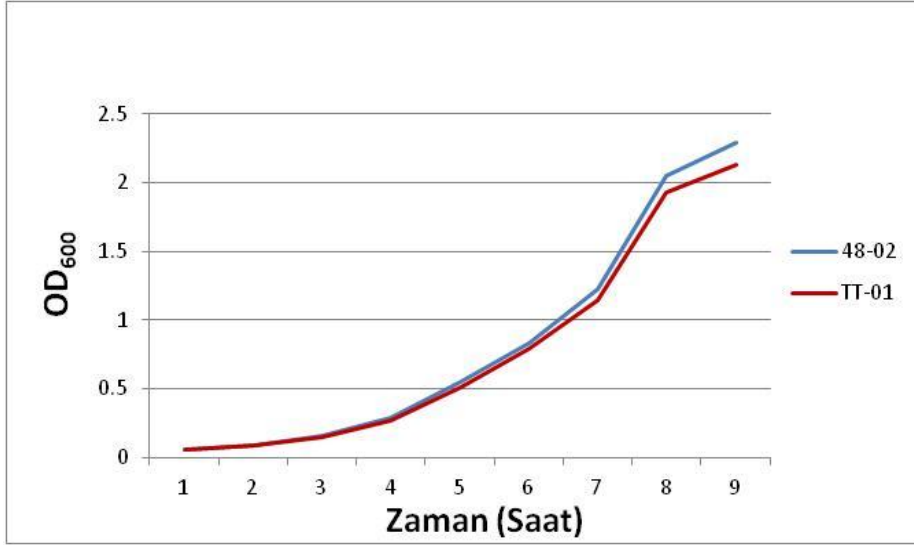
Yüzeyleri steril edilmiş 10 adet infektif juvenilden ayrı ayrı izole edilen *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşu ekildiği besi yerlerinde 72 saat inkübasyon sonrasında sayılarak ortalamaları alınmış ve tek bir infektif juvenildeki bakteri sayısı 120 olarak saptanmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Besi ortamında üreyen *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* (48-02) kolonilerinin sayımı

4.2.2. Büyüme eğrisinin saptanması

Yürütülen deneyler sonucunda iki farklı *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* suşunun (48-02 ve TT01) büyüme hızlarının oldukça benzer olduğu saptanmıştır (Şekil 4.16).

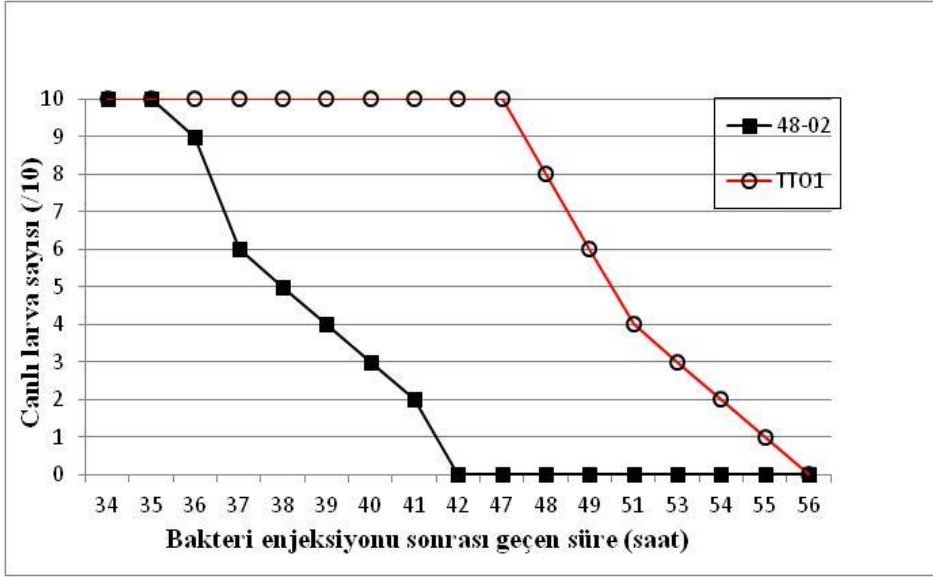


Şekil 4.16. *Photorhabdus* suşlarına (48-02 ve TT01) ait büyüme eğrisi.

4.2.3. Patojenite testi

Yürütülen patojenite testi sonucunda 48-02 suşunun virulansının, kontrol amaçlı kullanılan *Photorhabdus* suşundan (TT01) daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.17). 48-02 suşunun LT_{50} değeri 38 saat olarak belirlenirken TT01 suşunun LT_{50} değeri 50 saat olarak saptanmıştır.

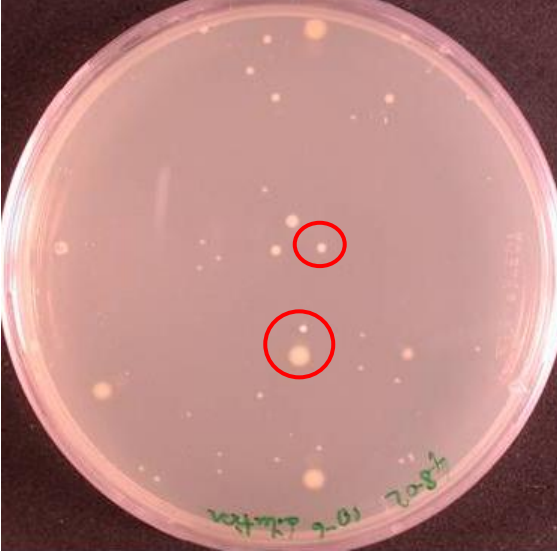
Negatif kontrol grubu olarak steril PBS enjekte edilen *G.mellonella* larvalarının tamamının canlı kaldığı gözlenmiştir.



