

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİMDALI
2014-YL-029

ENTOMOPATOJEN NEMATODLARIN
(STEINERNEMATIDAE VE HETERORHABDITIDAE)
TİRE İLÇESİ (İZMİR) TOPRAKLARINDAKİ TÜR
ÇEŞİTLİLİĞİ VE DAĞILIMLARININ BELİRLENMESİ

Ayşe ARİ

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Mehmet KARAGÖZ

AYDIN

T.C.
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.

.../.../2014

Ayşe ARİ

ÖZET

ENTOMOPATOJEN NEMATODLARIN (STEINERNEMATIDAE VE HETERORHABDITIDAE) TİRE İLÇESİ (İZMİR) TOPRAKLARINDAKİ TÜR ÇEŞİTLİLİĞİ VE DAĞILIMLARININ BELİRLENMESİ

Ayşe ARİ

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mehmet KARAGÖZ

2014, 49 sayfa

Bu çalışma, tarımın yoğun olarak yapıldığı İzmir'in Tire ilçesi ve buraya bağlı bölgelerdeki topraklarda bulunan biyolojik mücadele ajanı entomopatojen nematodların çeşitliliği ve dağılımlarını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Çalışma kapsamında toplam 620 toprak örneği alınmış ve bunların üç tanesinden entomopatojen nematod izole edilmiştir. Elde edilen nematod izolatlarının tür teşhis işlemlerinde morfometrik ölçüm yöntemleri ve moleküler teknikler bir arada kullanılmış ayrıca izolatlar arasında *in vivo* çiftleştirme testleri de yapılmıştır. Her bir nematod izolatının ilişkili olduğu mutualistik bakteriler izole edilip moleküler teknikler kullanılarak tür tanımlamaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar izole edilen her üç nematod izolatının *Steinernema feltiae*, bunlarla ilişkili olan bakterilerin ise *Xenorhabdus bovienii* türüne ait olduğunu göstermiştir. Çiftleştirme testleri sonucunda her üç izolat arasında üreme görülmüş ve bunların aynı türe ait farklı populasyonlar olduğu kesin olarak anlaşılmıştır. Elde edilen bu izolatlar ile gerçekleştirilen konukçu dağılım çalışmalarında nematodların *Spodoptera ciliium* ve *Tenebrio molitor* larvalarına karşı oldukça yüksek enfektivite gösterdikleri (%100), ancak *Curculio elephas* (%20-30) ve *Polyphylla fullo* (%10) larvalarına karşı fazla etkili olmadıkları belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Entomopatojen nematodlar, biyolojik mücadele, *Steinernema*, *Heterorhabditis*, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*.

ABSTRACT

DIVERSITY AND DISTRIBUTION OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES (STEINERNEMATIDAE AND HETERORHABDITIDAE) IN THE SOIL OF TIRE DISTRICT (IZMIR)

Ayşe ARI

M.Sc.Thesis, Department of Plant Protection

Advisor: Associate Prof. Dr. Mehmet KARAGÖZ

2014,49 pages

This study was conducted to determine diversity and distribution of biological control agents, entomopathogenic nematodes in the soil of Tire district, İzmir. Totally 620 soil samples were collected and three of them were pozitiv for entomopathogenic nematodes. Based on *in vivo* cross-breeding tests, morphometric and molecular data, the all nematode isolates were identified as *Steinernema feltiae*. The mutualistic bacteri associated with three isolates was identified as *Xenorhabdus bovienii*. As a result of *in vivo* cross-breeding tests, all isolates produced progeny.

In the host range studies, all nematode isolates showed 100% larval mortality against *Spodoptera ciliun* and *Tenebrio molitor*. However, *Curculio elephas* and *Polyphylla fullo* larvae were notably resistant to nematode infections with 20-30% and 10% mortality, respectively.

Key words: Entomopathogenic nematodes, biological control, *Steinernema*, *Heterorhabditis*, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan, eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen, tez danışman hocam Doç. Dr. Mehmet KARAGÖZ'e,

Tezin her aşamasında büyük yardımlarını gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümünden hocam Prof. Dr. Selçuk HAZIR'a

Laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Arş. Gör. Derya AŞICI'ya, ADÜ doktora öğrencisi Harun ÇİMEN'e, ADÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Arife GÜMÜŞ'e, Giresun Üniversitesi yüksek lisans öğrencisi Şebnem Hazal GÜLSEN'e ve laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan, haklarımı ödeyemeyeceğim ve tezimde çok büyük katkısı olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. Entomopatojen Nematodlar.....	1
1.1.1. Entomopatojen Nematodların Avantajları.....	3
1.1.2. Entomopatojen Nematodların Dezavantajları	4
1.1.3 Entomopatojen Nematodların Konukçu Dağılımı ve Bunu Etkileyen Faktörler.....	4
2. KAYNAK ÖZETLERİ	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM	12
3.1. Konukçu Olarak Kullanılan Galleria mellonella Larvalarının Üretilmesi	12
3.2. Toprak Örneklerinin Alınması	12
3.3. Entomopatojen Nematodların Topraktan İzolasyonu.....	12
3.4. Steinernematid ve Heterorhabditid'lerin Tür Teşhislerinin Yapılması	14
3.4.1. Morfometrik Yöntem	14
3.4.2. Moleküler Yöntem	16
3.4.3. Simbiyotik Bakterilerin İzole Edilmesi ve Tanımlanması	19
3.5. Konukçu Dağılım Çalışmaları.....	23
3.6. Elde Edilen Nematodların Hermafrodit Olup Olmadıklarının Belirlenmesi ...	24
3.7. Çiftleştirme Testleri	25

4. BULGULAR	27
4.1. Entomopatojen Nematodların Tire ve Çevresindeki Dağılımları ve Çeşitlilikleri.....	27
4.2. Simbiyotik Bakterilerin İzole Edilmesi ve Tanımlanması	33
4.3. Konukçu Dağılım Çalışmaları	33
4.4. Elde Edilen Nematodların Hermafrodit Olup Olmadıklarının Belirlenmesi ..	34
4.5. Çiftleştirme Testleri.....	34
5.TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	35
6. KAYNAKLAR.....	38
ÖZGEÇMİŞ.....	49

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 3.1. Toprak örneklerinin entomopatojen nematod elde etmek için düzeneklere alınması.....	13
Şekil 3.2. Morfometrik ölçümlerde kullanılmak üzere nematod kalıcı preparatlarının hazırlanması.....	15
Şekil 3.3. Görüntülü ve ölçüm modüllü mikroskopta morfometrik ölçümlerin yapılması.....	16
Şekil 3.4. <i>Curculio elephas</i> , <i>Spodoptera. cilium</i> ve <i>Tenebrio molitor</i> larvalarıyla konukçu dağılım çalışmalarının yapılması.....	24
Şekil 3.5. <i>Polyphylla fullo</i> larvalarıyla konukçu dağılım çalışmalarının yapılması.....	24
Şekil 3.6. İnfektif juvenil evre nematodların tek tek doku kültür gözeneklerine yerleştirilmesi.....	25
Şekil 4.1. Morfometrik ölçümlerde kullanılan TR-179 numaralı izolata ait infektif juvenil evre nematod.....	32
Şekil 4.2. Morfometrik ölçümlerde kullanılan TR-179 numaralı izolata ait bir erkek nematod.....	32
Şekil 4.3. Erkek nematodun kuyruk yapısı (izolat TR-179).....	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Çalışma kapsamında toprak örnekleri alınan yerler, örnek sayıları ve pozitif örneklerin GPS koordinatları.....	27
Çizelge 4.2. <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (izolat 48-02)'nin morfometrik ölçüm (μm) sonuçları.....	30

1. GİRİŞ

1960'lı yıllarda kimyasal pestisitlerin çevre, insan ve hayvan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinin saptanmasıyla kimyasal temelli böcek mücadelesine alternatif olabilecek yöntemlerin araştırılmasına başlanmıştır. Bu konuda üzerinde en fazla durulan alan Entegre Mücadele (IPM) olmuştur (Gaugler vd., 1997).

Biyolojik mücadele, zararlı popülasyonunun baskılanmasında, yoğunluğunun ve hasar seviyesinin azaltılmasında parazitoid, predatör, patojen, antagonist veya rekabetçi popülasyonların kullanılmasıdır (Waterhouse ve Norris, 1987). Bu nedenle biyolojik mücadele, entegre zararlı mücadelesinin temelini oluşturmaktadır (Gaugler vd., 1997).

Toprak ekosistemi içinde çok sayıda böcek türünün doğal düşmanı olan ve böcek popülasyonlarını düzenleyici role sahip olan nematodlara "Entomopatojen Nematodlar" adı verilmektedir. Bu nematodların belirli habitatlarda, biyolojik kontrol ajanı olarak uygulanmaları zararlı böcek türlerinin etkili ve güvenilir kontrolünü sağlamaktadır (Adams ve Nguyen, 2002).

1.1. Entomopatojen Nematodlar

Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarına ait olan nematodlar geniş bir konukçu dağılımına sahiptirler. Ayrıca kitlesel olarak *in vivo* ve *in vitro* yöntemlerle üretilebiliyor olmaları, sadece böceklere özelleşmiş olmaları, çevre ve insan sağlığı açısından herhangi bir tehdit oluşturmamaları nedeniyle bu grup nematodlara güvenilir biyolojik mücadele ajanı sıfatı verilmiştir (Gaugler ve Kaya, 1990; Koppenhöfer, 2000). Günümüzde entomopatojen nematodlar ticari olarak üretilen bir ürün haline gelmiş olup yaban mersini, enginar, mantar, elma, şeftali yetiştirme alanlarında, çim ekili yerlerde, süs bitkilerinde, diğer bahçe ve tarım ürünlerinde zararlı böceklere karşı kullanılmaktadır (Stock, 2005).

Pek çok nematod türü benzer ve basit bir yaşam döngüsüne sahip olup gelişimleri boyunca yumurta, juvenil (J1, J2, J3, J4) ve ergin olmak üzere 6 evre geçirirler (Kaya, 1993). Entomopatojen nematodların toprakta serbest olarak yaşayan evresi 3. juvenil (J3) evresidir ve bu evre "infektif juvenil" (IJ) evre olarak adlandırılır. Nematodlar bu evredeyken beslenmez ve gelişmezler (Kaya ve Gaugler, 1993). İnfektif juveniller toprak içerisinde uygun bir konukçu bulunca, böceğin doğal

açıklıklarını kullanarak (ağız, anüs ve spirakıl) veya bazı durumlarda doğrudan kütiküladan (genellikle *Heterorhabditis* cinsinde) böceğin hemoseli içerisine girerler. *Steinernema* cinsine ait olan nematodlar *Xenorhabdus* spp., *Heterorhabditis* cinsine ait olan nematodlar ise *Photorhabdus* spp. cinsi bakterilerle mutualistik ilişkilidirler. Bu bakteriler *Steinernema* cinsine ait türlerde infektif juvenillerin bağırsaklarının ön kısmındaki özel bir kesede (Bird ve Akhurst, 1983), *Heterorhabditis* cinsine ait türlerde ise bağırsağın özellikle ilk 1/3'lük kısmında yoğun olarak taşınmaktadır (Boemare vd., 1996). İnfektif juveniller konukçu hemoseline ulaştınca kapalı olan ağzlarını açarlar ve taşıdıkları bakterileri konukçunun hemoseli içerisine bırakırlar. Böceğin hemosolü içerisine salınan bakteriler burada hızla çoğalmaya başlar ve bu esnada salgıladıkları hücre dışı enzimler ve toksinler ile konukçunun 48 saat içerisinde septisemia'dan ölmesine neden olurlar (Hazır vd., 2003). Bakteriler tarafından salgılanan enzimler böcek dokularını parçalayarak nematodların beslenmesi ve gelişmesi için uygun forma dönüştürürler. Nematodlar hem parçalanıp çorba kıvamına gelen böcek dokuları hem de çoğalan mutualistik bakterilerle beslenmeye başlarlar. Beslenerek gelişmeye başlayan infektif juveniller önce 4. juvenil (J4) evreye, ardından da ergin dişi ve erkek bireylere dönüşürler. Erkeklerle çiftleşen dişiler döllenmiş yumurtaları taşırlar ve genellikle yumurta içerisinde 1. juvenil evreden (J1) 2. juvenil evreye (J2) geçerler. Daha sonra yumurtalar açılır ve yumurtadan çıkan nematodlar dişinin (annelerinin) vücut dokularıyla beslenmeye başlarlar. 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). Dişi bireyden geriye kalan tüm dokuları bitiren nematodlar J3 evresinde gelişimlerini durdurarak konukçuyu terk edip toprağa geçer ve yeni konukçular aramaya başlarlar (Kaya ve Gaugler, 1993; Hazır vd., 2003).

Heterorhabditler ile steinernematidlerin hayat döngüleri oldukça benzer olmasına 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).

Entomopatojen nematodların uygulama yapıldıktan sonra toprakta kendi kendilerine üreyebiliyor olmaları onları biyolojik mücadelede oldukça cazip hale getirmektedir. Çünkü bu durum zararlılar üzerinde fazladan ve uzun süreli bir kontrol sağlamaktadır. Yapılan çok sayıdaki çalışma uygulama yapıldıktan sonra entomopatojen nematodların toprak ortamında kendi kendilerine tekrar çoğaldıklarını göstermiştir (Kaya, 1990; Klein, 1993).

Entomopatojen nematodların sahip olduğu bazı özellikler onları biyolojik mücadelede kullanılan diğer organizmalardan (bakteri, fungus, virus gibi mikroorganizmalar ile böcek parazitoidleri ve predatörleri) ayırmaktadır. Entomopatojen nematodların biyolojik kontrolde kullanılmasının avantaj ve dezavantajları vardır.

1.1.1. Entomopatojen Nematodların Avantajları

1. Geniş bir konukçu spektrumuna sahiptirler. 2. İnfektif juvenil adı verilen dayanıklı evreleri konukçularını aktif olarak arayabilme özelliğindedir.
3. Kullanımları için pek çok ülkede onay alınmasına gerek yoktur.
4. Kimyasal insektisitlerin kısıtlı olduğu veya yasaklandığı yerlerde kullanılabilirler.
5. Dünyanın pek çok yerinde topraktan kolaylıkla elde edilirler.
6. Konukçularını genelde 48 saat gibi çok kısa bir süre içerisinde öldürürler.
7. Yapay ortamlarda *in vivo* ve *in vitro* olarak üretilmeleri mümkündür.
8. Çevre ve insan sağlığı açısından son derece güvenlidirler.
9. Geleneksel ilaçlama ekipmanları kullanılarak uygulanmaları mümkündür.
10. Uygulama esnasında özel bir giysi veya benzeri koruma ekipmanlarına ihtiyaç yoktur.
11. İnfektif juvenil evreleri uygun koşullarda toprakta beslenmeksizin 1 yıl canlı kalabilirler.

12. Uzun mesafeli taşınma işlemine dayanıklıdırlar.
13. Kimyasal ilaçlar ve gübrelerle birlikte uygulanabilirler.
14. Nematodlara karşı böceklerde direnç söz konusu değildir. (Gaugler ve Kaya, 1990)

1.1.2. Entomopatojen Nematodların Dezavantajları

1. Kimyasal ilaçlara göre pahalıdırlar.
2. Raf ömürleri kısadır (3-6 ay).
3. Uygulamadan kısa süre sonra popülasyonun büyük bir bölümü canlılığını yitirir.
4. Nem, sıcaklık ve UV ekstremlerine karşı oldukça duyarlıdırlar.
5. Toprak içerisindeki yayılım güçleri sınırlıdır. (Gaugler ve Kaya, 1990)

1.1.3. Entomopatojen Nematodların Konukçu Dağılımı ve Bunu Etkileyen Faktörler

Toprak ortamı böcek-nematod interaksyonu için mükemmel bir ortam sağlar. Zararlı böceklerin %90'dan fazlası yaşam döngülerinin bir bölümünü toprakta geçirirler ve toprak steinernematid ve heterorhabditidler için doğal bir kaynaktır (Klein, 1990).

Bazı steinernematid ve heterorhabditid'ler polioksenik'tirler. *Steinernema carpocapsae* laboratuvar koşullarında farklı takımlardan 250'den fazla böcek türünü enfekte etmiştir (Poinar, 1979). Aynı şekilde *H. bacteriophora* da geniş bir konukçu dağılımı gösterir (Khan vd., 1976; Koppenhöfer, 2000). Ancak bazı nematod türleri örneğin *S. scapterisci* Orthoptera takımına özellikle de Gryllotalpidae familyası türlerine adapte olmuştur ve diğer böcek takımlarına karşı düşük patojenite gösterirler (Grewal vd., 1993; Parkman ve Smart, 1996). *S. kushidai* daha çok Scarabeidae larvalarına adapte olmuştur ve diğer böcekleri infekte etmeleri oldukça zordur (Tanada ve Kaya, 1993).