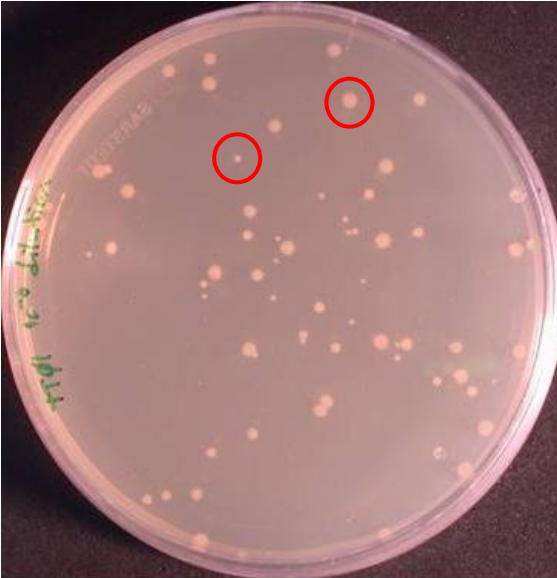
Şekil 4.17. İki farklı *Photorhabdus* suşunun (48-02 ve TT01) virulanslarını gösteren grafik.

4.2.4. Koloni varyasyonlarının saptanması

Yüzeyleri steril edilmiş infektif juvenillerden izole edilen *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* suşlarının (48-02 ve TT01) koloni varyasyonları 48 saatlik inkübasyon sonrasında ekildikleri LB pyruvat besi yerlerinde gözlenmiştir. 48-02 suşu üç farklı koloni tipine sahipken (Şekil 4.18) TT01 suşunun 2 farklı koloni tipine sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.19).



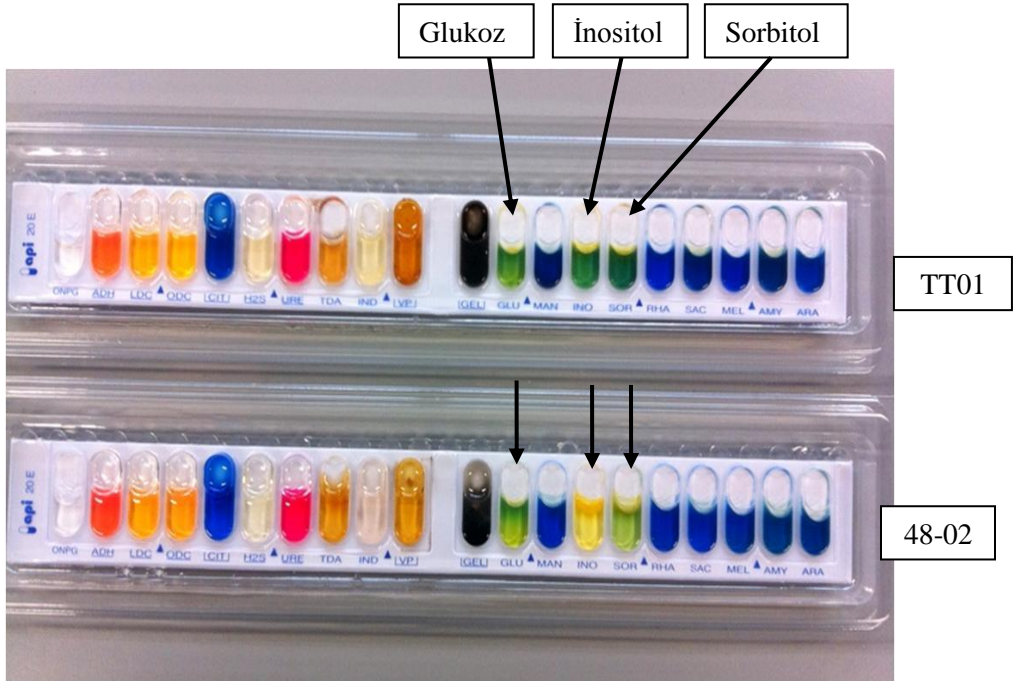
Şekil 4.18. İzole edilen *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* (48-02) koloni varyasyonu.



Şekil 4.19. *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* TT01 suşunun koloni varyasyonu.

4.2.5. Biyokimyasal testler

Biyokimyasal testler (Api 20E) sonucunda *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 ve TT01 suşları arasında bazı farklılıkların olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılıklar glukoz, inositol ve sorbitol reaksiyonlarında gözlenmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 ve TT01 suşlarına ait Api 20E biyokimyasal test sonuçları ve görülen farklılıklar.

4.2.6. Çaprazlama testi (*in vitro*)

Yürütülen deneyler sonucunda *H. bacteriophora* (48-02) ve *H. bacteriophora* (TT01) izolatının kendileriyle hazırlanan tüm besi yerlerinde üreyebildiği saptanmıştır (Şekil 4.21). 48-02 EPN izolatının, simbiyotik ilişki içerisinde olmadığı *Photorhabdus* suşlarının bulunduğu besi ortamlarında bakteriler ile beslenerek geliştiği gözlenmiştir (Şekil 4.21). Aynı şekilde TT01 EPN izolatının da simbiyotik olarak ilişkide bulunmadığı *Photorhabdus* 48-02 suşunun ekili

bulunduğu besi yerlerinde gelişerek çođaldđđı gözlenmiştir. Her iki EPN izolatu (48-02 ve TT01) için hazırlanan kontrol gruplarında da gelişme gözlenmiştir.



şekil 4.21. Çaprazlama testinde (*in vitro*) kullanılan besi yerinde gelişmiş olan 48-02 izolatına ait hermafrodit birey.

4.2.7. Çaprazlama testi (*in vivo*)

Yürütölen deneyler sonucunda *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşunun simbiyotik olarak ilişkide olmadđđı halde *H. bacteriophora* TT01 nematod izolatına ait infektif juvenillerde kolonize oldukları saptanmıştır. Buna karşın *Photorhabdus* TT01 suşunun 48-02 *H. bacteriophora* nematodlarına ait infektif juvenillerde kolonize olamadıkları saptanmıştır. Ayrıca infektif juvenil çıkışını takiben alınarak parçalanan *G. mellonella* larvalarının içerisinde kolonize olan bakterilerden 48-02 suşunun TT01 suşuna göre oldukça baskın olduğu gözlenmiştir.

4.3. Konukçu Dağılımı Çalışmaları

Yapılan konukçu dağılımı çalışmaları sonucunda *H. bacteriophora* 48-02 izolatının *Spodoptera littoralis* larvalarına karşı 48 saat içerisinde %100 ölüm gösterdiği belirlenmiştir. Daha sonra White trap sistemine alınan enfekte larvalardan infektif juvenil çıkışları gözlenmiştir. Kontrol grubunda ise yalnızca distile su uygulanan *Spodoptera* larvalarından ölen olmamıştır.

Anomala sp. türüne karşı yapılan konukçu dağılımı çalışmalarında ise 48-02 izolatı hiçbir etkinlik gösterememiştir.

48-02 izolatının *Curculio elephas*'a karşı etkinliğinin ölçüldüğü konukçu dağılımı çalışmalarında ölüm oranı %40 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda ölü larvaya rastlanmamıştır. White trap sistemine alınan enfekte larvaların tümünden infektif juvenil çıkışlarının olduğu tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Entomopatojen Nematodların Tür Teşhisine Yönelik Çalışmalar

Tez çalışması kapsamında yürütülen deneyler sonucunda elde edilen entomopatojen nematod 48-02 izolatu *Heterorhabditis bacteriophora* olarak tanımlanmıştır.

Türkiye'deki en yaygın entomopatojen nematod türü *Steinernema feltiae*'dir ve bunu *Heterorhabditis bacteriophora* takip etmektedir (Hazır vd., 2003). Bu iki entomopatojen nematod türü dünyada en yaygın türler olarak bilinmektedir (Hominick vd., 1996). Teşhisi yapılan *Heterorhabditis* izolatu Akdeniz ikliminin hakim olduğu Muğla ilinden izole edilmiştir ve gelişim sıcaklığı temel alındığında *H. bacteriophora*'nın tropikal ve subtropikal bölgelere daha iyi adaptasyon gösterdiği saptanmıştır (Grewal vd., 1994).

5.2. Simbiyotik Bakterilerin Tanımlanmasına Yönelik Çalışmalar

Moleküler çalışmalar ve biyokimyasal testler sonucunda *H. bacteriophora* (48-02)'den izole edilen simbiyotik bakteri *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* olarak tanımlanmıştır.

5.2.1. Simbiyotik Bakterilerin Fenotipik Karakterizasyonuna Yönelik Çalışmalar

1. Pigmentasyon (Antrakinin üretimi)

Photorhabdus luminescens subsp. *laumondii* TT01'in primer formları büyümenin durgunluk fazında antarakinin (kırmızı pigment) üretmektedirler (Richardson vd., 1988). İzole edilen *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşunun antrakinin üreten gen bölgesindeki mutasyondan dolayı antrakinin üretmediği ve bu nedenle 48-02 suşu ile enfekte larvaların yeşil-gri bir renk aldığı belirlenmiştir.

2. Antibiyotik üretimi

Photorhabdus luminescens subsp. *laumondii* 48-02 suşu antibiyotik üreterek aynı besi yerinde bulunan *Micrococcus luteus* bakterisinin üremesini engellemiştir. *Photorhabdus*'un primer varyantları stilbene (ST) antibiyotiği üreterek etraflarına

salmaktadırlar. Kolonilerin etraflarına salınan bu stilbene, *M. luteus* gibi gram-pozitif bakteriler için inhibisyon zonu oluşturmaktadır. Simbiyotik bakteriler antimikrobiyal metabolitler üretmeleri sonucu diğer mikroorganizmaların üremelerini engelleyerek nematod ile enfekte kadvraların çürümelerini önlemektedir (Hu ve Webster, 2000)

3. Biyolojik Işıma (Biyoluminesens) aktivitesi

Photorhabdus luminescens subsp. *laumondii* 48-02 suşu yüksek biyoluminesens aktivitesi göstermiştir. *Photorhabdus* bakterileri tarafından gerçekleştirilen biyolojik ışımaya yalnızca durgunluk fazı gibi yüksek hücre yoğunluklarına ulaşıldığı zamanlarda gözlenmiştir (Daborn vd., 2001). *Photorhabdus*'un sekonder formları ise primer formlara göre 20 kat daha az biyolojik ışımaya aktivitesi göstermektedir (Joyce ve Clarke, 2003).

4. Boya alımı

Photorhabdus'ların primer formları çeşitli boya absorblayabilirken, sekonder formları absorblayamamaktadır (Boemare vd., 1993).

NBT agar

Photorhabdus'un primer formları NBTA ortamında bromothymol blue boyasını absorblarken tetrazolium chloride'i indirgemektedir (Akhurst, 1980). Koloniler 72 saat sonunda koyu kırmızı renkte görünürken, boyayı absorblayamayan koloniler ise sarı renkte görünmektedirler. *Photorhabdus* 48-02 suşuna ait koloniler NBTA ortamında kırmızı renkte gözükmektedir.