Nematodların konukçu dağılımını sınırlayan faktörlerden birisi, infeksiif juveniller tarafından oluşturulan konukçu arama davranış biçimidir. Entomopatojen

nematodlar farklı konukçu arama, konukçuya yerleşme ve enfekte etme davranışı gösterirler (Gaugler vd., 1997). Bazı türler toprak profili içerisinde aktif dağılım gösteren ve konukçusunu arayan özelliktedir (cruiser tip). Bu nematodlar daha çok hareketsiz böcekleri enfekte etmeye adapte olmuşlardır (örneğin *Steinernema glaseri*, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis megidis*). Diğer türler, ‘‘otur ve bekle’’ stratejilerini ya da az hareketli ‘‘ambushers’’ olarak tanımlanan davranış biçimini gösterirler. Bunlar toprak yüzeyine yakın bir yerde durma eğilimindedirler (örneğin *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema scapterisci*). Bilinen pek çok entomopatojen nematod türü bu iki ekstrem konukçu arama davranışının arasında yer alan bir davranış modeline sahiptir. Yani ne çok aktif biçimde konukçu arar ne de hareketsiz kalarak beklerler (ör: *Steinernema riobrave*, *Steinernema feltiae*) (Lewis vd., 1995; Campbell ve Gaugler, 1997; Campbell ve Kaya, 1999a, 1999b; Koppenhöfer, 2000; Saunders ve Webster, 2000).

Entomopatojen nematodlar üzerinde toprağın etkilerinin araştırıldığı çalışmalar toprak yapısından çok (toprak partiküllerinin çeşitli büyüklükte, geometride ve gözeneklilikte düzenlenişi) toprak tekstürü (partikül büyüklüğüne göre toprak kompozisyonu) üzerine odaklanmıştır. Por boşluğu, partiküllerin büyüklüğü ile düzenlenişine göre belirlenir ve toprakta havanın, suyun ve organizmaların hareketini etkilemektedir. Por boşluğu az olan topraklarda por yapısı daha büyük olan topraklara kıyasla hareket oldukça sınırlıdır. Genel olarak hareket ve enfeksiyon derecesi entomopatojen nematodların çapına yakın veya daha büyük por boşluğuna sahip topraklarla yakın bir ilişkiye sahiptir (Stuart vd., 2006).

Toprak tipi, nemi ve toprağın havalanması nematodun hareketi ile enerji tüketimini etkileyen etmenlerdir. Killi-tınlı ve killi toprak küçük por boşluğuna, yüksek miktarda nem potansiyeline (% 18 ve 28) sahip olduğu için nematodlara az miktarda havalanmış bir ortam yaratır. Bu nedenle de depo ettikleri karbonhidratları etkili bir şekilde kullanamazlar. Bunun aksine kumlu ve kumlu-tınlı topraklar büyük por boşluğuna ve düşük miktarda nem potansiyeline (% 10 ve 12) sahip olduğundan nematodlar için havalanma açısından daha iyi bir ortam oluşturur. İyi havalanmış bir ortamda infektif juveniller depoladıkları lipidleri daha etkili bir şekilde kullanıp hayatta kalma sürelerini böylece arttırmış olurlar (Kung ve Gaugler, 1990).

Nem, toprakta yaşayan nematodları etkileyen en önemli abiyotik faktördür. Karada yaşayan nematodlar hareket edebilmek için yeterli kalınlıkta ve devamlılıkta su filmine ihtiyaç duyarlar (Kung vd., 1991). Su filminin kalınlığı nematodun vücut genişliğinin yaklaşık yarısı kadar olduğunda hareket optimum düzeydedir. Toprak kurduğunda su filmi incelir ve geniş porlarda bulunan su süzülerek hareketi sınırlamış olur (Koppenhöfer ve Fuzy, 2007). Diğer yandan, por çapı nematod'unkinden daha fazla ($> 200 \mu\text{m}$) olduğu zaman eğer toprak suya tamamen doymuşsa yüzey gerilim kuvvetinin eksikliğinden dolayı hareket sınırlanır (Stuart vd., 2006; Koppenhöfer ve Fuzy, 2007).

Pekçok çalışma, infektif juvenillerin aktif oldukları nem aralığının entomopatojen nematod türleri arasında farklılık gösterdiğini kanıtlamıştır. Toprağın kademeli olarak kuruması, infektif juvenillerin kısmi kuruluğa ve hareketsiz uyuşuk döneme fizyolojik olarak adapte olmalarını sağlayacak zamanı verir (Koppenhöfer ve Fuzy, 2007). Nematodların çoğu, uyuşuk dönemden sonra aktiviteye yeniden başlamayı sağlayacak fizyolojik ve davranışsal adaptasyonlara sahiptir (Glazer, 2002). Entomopatojen nematodların düşük nem düzeyinde azalan virulansları yağışla veya sulama yapılmasıyla arttırılabilir (Grant ve Villani, 2003).

Toprak pH'sı entomopatojen nematodları etkilemekle birlikte nematodlar geniş bir aralıktaki pH değerlerine karşı tolerans gösterebilmektedir (Stuart vd., 2006). Kung ve Gaugler (1990), pH= 10 olduğunda steinernematid'lerin hayatta kalış oranının azaldığını ancak pH aralığının 4-8 olduğu durumda herhangi bir farklılığın görülmediğini bulmuşlardır.

Nematodlar aerobik organizmalar oldukları için düşük oksijen düzeyi hayatta kalış sürelerini azaltmaktadır. Killi, suya doymuş veya yüksek miktarda organik madde içeren topraklarda oksijen sınırlayıcı bir faktördür. Çoğu serbest yaşayan nematod türünde oksijen konsantrasyonunun azalması dormansiyi indüklemektedir ancak bu durum henüz steinernematid ve heterorhabditidlerde gözlenmemiştir (Glazer, 2002).

Entomopatojen nematodlar ve konukçu böcekleri poikilothermal organizmalardır. Bu nedenle ortam sıcaklığı son derece önemlidir ve her iki organizmayı da etkilemektedir (Gouge vd., 1999). Sıcaklık, entomopatojen nematodların enfektivite, üreme, gelişme, solunum, hayatta kalış, dağılım ve konukçu bulma davranışı gibi biyolojik faaliyetleri üzerinde etki göstermektedir (Grewal vd.,

1993; Griffin,1993; Jagdale ve Gordon, 1998; Jagdale vd., 2005). Entomopatojen nematodların hareketliliği ve enfektiviteleri, sahip oldukları simbiyotik bakterilerin de konukçunun ölümünde etkili olması nedeniyle, tüm sıcaklık aralıklarında aynı değildir (Chen vd., 2003). Belirli bir sıcaklıkta konukçu ölümünün az olması veya hiç gerçekleşmemesi hem nematodun hem de bakterisinin sıcaklığa karşı duyarlılığını gösterir ve hangisinin daha duyarlı olduğu nematodun konukçuya girişi ile bakteri virulansını test eden deneyler yapılarak belirlenebilir (Griffin, 1993). Pek çok entomopatojen nematod türü için optimum sıcaklık koşulları 5°C-15°C arasında olup, 37°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise genellikle öldükleri gözlenmiştir (Koppenhöfer ve Kaya, 1999; Stuart vd., 2006). Düşük sıcaklıklar, entomopatojen nematodların ılıman bölgelerde biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılmasını engellemektedir. Düşük sıcaklık, infektif juvenillerin enzimatik aktivitesini, hareketini ve metabolik faaliyetini azaltıp inaktif hale gelmelerine sebep olur (Chen vd., 2003). Yüksek sıcaklıklar ise metabolik aktiviteyi arttırıp, enerji rezervlerini tüketeceğinden yaşam süresini kısaltıcı bir etki gösterir (Kaya, 1990; Hazır, 2002).

UV ışınları çoğu nematod türü için zararlıdır ve letal etki göstermektedir. Kısa dalga boyundaki (366 nm) UV ışınlarına birkaç dakika maruz kalan *Steinernema carpocapsae*'nin önce enfektivitesinde azalma daha sonra da ölümü gözlenmiştir. Güneş ışığına yakın bir dalga boyu olan 302 nm UV'ye maruz kalan *H. bacteriophora*'nın üreme kapasitesi ve virulansında azalma *S. carpocapsae*'ye

kıyasla daha kısa sürede gerçekleşmiştir (Barbercheck ve Duncan, 2004). Entomopatojen nematodların UV'ye doğrudan maruz kalmamaları için toprak yüzeyine uygulamaları, sabah ve akşamları yeterli miktarda su ile birlikte verilerek yapılmalıdır (Shapiro- Ilan vd., 2006).

Entomopatojen nematodların varlığını ve devamlılığını etkileyen primer biyotik faktör, uygun konukçu bulunmasıdır (Mráček vd., 1999). Konukçular bol olarak bulunuyorsa, predatör, parazit ve patojenler popülasyonu düzenleyebilmektedir. Toprakta funguslar, bakteriler, protozoa, nematodlar, akarlar, collembolalar ve mikroarthropodların yaygın olarak bulunması ve bu organizmaların laboratuvar koşullarında entomopatojen nematodları parçalayarak beslenmesi, doğada da bu organizmaların entomopatojen nematodlar üzerinde önemli bir etkiye sahip olabileceklerini göstermektedir (Stuart vd., 2006).