MacConkey agar

MacConkey agar laktoz, safra tuzları ve nötral kırmızı boya içermektedir. *Photorhabdus* bakterilerinin primer formları laktozu fermente ederek asit üretirler (Boemare vd., 1993) ve böylece düşük pH'da boyanın absorblanması sağlanır. Boyayı absorblayan koloniler kırmızı, absorblayamayan koloniler ise açık renkli görünmektedirler. *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşu bakteriler laktozu fermente ederek asit üretmiş ve ortamdaki boyayı absorblamıştır.

EMB (Eosin Methylene Blue Lactose) agar

Photorhabdus bakterilerinin primer formdaki kolonileri laktozu fermente ederek son ürün olarak asit üretirler (Boemare vd., 1993). Bu ortamın düşük pH'ı boya alımını sağlamaktadır. Koloniler boyanın yapısından dolayı metalik parlaklıkla kırmızı-siyah renkte görünmektedir. Laktoz fermentasyonu yokluğunda asit üretilmez ise koloniler açık renkli olarak belirmektedir. *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşunun EMB agar besi yerinde üreyemediği gözlenmiştir. Bunun sebebi olarak besi ortamında yer alan boyaların bakteri hücrelerine toksik etki yaptığı düşünülmektedir.

5. Lipaz aktivitesi

Lipazlar *Photorhabdus* bakterilerinin durgunluk fazında üretilmektedir ve primer formlar sekonder formlara göre daha fazla lipolitik aktivite göstermektedir (Boemare vd., 1993). *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşunun Tween 80'e karşı lipolitik aktivitesinin olmadığı belirlenmiştir.

6. Proteaz aktivitesi

Photorhabdus bakterilerinin sekonder formlarının primer formlara göre daha fazla proteaz aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir (Forst ve Nealson, 1996). Proteaz agarın bulanık bir görüntüsü vardır ancak *Photorhabdus*'ların proteaz aktivitesiyle koloniler etrafında temiz zonlar belirler. *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşunun proteaz agarda yer alan skim milke karşı proteaz aktivitesinin olduğu gözlenmiştir.

7. Siderophore üretimi

Siderophore üretimi, CAS ilave edilmiş LB agar kullanılarak ölçülmüştür (Watson vd., 2005). CAS'da bulunan boya (chrome azurol sulphate) besi yerinde demir ile bağ yaparak koyu yeşil renkte görünmektedir. Bakteri kolonileri siderophore ürettiklerinde demir alımını sağlar ve koloni etrafındaki besi yerinin rengi sarı-turuncu renge dönüşür. Bu yüzden kolonilerin etrafındaki sarı halka demirin bakteri tarafından alındığını ve halkanın boyutu da bakteri tarafından üretilen siderophore miktarını göstermektedir. *Photorhabdus luminescens* subsp.

laumondii 48-02 suşunun siderophore üreterek besi yerindeki demiri bağlayabildiği gözlenmiştir.

8. Hareketlilik

Photorhabdus luminescens subsp. *laumondii* 48-02 suşunun motility agar kullanılarak yüzme hareketliliği saptanmıştır. *Photorhabdus* bakterilerinin sekonder formları flagellaları olmadığı için hareketli değildir (Boemare ve Akhurst, 2006).

Photorhabdus bakterileri, Coleoptera, Lepidoptera ve Dictyoptera takımlarının özellikle larva dönemlerine karşı oldukça virulanttır (Bowen vd., 1998). Böceğin nematod ile enfekte olmasını takiben salınan bakterilerin, böcek hemosölünde katlanarak çoğalması sonucu bakteri hücresi yoğunluğu 48 saat içinde 10^9 koloni oluşturabilen birim/böceğe ulaşabilir (Watson vd., 2005). Bennett ve Clarke (2005) *Photorhabdus* bakterilerinin 5'den az koloni oluşturabilen biriminin (cfu) böcek hemosölüne enjekte edilmesinin böceği öldürmeye yetecek doz olduğunu saptamışlardır. Kanost vd., (2004) 10^8 cfu *E. coli* hücresinin böcek hemosölüne enjekte edilmesi sonucu böceğin enfekte olmadığını, ayrıca böceğin bağışıklık sisteminin enjekte edilen bakterileri saatler içerisinde ortadan kaldırdığını göstermişlerdir. *Photorhabdus* bakterileri, LB broth besi yerinde olduğu gibi böcek hemosölünde de katlanarak hızlı bir şekilde çoğalmaktadır ve bakterinin çoğalma hızı ile LT_{50} değeri yani enfekte edilen böceklerin %50'sini öldürme zamanı arasında pozitif bir ilişki vardır (Daborn vd., 2001; Watson vd., 2005).

Tez çalışması kapsamında yapılan patojenite testlerinde *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 ve TT01 suşlarının benzer büyüme eğrilerine sahip olmalarına rağmen 48-02 suşlarının LT_{50} değerinin daha düşük ölçülmesinin sebebi olarak ürettiği toksinlerin testlerde kullanılan *G.mellonella* larvalarını öldürmede daha etkili ve hızlı olduğu tespit edilmiştir.

Photorhabdus luminescens subsp. *laumondii* 48-02 suşunun 3 farklı koloni tipine sahip olduğu tespit edilmiştir. Somvanshi vd., (2010) *Photorhabdus* genomunda Aç/Kapa şeklinde çalışan *madswitch* adlı düzenleyici bölgenin *mad* (maternal adhesion defective) gen bölgelerini kontrol etmesi sonucu koloni varyasyonları oluştuğunu bildirmiştir. *mad* gen bölgelerinde meydana gelen mutasyon sonucu

Photorhabdus'ların infektif juvenillerde kolonize oluşunda sorunlar oluştuğu bildirilmiştir (Somvanshi vd., 2010). Bu yüzden *mad* gen bölgeleri simbiyozisde önemli bir rol oynamaktadır.

Api 20E kiti kullanılarak yapılan biyokimyasal testler sonucunda *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 ve TT01 suşlarının karşılaştırılması sonucu glukoz, inositol ve sorbitol karbonhidratlarının kullanımında farklılıklar tespit edilmiştir. Bu farklılık TT01 suşunun yıllardır laboratuvarında stok kültür olarak saklanması sonucu bazı enzim aktivitelerindeki düşüşten kaynaklı olabileceği düşünülmektedir (Blazevic vd., 1979).

Yürütülen *in vivo* ve *in vitro* çaprazlama testi çalışmaları *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşunun TT01 suşundan daha baskın olduğunu ortaya koymuştur. Bashey vd., (2012) yürüttükleri çalışmalar sonucunda bakteriyal simbiyontların aynı ortamda bulunan diğer rekabetçi simbiyontları elemine etmek amacıyla bakteriyosinler ürettiğini saptamıştır. Bu tez çalışmasında *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşunun bakteriyosinler üreterek *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* TT01 suşunu rekabet ortamından uzaklaştırdığı belirlenmiştir.

Tez çalışmaları kapsamında yürütülen konukçu dağılımı çalışmalarından elde edilen verilere göre *Heterorhabditis bacteriophora* 48-02 izolatuvar ortamında *Spodoptera littoralis*'e karşı %100 ölüm sağlamıştır. Gillespie vd., (1997) böceklerin iyi gelişmiş bir bağışıklık sistemine sahip olduğunu ve enfeksiyonlardan fagositozis, enkapsülasyon, antimikrobiyal peptitlerin sentezlenmesi gibi mekanizmalarla korunduğunu bildirmiştir. 48-02 izolatının *Anomala* sp. ve *Curculio elephas*'a karşı etkinliğini kısıtlayan faktörlerin bu mekanizmalardan bir ya da birkaçının kullanılmasının olduğu düşünülmektedir.

Yürütülen bu tez çalışması sonucunda *Heterorhabditis bacteriophora* ile enfekte kadavraların renginin her zaman kırmızı renkte gözlenmediği ve konukçu dokusunun sakızimsı bir hal almadığı anlaşılmıştır. Ayrıca izole edilen *P. luminescens* subsp. *laumondii* 48-02 suşunun kırmızı pigment üretmeyen ve oldukça virulent yabancı tip bir bakteri suşu olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Adams, B. J., Burnell, A. M. and Powers T. O. 1998. A phylogenetic analysis of *Heterorhabditis* (Nemata: Rhabditidae) based on internal transcribed spacer 1 DNA sequence data. **Journal of Nematology**, 30: 22-39.
- Akhurst, R. J. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp. bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. **Journal of General Microbiology**, 121, 303–309.
- Bashey F., Young S. K., Hawlena H. and Lively C. M. 2012. Spiteful interactions between sympatric natural isolates of *Xenorhabdus bovienii* benefit kin and reduce virulence. **Journal of Evolutionary Biology**, 25: 431-437. DOI: 10.1111/j.1420-9101.2011.02441.x
- Bedding, R. A. and Akhurst, R. J. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic Rhabditid nematodes in soil. **Nematologica**, 21: 109-110.
- Bennett, H. P. and Clarke, D. J. 2005. 'The pbgPE operon in *Photorhabdus luminescens* is required for pathogenicity and symbiosis'. **Journal of Bacteriology**, 187 (1): 77-84.
- Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey, J. R., Liu, L. X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J. R., Mackey, L. Y., Dorris, M. L., Frisse, M. J., Vida, T and Kelley, W. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature**, 392: 71-75.
- Blazevic, D. J., Mackay, D. L. and Warwood, N. M. 1979. Comparison of Micro-ID and API 20E systems for identification of Enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology**, 9: 605-608.
- Boemare N. E., Akhurst R. J., 1988. Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). **Journal of General Microbiology**, 134: 751–6.
- Boemare, N. E., Akhurst, R. J. and Mourant, R. G. 1993. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 43: 249-255.

- Boemare, N. E., Laumond, C. and Mauleon, H., 1996. The entomopathogenic nematode-bacterium complex: Biology, life cycle and vertebrate safety. **Biocontrol Science and Technology**, 6: 333-346.
- Boemare, N., Thaler, J.O. and Lanois, A. 1997. Simple bacteriological tests for phenotypic characterization of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* phase variants. **Symbiosis**, 22: 167-175.
- Boemare, N., 2002. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 35–56.
- Boemare, N. E. and Akhurst, R. J. 2006. The genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*. Chapter 3.3.16, **Prokaryotes**, 6: 451-494.
- Bowen, D., Rocheleau, T.A., Blackburn, M., Andreev, O., Golubeva, E., Bhartia, R. and ffrench-Constant R.H. 1998. Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Science**, 280: 2129-2132.
- Burnell, A. M. and Stock, S. P. 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts-lethal pathogens of insects. **Nematology**, 2(1): 31-42.
- Chen, Z. X., Chen, S. Y. and Dickson, D. W. 2004. Nematology- Advances and Perspectives Volume I: Nematode Morphology, Physiology and Ecology. Tsinghua University Press Beijing, China. 636p.
- Ciche, T. A., K. S. Kim, B. Kaufmann-Daszczuk, K. C. Nguyen, D. H. Hall., 2008. Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. **Applied and Environmental Microbiology**, 74: 2275-2287.
- Crow, W.T. 2002. Using Nematodes to Control Insects: Overview and Frequently Asked Questions. University of Florida. **Extension on Institute of Food and Agricultural Sciences**, 1-6.
- Daborn, P. J., Waterfield, N., Blight, M. A. and ffrench-Constant, R. H. 2001. Measuring virulence factor expression by the pathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* in culture and during infection. **Journal of Bacteriology**, 183: 5834–5839.