Böcek kadavrası ile entomopatojen nematodlar, çeşitli leş yiyicileri tarafından parçalanarak beslenilmektedir. (Stuart vd., 2006). Bununla birlikte, bazen konukçu kadavrasının kimi karınca türleri üzerinde uzaklaştırıcı bir etki oluşturup, entomopatojen nematod gelişimine olanak sağladığı bulunmuştur (Zhou vd., 2002; Gulcu vd., 2012). Günümüzde bu etkinin sınırlı sayıdaki karınca ve entomopatojen nematod türünde olduğu bilinmektedir (Kaya, 2002).

Nematodlar tarafından öldürülen konukçular, 7- 20 gün kadar toprağın iç kısmında veya yüzeye yakın yerlerde kalıp, infeksiif juvenillerin çıkışından önce omurgasız ve çürükçül beslenen canlılar için besin kaynağı olurlar. Ancak çoğu örnekte böcek kadavralarının kısmen tüketildiği gösterilmiştir (Gulcu vd., 2012). *Xenorhabdus nematophila* ve *Photorhabdus* spp. bakterilerinin üretmiş oldukları

ADF (ant deterrent factor) adlı bir madde karıncaların nematodla enfekte olmuş kadavralar üzerinden beslenmesini engellemektedir. ADF üretimi *in vitro* koşullarda üretilen bakterilerde de gözlenmiştir (Zhou vd., 2002).

Günümüzde *Steinernema* cinsine ait 65, *Heterorhabditis* cinsine ait 16, *Neosteinernema* cinsine ait ise 1 tür olmak üzere toplam 82 tür tanımlanmıştır (Kepenekci, 2014)

Yüzlerce laboratuvarında entomopatojen nematodlar ve birlikte yaşadıkları simbiyotik bakteriler üzerine çalışmalar sürdürülmektedir. Araştırmalar taksonomi, filogenetik, biyocoğrafya, biyoloji, ekoloji, moleküler biyoloji, genetik, fizyoloji, biyokimya, davranışsal ekoloji, üretim, formülasyon ve uygulama teknolojisi gibi çok çeşitli konular üzerinde yapılmaktadır (Burnell ve Stock, 2000).

Entomopatojen nematodların tür hatta izolatları arasında biyo-ekolojik özellikler ve etkinlik bakımından farklılıklar olması nedeniyle bir çok ülkede yeni tür ve izolat bulmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Son yıllarda Sri Lanka (Amarasinghe vd., 1994), Portekiz (Rosa vd., 1994), Kanada (Mracek ve Webster, 1993), Arjantin (Stock, 1995), Kore (Choo vd., 1995), Tayland (Stock vd., 1998), Japonya (Yoshida vd., 1998), Slovakya (Sturhan ve Liskova, 1999), Amerika Birleşik Devletleri (Stock vd., 1999), Endonezya (Griffin vd., 2000), Türkiye (Hazır vd., 2003), İran (Nikdel vd., 2010) ve Çin (Wang vd., 2014) gibi dünyanın bir çok farklı ülkesinde yapılan araştırmalar sonucunda yeni nematod tür ve

izolatları elde edilmiştir. Bu çalışmalardaki asıl amaç, belirli zararlıya karşı yapılacak uygulamada en uygun nematodu tespit etmektir.

Türkiye bulunduğu konum nedeniyle pek çok bitki ve hayvan türü için geçiş bölgesi olmuştur. Sıcak akdeniz ikliminden soğuk karasal iklime, yüksek dağlık bölgelerden geniş ovalara kadar birçok farklı özellikte bölgeye sahiptir. Tarımın yaygın olarak yapıldığı ülkemiz topraklarında zararlı böcek sayı ve çeşitliliği de oldukça fazladır. Bu zararlıların bir bölümüne karşı yapılacak biyolojik mücadele çalışmalarında kullanılmak üzere kendi ülkemiz topraklarına adapte olmuş entomopatojen nematodların izole edilmesi büyük önem arz etmektedir.

Yapılan bu tez çalışması kapsamında tarımın yaygın olduğu İzmir'in Tire ilçesi ve civarındaki toprakların entomopatojen nematod varlığı açısından taranması ve elde edilecek nematodların tür teşhislerinin yapılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Özer vd. (1995) Türkiye’de entomopatojen nematod (EPN) varlığını bildiren ilk çalışmayı yapmıştır. Farklı bölgelerden toplam 106 toprak örneği alınmış, bunlardan 5 tanesinden EPN izole edilmiştir. Çalışmada, Rize’den alınan toprak örneklerinden elde edilen türün *Steinernema feltiae* olduğu belirlenmiştir.

Susurluk vd. (2001) Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Kampüsünden alınan toprak örneklerinden 2 heterorhabditid nematod (TUR-H1 ve TUR H2) izole etmiş ve bunların *Heterorhabditis bacteriophora* türüne ait olduklarını bildirmiştir.

Hazır vd. (2003) Türkiye’deki entomopatojen nematodların çeşitlilik ve dağılımlarını belirlemek üzere 1999-2000 yılları arasında geniş çaplı bir araştırmada 1080 toprak örneği almıştır. Bu örneklerin 22 tanesinden EPN elde edilmiş (% 2 pozitif), yapılan moleküler ve morfometrik analizler sonucunda bu nematodların *Steinernema feltiae*, *S. affine*, *Steinernema n. sp.* ve *Heterorhabditis bacteriophora* türlerine ait olduğu belirlenmiştir.

Hazır vd. (2004) Türkiye’den elde edilen entomopatojen nematodların mutualistik bakterilerin tür teşhisini yapmış ve çalışmanın sonucunda 2 yeni bakteri alt türü olan *Photorhabdus luminescens* subsp. *kayaii* ve *Photorhabdus luminescens* subsp. *thraciaensis*’i tanımlamıştır.

Güngör vd. (2006) yapılan bu çalışmada Türkiye topraklarından elde edilen yeni tür entomopatojen nematod *Steinernema anatoliense*’nin sıcaklık, nem ve konukçu aralığı gibi temel ekolojik karakterleri tanımlanmıştır. Bu türün infektivite ve gelişimi için en uygun sıcaklığın 25 °C olduğu belirlenmiştir. *S. anatoliense* konukçusunu 10 °C’de enfekte etmesine rağmen üreme görülmemiştir. *S. anatoliense*’nin konukçularını enfekte edebildiği en uygun toprak neminin ise %10 olduğu belirlenmiştir.

Ünlü vd. (2007) yaptıkları çalışmada Haccettepe Üniversitesi Beytepe kampüsünden (Ankara) 80 toprak örneği almış ve çalışma sonucunda Türkiye için yeni bir entomopatojen nematod türü olan *Steinernema weiseri*’yi tespit etmişlerdir.

Karagöz vd. (2009) yaptıkları çalışmada *Cydia splendana* ve *Curculio elephas* larvalarına karşı Türkiye topraklarından izole edilmiş *Steinernema feltiae*,

Steinernema weiseri ve *Heterorhabditis bacteriophora* türlerine ait entomopatojen nematodları farklı sıcaklık dereceleri kullanarak test etmişler. Çalışma sonucunda entomopatojen nematodların kestane meyve zararlılarına karşı yüksek etki gösterdiğini belirlemişlerdir. 5, 10, 15 ve 20°C gibi düşük sıcaklıklarda *S. weiseri* ile *S. feltiae* etkili bulunurken; 25 ve 30°C'lik yüksek sıcaklıklarda *H. bacteriophora*'nın daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir..

Yılmaz vd. (2009) Türkiye'nin Doğu Karadeniz Bölgesinde entomopatojen nematodların varlığını belirlemek için bir çalışma yapmıştır. *Galleria* tuzak böcek yöntemi kullanılarak bir heterorhabditid türü tespit edilmiştir. Yapılan morfolojik, moleküler ve morfometrik analizler sonucunda izole edilen türün *Heterorhabditis megidis* olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma ile *Heterorhabditis megidis* Türkiye'den ilk kez izole edilmiştir.

Canhilal vd. (2014) çalışmalarında Adana ve Kahramanmaraş illerinde farklı habitatlarda entomopatojen nematodların tespiti ve yaygınlıklarını belirlemiştir. Alınan 400 toprak örneğinden 36 örnekte entomopatojen nematoda rastlanmıştır. Çalışma sonucunda, 36 örnekten, 14'ü *S. feltiae*, 12'si *S. littorale*, 8'i *H. bacteriophora* ve 2'si *H. indica* olarak tanımlanmıştır. *H. indica* ve *S. littorale* Türkiye nematod faunası için yeni kayıt niteliğindedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Konukçu Olarak Kullanılan *Galleria mellonella* Larvalarının Üretilmesi

Galleria mellonella (Lepidoptera: Pyralidae)'nın son dönem larvaları topraktan entomopatojen nematod izole etmek ve laboratuvarında nematod kültürü yapmak için kullanılan en yaygın organizmadır (Bedding ve Akhurst, 1975). Bu nedenle laboratuvar koşullarında üretimi oldukça kolay olan *G. mellonella* larvalarının hazırlanan yapay besi ortamında (200 gr bal mumu, 150 gr bal, 20 gr bira mayası, 20 gr süttozu, 500 gr mısır unu, 300 ml gliserin, 500 gr buğday kepeği), kavanozlar içinde, 25°C'de devamlı üretimi yapılmıştır (Han ve Ehlers, 2000).

3.2. Toprak Örneklerinin Alınması

İzmir'in Tire ilçesinin farklı yerlerinden 2012-2013 yılları arasında 620 adet toprak örneği alınmıştır. Alınan bu toprak örneklerinin yerleri rastgele belirlenmiştir (Griffin vd., 2000; Hazır vd., 2003). Toprak örneği alınacak alanda aralarında 5-6 metre mesafe olacak şekilde yaklaşık 10 örnek alınmış ve alınan örnekler plastik bir torba içerisinde karıştırılmıştır. Elde edilen bu karışımdan yaklaşık olarak 1kg kadar toprak alınmıştır (Hazır vd., 2003; Hatting vd., 2009). Her örneğin üzerine bölgenin adı, alanın vejetasyon tipi, toprak ısısı, GPS koordinatları ve alım tarihi yazılmıştır. Alınan örneklerin kurumasını ve UV ışınlarına maruz kalmasını önlemek için plastik torbalar içerisine alınan örnekler buzluklara yerleştirilmiştir (Kaya ve Stock, 1997; Stock vd., 1999; Hatting vd. 2009). Toprak alımında yüzeyden başlayıp ilk 15-20cm'lik derinliğe kadar olan bölge tercih edilmiştir (Mracek ve Becvar, 2000; Hazır vd., 2003). Örnek alma işlerinde kullanılan toprak alma aleti her toprak alımından sonra % 70'lik etilalkol ile steril edilmiştir (Stock vd., 1999).

3.3. Entomopatojen Nematodların Topraktan İzolasyonu

Araziden toplanıp laboratuvara getirilen toprak örnekleri burada 350 ml hacimli plastik kaplar içerisine alınmıştır (Şekil 3.1). Her bir toprak kap içerisine 3'er adet son evre *G. mellonella* larvası konulmuş ve larvalar toprağın altında kalacak şekilde kaplar ters çevrilmiştir (Bedding ve Akhurst, 1975; Stock vd., 1999).

Deneye alınan örnekler 23- 24 °C'lik oda sıcaklığında tutulmuştur (Stock vd., 1999). Konulan larvaların enfekte olup olmadıklarını anlamak için 3'er gün arayla toplam 9 gün boyunca kontroller yapılmıştır (Hatting vd., 2009).



Şekil 3.1. Toprak örneklerinin entomopatojen nematod elde etmek için düzeneklere alınması.

Kontroller sonucunda enfekte olduğu tespit edilen ölü larvalar toprak içerisinde çıkarılarak White trap (White, 1927) adı verilen düzeneğe alınmışlardır (Koppenhöfer, 2000). Bu sistemde birbiri içerisine yerleştirilmiş birisi büyük diğeri küçük iki petri kabı bulunmaktadır. Büyük olanın içerisinde su, küçük olanın içerisinde ise filtre kağıdı yer alır. Enfekte olan larvalar bu filtre kağıdı üzerine yerleştirilir ve büyük petrinin kapağı kapatılır. Yeni nesil nematodlar üreyip konukçuyu terketmeye başladıklarında bu filtre kağıdı üzerinde hareket ederek büyük petrideki suya doğru yönelmektedirler. Bu suyun alınması durumunda nematodların sadece infeksiyöz juvenil evreleri elde edilmiş olur (Hazar, 2002).

Elde edilen infektif juveniller yüzey sterilizasyonlarının yapılması için bir cam beher içerisine alınıp üzerleri steril distile su ile doldurulmuştur. Bir süre sonra nematodlar beherin dibine çökünce üstteki distile su uzaklaştırılıp yerine yenisi eklenmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlandıktan sonra yüzeyleri kısmen de olsa temizlenen nematodlar tetrapak kutular içerisine alınarak 15 °C'lik iklim dolabında saklanmışlardır (Gulcu ve Hazır, 2012).

Elde edilen nematodların entomopatojen olup olmadıklarını teyit etmek için bu nematodlar sağlıklı *G. mellonella* larvaları üzerinde tekrar infektivite testine (Koch's postulation) tabii tutulmuşlardır (Kaya ve Stock, 1997).

3.4. Steinernematid ve Heterorhabditid'lerin Tür Teşhislerinin Yapılması

Günümüzde entomopatojen nematodların tür düzeyindeki teşhisleri için morfometrik ölçümler, moleküler düzeyde analizler ve Scanning Elektron Mikroskop (SEM) ile elde edilen detaylı morfolojik görüntüler kullanılmaktadır (Kaya ve Stock, 1997; Burnell ve Stock, 2000; Van Luc vd., 2000).

3.4.1. Morfometrik Yöntem

Morfolojik çalışmalarda, infektif juveniller ve birinci jenerasyona ait erkek bireyler kullanılmıştır. İlk jenerasyona ait erkek bireyler 3 günlük kadavralar 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) fiksatif içerisine alınmış ve daha sonra morfometrik ölçümlerinin yapılabilmesi için gliserin yöntemi uygulanmıştır (Kaya ve Stock, 1997) (Şekil 3.2). Her bir yaşam evresinden 20'şer adet nematod ölçülmüştür (Plichta vd., 2009). Ölçümlerde Leica IM50 Image software programı kullanılmıştır.

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 uzaklığı

oranı X 100) ve %E (anterior sonu ile boşaltım deliği arasındaki mesafenin kuyruk uzunluğuna oranı X 100) dır. 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) nın ölçümleri yapılmıştır (Hazir, 2002) (Şekil 3.3).

Morfometrik ölçümler Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Morfometrik ölçümlerde kullanılmak üzere nematod kalıcı preparatlarının hazırlanması



Şekil 3.3. Görüntülü ve ölçüm modüllü mikroskopta morfolojik ölçümlerin yapılması.

3.4.2. Moleküler Yöntem

Morfolojik çalışmalara ek olarak elde edilen nematod izolatları moleküler yönden de analiz edilmiştir. Sekans analizleri için 28S rRNA D2D3 bölgelerinin dizi analizleri kullanılmıştır (Liu vd., 2000; Stock vd., 2001).

Nükleik asit amplifikasyonu için, 3 günlük enfekte *Galleria* larvaları parçalanarak ilk jenerasyona ait dişi 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 (son konsantrasyon 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 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.

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

9.5 µl steril dH₂O

12.5 µl Red taq

1 µl Primer 93 (10mM)

1 µl Primer 94 (10mM)

(forward) no. 391, 5'-AGCGGAGGAAAAGAACTAA-3'

(reverse) no. 501, 5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3' (Stock vd. 2001).
eklenmiş ve bu bileşenler vorteks 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 yerleştirilmiş ve ITS-60°C'lik program seçilerek 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'dan çıkan ürünler 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.

3.4.3. 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. Bunun sonucunda açığa çıkan bakteriler NBTA besi ortamına aktarılmıştır.

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).

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 aktararak 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 (son konsantrasyon 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 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 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.

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).

3.5. Konukçu Dağılım Çalışmaları

İzole edilen entomopatojen nematodlar ile *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae), *Spodoptera ciliium* (Lepidoptera: Noctuidae), *Polyphylla fullo* (Coleoptera: Scarabaeidae) ve *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) zararlıları üzerinde konukçu dağılım çalışmaları yapılmıştır.

İzole edilen entomopatojen nematodların *C. elephas*, *S. ciliium* ve *T. molitor*'a karşı etkinliğini ölçmek için içlerinde 7 gr steril kum bulunan 10 adet 40 ml hacimli plastik kapların herbirine bir tane sağlıklı son dönem larva konmuştur (Şekil 3.4). Daha sonra kullanılacak nematodların konsantrasyonu 25 IJ/cm² olacak şekilde toplam 362 IJ uygulanmıştır. Kontrol grubuna ise nematod uygulamalarında kullanılanla aynı miktarda distile su verilmiştir. Deneyler farklı zamanlarda 3 kez tekrarlanmıştır.

Entomopatojen nematodların *P. fullo*'ya karşı etkinliğini ölçmek için 250 ml'lik plastik kaplar kullanılmıştır. Her kap içerisine 150 gr steril kum eklenmiştir (Şekil 3.5). Nematod konsantrasyonu 50 IJ/cm² olacak şekilde toplam 1250 IJ 6 ml distile su içerisinde verilmiştir. Kaplardaki nem oranı %15 olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra her bir kap içerisine bir adet 2 veya 3. dönem *P. fullo* larvası konmuştur. Nematod uygulamasından önce larvaların sağlıklı olduklarından emin olmak için toprağın içerisine dalmaları beklenmiştir. Sağlıksız olan larvalar yenileriyle değiştirilmiştir. Kontrol grubundaki kaplar deneylerdeki ile aynı olacak şekilde hazırlanmış ancak nematod yerine sadece distile su verilmiştir. Her denemede 5 kavanoz kullanılmış ve deneyler farklı zamanlarda 3 kez tekrarlanmıştır.