- Duchaud, E., Rusniok, C., Franqeul, L., Buchrieser, C., Givaudan, A., Taourit, S., Bocs, S., Boursaux-Eude, C., Chandler, M., Charles, J. F., Dassa, E., Derose, R., Derzelle, S., Freyssinet, G., Gaudriault, S., Medique, C., Lanois, A., Powell, K., Siquier, P., Vincent, R., Wingate, V., Zouine, M., Glaser, P., Boemare, N., Danchin, A. and Kunst, F. 2003. **Nature Biotechnology**, 21(11): 1307-1313.
- Easom C. A. and Clarke, D. J. 2008. Motility is required for the competitive fitness of entomopathogenic *Photorhabdus luminescens* during insect infection. **Microbiology**, 8: 168.
- Forst, S. and Nelson, K. 1996. Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. **Microbiological Reviews**, 60: 21-43.
- Forst S., Dowds B., Boemare N., Stackebrandt E., 1997. *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp.: Bugs that kill bugs. **Annual Review of Microbiology**, 51: 47-72.
- Gaugler, R. and Kaya, H. K., 1990. Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- Gaugler, R. and Han, R., 2002 .Production Technology. In: Entomopathogenic Nematology. (Gaugler, R. ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK. pp 289-310.
- Gillespie, J. P., Kanost, M. R. and Tenczek, T. 1997. Biological mediators of insect immunity. **Annual Review Entomology**, 42: 611–643.
- Goodrich-Blair, H. and Clarke, D. J. (2007) Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. **Cellular Microbiology**, 64:260–268.
- Grewal, P.S., Gaugler, R., Kaya, H.K and Wusaty, M. 1993. Infectivity of the entomopathogenic nematode *Steinernema scapterisci* (Nematode: Steinernematidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, 62: 22-28.
- Grewal, P. S., Selvan, S. and Gaugler, R. 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment and reproduction. **Journal of Thermal Biology**, 19: 245-253.
- Grewal, P. S., 2002. Formulation and Application Technology. In: Entomopathogenic Nematology. In: Entomopathogenic Nematology. (Gaugler, R. ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK. pp 265-287.

- Griffin, C. T., Chaerani, R., Fallen, D., Reid, A. P. and Downes, M. J. 2000. Occurrence and distribution of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis indica* in Indonesia. **Journal of Helminthology**, 74: 143-150.
- Griffin, C. T., Boemare, N. E., Lewis, E. E., 2005. Biology and behaviour. In: Grewal, P.S., Ehlers, R.-U., Shapiro-Ilan, D.I. (Eds.), Nematodes as Biocontrol Agents. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 47–64.
- Gulcu, B., Hazir, S., 2012. An alternative storage method for entomopathogenic nematodes. **Turkish Journal of Zoology**, 36 (4): 562-565.
- Han, R. C., and Ehlers, R. U. (2000). Pathogenicity, development, and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic *in vivo* conditions. **Journal of Invertebrate Pathology**, 75, 55–58.
- Hazir S. ,Türkiye’deki Entomopatojen Nematodlar (Steinernematidae ve Heterorhabditidae) Üzerine Faunistik Çalışmalar ,Biyoloji ,Fen ,Hacettepe ,Ankara ,Türkiye ,2002 .
- Hazir, S., Keskin, N., Stock, S. P., Kaya, H. K. and Özcan, S., 2003. Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Turkey. **Biodiversity and Conservation**, 12; 375-386.
- Hazir, S., Stackebrandt, E., Lang, E., Ehlers, R. U. and Keskin, N. 2004. Two new subspecies of *Photorhabdus luminescens*, isolated from *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae): *Photorhabdus luminescens* subsp. *kayaii* subsp. nov. and *Photorhabdus luminescens* subsp. *thraciaensis* subsp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, 27: 36-42.
- Hominick, W. M., Reid, A. P., Bohan, D. A., Briscoe, B. R. 1996. Entomopathogenic nematodes- biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. **Biocontrol Science and Technology**, 6: 317-331.
- Hominick, W. M., Briscoe, B. R., del-Pino, F. G., Heng, J., Hunt, D. J., Kozodoy, E., Mracek, Z., Nguyen, K. B., Reid, A. P., Spiridonov, S., Stock, S. P., Sturhan, D., Waturu, C. and Yoshida, M. 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions. **Journal of Helminthology**, 71: 271-298.

- Hu, K. and Webster, J. M. 2000. Antibiotic production in relation to bacterial growth and nematode development in *Photorhabdus-Heterorhabditis* infected *Galleria mellonella* larvae. **FEMS Microbiology Letters**, 189: 219-223.
- Huelsenbeck J. P., Ronquist F., Nielsen R. and Bollback J.P. (2001) Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Science**, 294: 2310–2314.
- Joyce, S. A. and Clarke, D. J. 2003. A hexA homologue from *Photorhabdus* regulates pathogenicity, symbiosis and phenotypic variation. **Molecular Microbiology**, 47(5): 1445-1457.
- Kanost, M. R., Jiang, H. and Yu, X. Q. 2004. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. **Immunology Reviews**, 198: 97–105.
- Karagoz, M., Gulcu, B., Hazir, S. And Kaya H. K. 2009. Laboratory evaluation of Turkish entomopathogenic nematodes for suppression of the chestnut pests, *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae) and *Cydia splendana* (Lepidoptera: Tortricidae). **Biocontrol Science and Technology**, 19 (7): 755-768.
- Kaya, H. K., 1993. Nematodes, nematomorphs, and platyhelminthes. In: Insect Pathology (Kaya, H. K. ed.), pp. 459-483.
- Kaya, H. K. and Gaugler, R., 1993. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, 38: 181–206.
- Kaya, H. K. and Stock, S. P., 1997. Techniques in insect nematology. In: Manual of Techniques in Insect Pathology (Lacey L. ed.). Academic Press, San Diego, CA. pp. 281-324.
- Kaya, H.K., 2002. Natural enemies and other antagonists. In: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 189–202.
- Koppenhöfer, A. M., 2000. Nematodes. In: Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (L. A. Lacey and H. K. Kaya, eds) Dordrecht, The Netherlands: Kluwer. pp. 283-301.
- Koppenhöfer, A. M., 2007. Nematodes. In: Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Lacey, L. A. and Kaya, H. K., eds). Springer, Germany. pp 249-264.

- Lewis, E. E., Clarke, D. J., 2012. Nematode parasites and entomopathogens. In: Vega, F.E., Kaya, H.K. (Eds.), *Insect Pathology*, 2nd ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 395–424.
- Liu, J., Berry, R. E., and Moldenke, A. F., 1997. Phylogenetic relationships of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) inferred from partial 18S rRNA gene sequences. **Journal of Invertebrate Pathology**, 69: 246-252.
- Liu, J., Poinar, G. O. and Berry, R. E. 2000. Control of insect pest with entomopathogenic nematodes: The impact of molecular biology and phylogenetic reconstruction. **Annual Review Entomology**, 45: 287-306.
- Maddison W.P. and Maddison D.R. 2009. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.6. <http://mesquiteproject.org>. Accessed 5 May 2009
- Maggenti, A. 1981. *General nematology*. Springer-Verlag, 372p., New York.
- Malan, A. P., Knoetze, R. and Tiedt, L. 2012. *Heterorhabditis noenieputensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. **Journal of Helminthology**, <http://dx.doi.org/10.1017/S0022149X12000806>.
- Mamiya, Y. and Ogura, N. 1989. Search for Steinernematidae and Heterorhabditidae in some locality. **Annual Meeting Japan Society Applied Entomology**, Zoology, 49.
- Martens, E. C., Goodrich-Blair, H., 2005. The *Steinernema carpocapsae* intestinal vesicle contains a subcellular structure with which *Xenorhabdus nematophila* associates during colonization initiation. **Cellular Microbiology**, 7: 1723–1735.
- Mracek, Z. and Becvar, S. 2000. Insect aggregations and entomopathogenic nematode occurrence. **Nematology**, 2: 297-301.
- Mracek, Z., Qi-zhi, L and Nguyen, K. B. 2009. *Steinernema xueshanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematode from the province of Yunnan, southeast Tibetan Mts., China. **Journal of Invertebrate Pathology**, 102: 69-78.
- Nguyen, K. B., Puza, V., Mracek, Z. 2008. *Steinernema cholashanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae) a new species of entomopathogenic nematode from the province of Sichuan, Chola Shan Mountains, China. **Journal of Invertebrate Pathology**, 97: 251-264.

- Nguyen, K. B., M. Ambros Ginarte, C., G. Leite, L., M. dos Santos, J. and Harakava, R. 2010. *Steinernema brazilense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Mato Grosso, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, 103: 8-20.
- Nylander JAA (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Orozco, R. A., Hill, T. and Stock, S.P. 2013. Characterization and Phylogenetic Relationships of *Photorhabdus luminescens* subsp. *sonorensis* (γ -Proteobacteria: Enterobacteriaceae), the Bacterial Symbiont of the Entomopathogenic Nematode *Heterorhabditis sonorensis* (Nematoda: Heterorhabditidae), **Current Microbiology**, 66(1) : 30-39.
- Parkman, J.P and Smart, G.C.Jr. 1996. Entomopathogenic nematodes, a case study: introduction of *Steinernema scapterisci* in Florida. **Biocontrol Science and Technology**, 6: 423-429.
- Plichta, K.L., Joyce, S.A., Clarke, D., Waterfield, N. And Stock, S.P. 2009. *Heterorhabditis gerrardi* n. sp. (Nematoda:Heterorhabditidae): the hidden host of *Photorhabdus asymbiotica* (Enterobacteriaceae: γ Proteobacteria). **Journal of Helminthology**, 83: 309-320.
- Poinar Jr., G. O., 1990. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. (Gaugler, R., Kaya, H.K. Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 23–62.
- Poinar Jr., G. O., 1993. Origins and phylogenetic relationships of the entomophilic rhabditids, *Heterorhabditis* and *Steinernema*. **Fundamental and Applied Nematology**, 16: 333-338.
- Seinhorst, J. W. 1959. A rapid method for the transfer of nematode from fixative to anhydrous glycerine. **Nematropica**, 25: 143-148.
- Sergeant, M., Baxter, L., Jarrett, P., Shaw, E., Ousley, M., Winstanley, C. and Morgan, J. A. W. 2006. Identification, typing, and insecticidal activity of *Xenorhabdus* isolates from entomopathogenic nematodes in United Kingdom soil and characterization of the xpt toxin loci. **Applied Environment Microbiology**, 72: 5895–5907.
- Shapiro-Ilan, D. I., Duncan, L. W., Lacey, L. A. And Han, R., 2005. Orchard Applications. In: Nematodes as Biocontrol Agents (Grewal P. S., Ehlers R-U., Shapiro-Ian D. I. eds.). CABI International. Wallingford, UK. pp 215-230.