Konukçu dağılımı çalışmalarının tümü oda sıcaklığında (23-24 °C) yürütülmüştür. Deney düzenekleri her gün kontrol edilerek ölen larvalar kaydedilmiş ve nematod çıkışlarını gözlemlemek için kadavrular White-trap'lere alınmıştır.



Şekil 3.4. *Curculio elephas*, *Spodoptera cilium* ve *Tenebrio molitor* larvalarıyla konukçu dağılım çalışmalarının yapılması.



Şekil 3.5. *Polyphylla fullo* larvalarıyla konukçu dağılım çalışmalarının yapılması

3.6. Elde Edilen Nematodların Hermafrodit Olup Olmadıklarının Belirlenmesi

Steinernema cinsine ait nematodlar genel olarak ayrı eşeylidir. Ancak ayrı eşeyli olmayıp ilk jenerasyonda hermafrodit özellik gösteren bir nematod türü (*S.*

hermafroditum) bulunduğu için bu çalışma sonucunda tespit edilen *Steinernema* cinsine ait izolatların ilk nesilde hermafrodit olup olmadıkları belirlenmeye çalışılmıştır.

Deneylerde 24 gözenekli doku kültür kapları kullanılmıştır. Her bir gözenek içerisine bir adet filtre kağıdı (Whatman no 1) yerleştirilmiş ve mikropipet (Drummond 10 μ l) yardımıyla 50 μ l su ile birlikte her gözeneğe 1 adet infektif juvenil evre nematod verilmiştir (Şekil 3.6). Daha sonra her bir gözeneğe 1 adet son dönem *G. mellonella* larvası ilave edilip kapak kapatılmıştır. Kapların kurummasını önlemek için plastik torbalar içerisine alınmış ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Deneylerin kurulmasından 5 gün sonra larvalar kontrol edilmiş ve ölen larvalar alınarak üreme olup olmadığını tespit etmek için Ringer's solüsyonu içerisinde parçalanmıştır.



Şekil 3.6. İnfektif juvenil evre nematodların tek tek doku kültür gözeneklerine yerleştirilmesi.

3.7. Çiftleştirme Testleri

Elde edilen nematodların ayrı eşeyli olduğu anlaşıldıktan sonra bulunan nematodlar birbiriyle çaprazlanmıştır. Aynı türe ait nematodlar birbirleriyle çiftleşip üreyecekleri için yapılacak test sonuçları elde edilen nematod izolatlarının

aynı ya da farklı türlere ait olup olmadıklarını gösterecektir. Bu amaçla 24 gözenekli doku kültür kaplarındaki çukurların her birine bir adet filtre kağıdı (Whatman no 1) ve daha sonra mikropipet yardımıyla 25 µl su ile birlikte her gözeneğe farklı nematod izolatına ait infektif juvenilden 1 adet olacak şekilde toplam 2 nematod konmuştur. Daha sonra gözenek içerisine 1 adet son dönem *G. mellonella* larvası ilave edilip kapak kapatılmıştır. Kontrol grubu olarak hazırlanan düzeneklerde ise her gözeneğe aynı izolata ait 2 adet infektif juvenil yerleştirilmiştir (Griffin vd., 1994). Kapların kurumasını önlemek için plastik torbalar içerisine alınmış ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Deneilerin kurulmasından 5 gün sonra larvalar kontrol edilmiş ve ölen larvalar alınarak üreme olup olmayacağını tespit etmek için White-trap sistemine aktarılmıştır. Bu çalışmalar tüm nematod kombinasyonları için ayrı ayrı yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Entomopatojen Nematodların Tire ve Çevresindeki Dağılımları ve Çeşitlilikleri

Çalışma süresince alınan 620 toprak örneğinin 3 tanesinden entomopatojen nematod elde edilmiştir (%0,48 pozitif). Bu 3 pozitif örneğin hepsi *Steinernema* cinsine ait olup *Heterorhabditis* cinsine ait nematod izole edilememiştir. Pozitif sonuçların hepsi Tire'nin Büyükkale ile Küçükkale köyleri arasında yer alan şeftali bahçelerinden elde edilmiştir. Toprak örneklerinin alındığı bölgeler, nematod izole edilen yerler ve pozitif sonuç elde edilen yerlerin GPS koordinatları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışma kapsamında toprak örnekleri alınan yerler, örnek sayıları ve pozitif örneklerin GPS koordinatları.

Toprak örneklerinin alındığı köyler	Örnek sayısı	Pozitif örneklerin GPS koordinatları
AKÇAŞEHİR	10	
AKKOYUNLU	10	
AKMESCİT	5	
AKYURT	10	
ALACALI	10	
ALAYLI	15	
ARMUTLU	5	
AYAKLIKIRI	5	
BAŞKÖY	5	
BOYNUYOĞUN	10	
BÜYÜKKALE	25	N38 02 590 E027 33 260
BÜYÜKKEMERDERE	10	
BÜYÜKKÖMÜRCÜ	7	
CAMBAZLI	10	

ÇAYIRLI	15	
ÇERİKÖZÜ	6	
ÇİNİYERİ	6	
ÇOBANKÖY	3	
ÇUKURKÖY	4	
DAĞDERE	3	
DALLIK	5	
DEREBAŞI	4	
DERELİ	5	
DİBEKÇİ	3	
DOYRANLI	10	
DÜNDARLI	5	
EĞRİDERE	5	
ESKİOBA	20	
GÖKÇEN-BUCAK MERKEZİ	15	
HALKAPINAR	15	
HASANÇAVUŞLAR	10	
HİSARLIK	7	
İŞIKLAR	5	
İŞIKLI	15	
KAPLAN	10	
KARATEKE	5	
KİRELİ	8	
KIRTEPE	12	
KIZILCAHAVLU	5	
KOCAALİLER	7	
KÜÇÜKBURUN	5	

KÜÇÜKKALE	20	N38 02 349 E027 32 358 ve N38 02 347 E027 32 397
KÜÇÜKKÖMÜRCÜ	10	
KÜRDÜLLÜ	10	
KURŞAK	15	
MAHMUTLAR	17	
MEHMETLER	13	
MERKEZ (KAHRAT MAH)	15	
MUSALAR	10	
ORTAKÖY	10	
OSMANCIK	10	
PEŞREFLİ	16	
SARILAR	10	
SARUHANLI	10	
SOMAK	10	
TOPALAK	10	
TOPARLAR	10	
TURGUTLU	10	
ÜZÜMLER	12	
YAMANDERE	10	
YEĞENLİ	10	
YEMİŞLER	10	
YENİÇİFTLİK	5	
YENİOBA	10	
YENİŞEHİR	7	
Toplam örnek sayısı:	620	3 pozitif

Tire ve çevresindeki topraklardan elde edilen tüm izolatların tür teşhislerinde kullanılan morfolojik ölçüm sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Ayrıca teşhiste kullanılan erkek nematodların spikül ve gubernakulum yapıları Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3’te verilmiştir.

Morfolojik, morfolojik ve moleküler verilerin bir arada değerlendirilmesi sonucunda izole edilen nematodların hepsinin *Steinernema feltiae* türü oldukları tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. Elde edilen nematod izolatlarının infektif juvenil ve erkeklerine ait morfolojik ölçüm sonuçları.

İzolat TİRE-179

TİRE-179 İJ	TU	MG	ES	EP	NR	TL	AG	a	b	c	%D	%E
Min.	673,93	19,77	104,49	42,61	54,84	52,83	11,19	34,1	6,4	12,8	40,8	80,7
Ort.	789,9	23,6	132	52,1	77,4	63,8	14,1	33,5	6,0	12,4	39,5	81,7
Maks.	855,27	33,9	195,06	64,83	97,56	69,31	16,1	25,2	4,4	12,3	33,2	93,5
Ss.	75,1	23,6	24,5	15,9	12,6	5,2	1,5	3,2	3,1	14,4	64,9	305,8

TİRE-179 ERK	TU	MG	ES	EP	NR	TL	AG	SU	GB	a	b	c	D %	E %
Min.	1016,3	77,3	103,5	61,8	71,2	26,8	39,7	66,5	41,7	13,1	9,8	37,9	59,7	230,60
Ort.	1140,8	103,8	124,1	79,4	85,7	30,4	45,5	70,6	48,2	11,0	9,2	37,5	64,0	261,18
Maks.	1361,6	138,9	145,6	97,8	102,2	33,9	52,8	77,7	54,9	9,8	9,4	40,2	67,2	288,50
Ss.	127,7	20,2	12,1	14,7	10,2	2,4	3,5	3,6	4,9	6,3	10,6	53,2	121,5	612,50

İzolat TİRE-271

TİRE-271 İJ	TU	MG	ES	EP	NR	TL	AG	a	b	c	%D	%E
Min.	593,76	22,19	106,28	51,5	63,96	52,25	11,29	26,8	5,6	11,4	48,5	98,6
Ort.	753,9	29,04	111,4	65,6	79,4	60,1	15,3	26,0	6,8	12,5	58,9	109,2
Maks.	870,33	37,5	136,34	94,73	90,72	87,73	24,51	23,2	6,4	9,9	69,5	108,0
Ss.	77,08	4,9	33,7	13,5	9,4	11,8	3,7	15,7	2,3	6,5	40,1	114,4

TİRE-271 ERK	TU	MG	ES	EP	NR	TL	AG	SU	GB	a	b	c	D %	E %
Min.	911,72	78,77	110,89	65,82	73,35	18,92	32	65,91	41,26	11,6	8,2	48,2	59,4	347,9
Ort.	1147,2	97,5	116,2	76,9	82,4	25,7	38,5	68,9	41,6	11,8	9,9	44,6	66,2	299,2
Maks.	1482,72	134,46	147,72	94,28	109,2	33,99	51,93	82,84	54,5	11,0	10,0	43,6	63,8	277,4
Ss.	164,09	17,8	11,8	8,8	9,7	4,6	5,8	5,9	4,7	9,2	13,9	35,7	74,6	191,3

İzolat TİRE-279

TİRE-279 İJ	TU	MG	ES	EP	NR	TL	AG	a	b	c	%D	%E
Min.	593,18	24,8	110,15	67,63	67,85	53,44	12,67	23,9	5,4	11,1	61,4	126,6
Ort.	762,2	31,2	139,7	59,8	84,2	60,1	16,5	24,4	5,5	12,7	42,8	99,5
Maks.	888,71	42,52	153,76	52,42	100,75	68,39	20,7	20,9	5,8	13,0	34,1	76,6
Ss.	105,5	4,5	13,05	4,3	10	5,04	2,47	23,4	8,1	20,9	33,0	85,3

TİRE-279 ERK	TU	MG	ES	EP	NR	TL	AG	SU	GB	a	b	c	D %	E %
Min.	1398,9	105,1	105,5	94,2	88	17,5	35,3	61,3	40,5	13,3	13,3	79,9	89,3	538,3
Ort.	1476,5	125,3	117,2	109,2	91	28,2	48,7	67,6	44,6	11,8	12,6	52,4	93,2	387,2
Maks.	1623,6	161,15	127,84	129,6	97,8	33,9	58,55	70,4	50,9	10,1	12,7	47,9	101,4	382,3
Ss.	63,7	24,5	8,9	9,9	4,7	7	6	3	3,6	2,6	7,2	9,1	111,2	141,4



Şekil 4.1. Morfometrik ölçümlerde kullanılan TİRE-179 numaralı izolata ait infektif juvenil evre nematod.



Şekil 4.2. Morfometrik ölçümlerde kullanılan TİRE-179 numaralı izolata ait bir erkek nematod.



Şekil 4.3. Erkek nematodun kuyruk yapısı (izolat TİRE-179).

4.2. Simbiyotik Bakterilerin İzole Edilmesi ve Tanımlanması

Yapılan moleküler analizler sonucunda her 3 nematod izolatının simbiyotik bakterisinin *Xenorhabdus bovienii* olduğu belirlenmiştir.

4.3. Konukçu Dağılım Çalışmaları

Yapılan konukçu dağılım çalışmaları sonucunda *Curculio elephas* larvalarına karşı TİRE-179 ve 279 izolatları %20, TİRE-271 izolatu ise %30 oranında ölüm meydana getirmiştir. *Spodoptera cilium* ve *Tenebrio molitor* larvalarına karşı test edilen tüm nematod izolatları %100 oranında ölüm meydana getirmiştir. White trap sistemine alınan tüm enfekte larvalardan infektif juvenil çıkışları gözlenmiştir.

Ancak *Polyphylla fullo* türü ile yapılan çalışmalarda test edilen nematod izolatlarının enfektivite oranları %10'u geçememiş ve kadavralarda nematod üremesi gözlenmemiştir.

4.4. Elde Edilen Nematodların Hermafrodit Olup Olmadıklarının Belirlenmesi

Enfekte larvaların parçalanması sonucu ergin dişi veya erkek bireylere rastlanmış ancak hiç bir üreme görülmemiştir. Mikroskop altında yapılan incelemelerde dişi bireylerin yumurtalarının döllenmediği tespit edilmiştir.

4.5. Çiftleştirme Testleri

Yapılan çiftleştirme testleri sonucunda hem 3 farklı izolat arasında hem de aynı izolatın bireyleri arasındaki çaprazlamalarda yeni nesil nematodların ürediği belirlenmiştir. Ayrıca daha önceden tür teşhisi yapılarak *S. feltiae* olduğu bilinen nematodlarla Tire'den elde edilen 3 izolat kullanılarak yapılan çiftleştirme testlerinin hepsinde üreme olduğu gözlenmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Bu çalışma entomopatojen nematodların tarımın yoğun olarak yapıldığı İzmir'in Tire ilçesi ve bağlı köylerinde gerçekleştirilen ilk kapsamlı araştırma özelliğini taşımaktadır. Elde edilen nematod izolatlarının ve bunlarla mutualistik yaşayan bakterilerin tür düzeyinde teşhisleri en gelişmiş teknikler kullanılarak yapılmıştır.

Bu çalışma kapsamında 620 toprak örneğinden 3 tane pozitif sonuç elde edilmiştir. Bu durumda entomopatojen nematod bulunma oranı %0,48'dir. Bu oran daha önce yapılan çalışmalarla kıyaslandığında oldukça düşüktür. Özer vd. (1995) yaptıkları çalışmada 106 toprak örneği almış ve bunların 5 tanesinden entomopatojen nematod izole etmiştir (%4,71). Daha sonra yapılan ve tüm Türkiye'yi kapsayan çalışmada 1080 toprak örneği alınmış ve bunların içerisinde 22 tane pozitif sonuç elde etmiştir (%2,03) (Hazır vd., 2003a). Türkiye'nin 75 ilini kapsayan bir başka çalışmada toplam 839 toprak örneği alınmış ve bunların 49 tanesinden entomopatojen nematod izole edilmiştir (%5,8 pozitif) (Gözel vd., 2007). Son olarak Canhilal vd. (2014) Adana ve Kahramanmaraş illerindeki farklı habitatlardan toplam 400 toprak örneği almış, bunlardan 36 örnekte entomopatojen nematoda rastlamışlardır (%9 pozitif).

Bugüne kadar ülkemiz topraklarından entomopatojen nematod bulma oranı her zaman %10'un altında olmuştur. Bu oran Kuzey İrlanda'da %3,8 (Blackshaw, 1988), Portekiz'de %3,9 (Rosa vd., 2000), Kore'de %4,6 (Choo vd., 1995), İtalya'da %5 (Ehlers vd. 1991), İran'da %3 (Nikdel vd., 2010), Çin'de %14,7 (Wang vd., 2014), Tayland'da %11 (Thanwisai vd., 2012)'dir. Ekstrem bir durum olarak İspanya'da %23,3 (Del Pino ve Palomo, 2006), İngiltere'de ise bu oran %48,6 olarak tespit edilmiştir (Hominick ve Briscoe, 1990).

Türkiye'de yapılan çalışmalarda elde edilen en yaygın entomopatojen nematod türü *S. feltiae* dir. Bu türü *H. bacteriophora* takip etmektedir. Özer vd. (1995) tarafından elde edilen nematodların hepsi *S. feltiae* türüne aittir. Hazır vd. (2003) elde ettiği 22 nematod izolatından 10 tanesinin *S. feltiae*, 7 tanesinin ise *H. bacteriophora* türüne ait olduğunu bildirmiştir. Canhilal vd. (2014) yaptıkları çalışma sonucunda, 36 örnekten 14 tanesinin *S. feltiae*, 12'sinin *S. littorale*, 8'inin *H. bacteriophora* ve 2'sinin *H. indica* olduğunu bildirmiştir.