- Shapiro-Ilan, D., E. Lewis, E., F. Campbell, J. and B. Kim-Shapiro, D. 2012. Directional movement of entomopathogenic nematodes in response to electrical field: effects of species, magnitude of voltage, and infective juvenile age. **Journal of Invertebrate Pathology**, 109: 34-40.
- Somvanshi, V. S., Kaufmann-Daszczuk, B., Kim, K., Mallon, S. and Ciche, T. A. 2010. *Photorhabdus* phase variants express a novel fimbrial locus, mad, essential for symbiosis. **Molecular Microbiology**, 77(4): 1021–1038.
- Stock, S. P., Pryor, B. M. and Kaya, H. K. 1999. Distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in natural habitats in California, USA. **Biodiversity and Conservation**, 8: 535-549.
- Stock, S. P., Campbell, J. F. and Nadler, S. A. 2001. Phylogeny of *Steinernema travassos*, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. **Journal of Parasitology**, 87: 877-889.
- Stock, S. P., Griffin, C. T., and Chaerani, R., 2004. Morphological and molecular characterisation of *Steinernema hermaphroditum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Indonesia, and its phylogenetic relationships with other members of the genus. **Nematology**, 6: 401-412.
- Stock, S.P and Hunt, D.J. 2005. Morphology and Systematics of Nematodes Used in Biocontrol. In: Grewal, P. S., Ehlers, R. U., Shapiro-Ilan, D. I. Nematodes as Biocontrol Agents. CABI Publishing, 3-43.
- Stock, S.P. and Goodrich-Blair, H. 2012. Invertebrate parasitic and pathogenic nematodes. In: Manual of Techniques in Insect Pathology Secon Edition (Lacey L. ed.). Academic Press, San Diego, CA. pp. 373-426.
- Swofford, D.L. (2002) PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates.
- Szalanski, A. L., Taylor, D. B. and Mullin, P. G. 2000. Assessing nuclear and mitochondrial DNA sequence variation within *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae). **Journal of Nematology**, 32: 229-233.

- Tailliez, P., Laroui, C., Ginibre, N., Paule, A., Pages, S. and Boemare, N. 2010. Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein-coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. Proposal of new taxa: *X. vietnamensis* sp. nov., *P. luminescens* subsp. *caribbeanensis* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *hainanensis* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *khanii* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* subsp. nov., and the reclassification of *P. luminescens* subsp. *thracensis* as *P. temperata* subsp. *thracensis* comb. nov.. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 60: 1921–1937.
- Tanada, Y. and Kaya, H.K. 1993. Insect Pathology. CA, Academic Press 666p., San Diego.
- Thomas G. M., Poinar Jr. G. O., 1979. *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 29: 352–60.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. And Higgins D.G. 1997. The clustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, 24: 4876–4882
- Viglierchio, D.R. 1991. The World of Nematodes. University of California, Davis. 266pp. Sacramento, USA.
- Volgyi, A., Fodor, A., Szentirmai, A. and Forst, S. 1998. Phase variation in *Xenorhabdus nematophilus*. **Applied Environment Microbiology**, 64: 1188-1193.
- Wang, J. X. and Bedding, R. A. 1996. Population development of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* in the larvae of *Galleria mellonella*. **Fundamental and Applied Nematology**, 19: 363-367.

- Watson, R. J., Joyce, S. A., Spencer, G. V. and Clarke, D. J. 2005. The *exbD* gene of *Photorhabdus temperata* is required for full virulence in insects and symbiosis with the nematode *Heterorhabditis*. **Molecular Microbiology**, 56: 763-773.
- White, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from culture. **Science**, 66: 302-303.
- Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K. H., Ludwig, W., Glöckner, F. O. and Rosselló-Móra, R. 2008. The all-species living tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. **Systematic Applied Microbiology**, 31: 241–250.
- Yoshida, M., Reid, A. P., Briscoe, B. R. and Hominick, W.M. 1998. Survey of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Japan. **Fundamental Applied Nematology**, 21: 185-198.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Harun ÇİMEN
Doğum Yeri ve Tarihi : Dinar/AFYON, 09.10.1989

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat
Fakültesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat
Fakültesi Biyoloji Bölümü
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar

-Poster sunumları

1) Barış Gülcü, Mehmet Karagöz and **Harun Çimen**. Biological Control of Native Entomopathogenic Nematodes on *Spodoptera* sp. (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae in Turf area in Turkey. III International Entomopathogens and Microbial Control Symposium, **2011**. Şile, **İstanbul**.

-Sözlü sunumlar

1) **Harun Çimen**, S. Patricia Stock, David J. Clarke, Selçuk Hazır. A novel EPN strain from Turkey with misleading signs of infection. 31st International Symposium of The European Society of Nematologists, **2012**. **Adana**.

b) Katıldığı projeler

1) “Fethiye ve Çalış Özel Çevre Koruma Bölgelerinde Yuvalayan Deniz Kaplumbağalarının İzlenmesi”. Destekleyen Kuruluş: Özel Çevre Koruma Daire Başkanlığı. 2007 Yaz Dönemi. **Fethiye, MUĞLA**

- 2) “Patara Özel Çevre Koruma Bölgelerinde Yuvalayan Deniz Kaplumbağalarının İzlenmesi”. Destekleyen Kuruluş: Özel Çevre Koruma Daire Başkanlığı. 2010 Yaz Dönemi. **Patara, ANTALYA**
- 3) “Örtüaltı sebze yetiştiriciliğinde sorun olan kök-ur nematodları (*Meloidogyne* spp.)’na karşı alternatif mücadele olanaklarının araştırılması” Destekleyen Kuruluş: TÜBİTAK, Araştırmacı, (2012-2014).

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl :

- 1) Koppert Biyolojik Mücadele ve Polinasyon Sistemleri, (2013-...).

İLETİŞİM

E-posta Adresi : haruncimenn@gmail.com

Tarih : 17.07.2013