Steinernema feltiae ve *H. bacteriophora* türleri dünyadaki en yaygın türlerdir (Hominick vd., 1996). *S. feltiae* tropik bölgelerden, Avrupa'nın en soğuk iklimlerine kadar her yerden izole edilmiştir (Hominick vd., 1996). *S. feltiae* tropik bölgelerden de elde edilmiş olmasına rağmen, bu nematod türü soğuk iklim bölgelerine adapte olmuş bir tür olarak kabul edilmektedir (Hazır vd., 2001). *S. feltiae* tüm Avrupa'da kaydedilmiştir. Kuzey Avrupa'da bu tür genellikle en sık rastlanan türdür (Boag vd., 1992; Vainio vd., 1994). Orta Avrupa'da ise *S. feltiae* subdominant türdür. *S. feltiae*'nin Alplerin eteklerinde ve Jura dağlarında dominant tür olması, bu türün düşük sıcaklığa adapte olduğu görüşünü desteklemektedir (Hominick ve Briscoe, 1990). *S. feltiae*'nin kırsal alanda daha çok bulunması bu türün doğal konukçuları olan ve bitki kökleri ile beslenen Lepidoptera larvalarının (Noctuidae ve Hepialiidae) o bölgelerde bulunması nedeniyledir (Poinar, 1990). *S. feltiae* kadar geniş bir dağılım göstermemesine rağmen, *H. bacteriophora* daha çok tropik bölgelerde olmak üzere (Constatn vd., 1998), soğuk bölgelere kadar yayılım gösterebilmektedir (Hominick vd., 1996). Yapılan çalışmalar sonucunda heterorhabditislerin genelde sıcak iklime daha çok adaptasyon sağladığı anlaşılmıştır. Bu yüzden *H. bacteriophora* türüne genelde sıcak iklimlerde ve özellikle kıyı bölgelerde rastlanmaktadır (Poinar, 1990; Mracek ve Webster, 1993; Hominick vd., 1995).

Tire ilçesi ve civarında sıcaklık nispeten yüksektir ve beklentiler bu bölgede daha çok *Heterorhabditis* cinsine ait nematodların bulunması yönündedir. Tire bölgesinde soğuk iklim şartlarına adapte olarak tanınan *S. feltiae* türünün bulunuşu, sıcak iklim şartlarına adapte olan *Heterorhabditis* cinsi nematodlara rastlanmamış olması ilginç bir sonuçtur. Bu durumun olası nedeni bölgede tarımı yapılan bitki çeşitleri ve bunlarda zararlı olan böcek türleriyle ilişkili olabilir. Çünkü *S. feltiae* türü çoğunlukla Lepidoptera takımına ait böcek larvalarına adapte olmuş bir türdür. Tez kapsamında kullanılan *Spodoptera cilium* larvalarında 2 gün içinde %100 ölüm meydana gelmesi bu bilgileri doğrular niteliktedir. Bir başka neden ise, alınan toprak örnekleri içerisinde bulunabilecek entomopatojen nematod türlerinin konukçu özgülüğü göstermesi olasılığıdır. Bu çalışmada konukçu olarak *G. mellonella* larvaları kullanılarak sadece Lepidoptera larvalarını enfekte edebilen türler izole edilebilmiştir. Lepidoptera larvası dışında başka bir böcek grubunun çalışmaya dahil edilmesiyle farklı nematod türlerinin elde edilmesi de olasıdır.

Steinernema feltiae günümüzde kitle üretimi yapılp ticari olarak bir çok ülkede satılmakta olan bir türdür. Bu nedenle gelecekte yapılacak biyolojik mücadele

alışmalarında kolaylıkla tedarik edilmesi veya kendi imkanlarımızla üretilip kullanılması mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

- Adams, B. J., Nguyen, K. B., 2002. Taxonomy and systematics. In: Entomopathogenic Nematology (Gaugler, R. Ed.), CABI Publishing, Wallingford, pp. 1-33. UK.
- Amarasinghe, L.D., Hominick, W. M., Briscoe, B.R, Reid, A. P. 1994. Occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes (Rhabditidae: Heterorhabditidae and Steinernematidae) in Sri Lanka. **Journal of Helminthology**, 68: 277-286.
- Barbercheck, M. E., Duncan, L., 2004. Abiotic factors. In: Gaugler, R. and Bilgrami, A. L., Eds, Nematode Behaviour. CABI, pp. 309-345. Wallingford, UK,
- Bedding, R. A., Akhurst, R. J. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic Rhabditid nematodes in soil. **Nematologica**, 21: 109-110.
- Bird, A. F., Akhurst, R. J., 1983. The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. **International Journal of Parasitology**, 13: 599–606.
- Blackshaw, R. P. 1988. A survey of insect parasitic nematodes in Northern Ireland. **Nematologica**, 21: 109-110.
- Boag, B., Neilson, R., Gordon, S.C. 1992. Distribution and prevalence of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* in Scotland. **Annals of Applied Biology**, 121: 355-360.
- Boemare, N., Laumond, C., Mauleon, H. 1996. The entomopathogenic nematode-bacterium complex; biology, life cycle and vertebrate safety. **Biocontrol Science and Technology**, 6: 333-345.
- Burnell, A. M., Stock, S. P. 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts-lethal pathogens of insects. **Nematology**, 2(1): 31-42.

- Canhilal, R., Imren, M., Toktay, H., Bozbuğa, R., Çetintaş, R., Kütük, H., Özdemir, Y.E., Doğan, S. 2014. Adana ve Kahramanmaraş illerinde entomopatojen nematodların belirlenmesi. **V. Bitki Koruma Kongresi**. Pp.350, Antalya.
- Campbell, J. F., Gaugler, R. 1997. Inter-specific variation in entomopathogenic nematode foraging strategy: Dichotomy or variation along a continuum? **Fundam. Appl. Nematology**, 20: 393-398.
- Campbell, J.F., Kaya, H.K. 1999a. How and why a parasitic nematode jumps. **Nature**, 397: 485-486.
- Campbell, J.F., Kaya, H.K. 1999b. Mechanism, kinematic performance, and fitness consequences of jumping behavior in entomopathogenic nematodes (*Steinernema* spp.). **Can. Journal of Zoology**, 77: 1947-1955.
- Chen, S., Li, J., Han, X., Moens, M., 2003, Effect of temperature on the pathogenicity of entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis* spp.) to *Delia radicum*. **BioControl**, 48: 713-724.
- Choo, H.Y., Kaya, H.K., Stock, S.P. 1995. Isolation of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Korea. **Japanese Journal of Nematology**, 25: 45-51.
- Ciche, T. A., Kim, K. S., Kaufmann-Daszczuk, B., Nguyen, K. C., Hall, D. H., 2008. Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. **Applied and Environmental Microbiology**, 74: 2275-2287.
- Constant, P., Marchay, L., Fischer-LeSaux, M., Briand-Panoma, S., Mauleon, H. 1998. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Guadeloupe islands. **Fundam. Appl. Nematology**, 21: 667-672
- Del Pino, F.G., Palomo, A. 2006. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Spanish soils. **Journal of Invertebrate Pathology**, 68: 84-90.

- Ehlers, R.-U. Deseo, K.V., Stackebrandt, E. 1991. Identification of *Steinernema* spp. (Nematoda) and their symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. from Italian and German soils. **Nematologica**, 37: 360-366.
- Gaugler, R., Kaya, H. K., 1990. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- Gaugler, R., Lewis, E., Stuart, R.J. 1997. Ecology in the service of biological control: the case of entomopathogenic nematodes. **Oecologia**, 109: 483-489.
- Glazer, I. 2002. Survival biology. In: Entomopathogenic Nematology (Gaugler, R. Ed.). CABI Publishing, pp. 169-187, Wallingford, UK.
- Grant, J. A., Villani, M. G., 2003. Soil moisture effects on entomopathogenic nematodes. **Environ. Entomology**, 32: 80-87.
- Grewal, P.S., Gaugler, R., Kaya, H.K., Wusaty, M. 1993. Infectivity of the entomopathogenic nematode *Steinernema scapterisci* (Nematoda: Steinernematidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, 62: 22-28.
- Griffin, C. T., 1993, Temperature responses of entomopathogenic nematodes: implications for the success of biological control programmes. In: Nematodes and the Biological Control of Insects (Bedding, R., Akhurst, R., H. Kaya, Eds.). CSRIO Publications, pp. 115-126, East Melbourne, Australia.
- Griffin, C. T., Joyce, S. S., Dix, I., Burnell, A. M., Downes, M.J. 1994. Characterisation of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae) from Ireland and Britain by molecular and cross-breeding techniques, and the occurrence of the genus in these islands. **Fundamental Applied Nematology**, 17: 245-253.
- Griffin, C. T., Chaerani, R., Fallen, D., Reid, A. P., Downes, M. J. 2000. Occurrence and distribution of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis indica* in Indonesia. **Journal of Helminthology**, 74: 143-150.

- Gouge, D. H., Lee, L. L., Henneberry, T. J., 1999, Effect of temperature and lepidopteran host species on entomopathogenic nematode (Nematoda: Steinernematidae, Heterorhabditidae) infection. **Environ. Entomology**, 28: 876-883.
- Gözel, U., Güneş, Ç., Tunaz, H. 2007. Türkiye entomopatojen nematode faunasının belirlenmesi. **II. Bitki Koruma Kongresi**, Isparta, sayfa 184.
- Gulcu, B., Hazır, S., Kaya, H.K. 2012. Scavenger deterrent factor (SDF) from symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, pp. 326-333.
- Gungor, D. S., Keskin, N., Hazır, S., 2006, Ecological characterization of *Steinernema anatoliense* (Rhabditida: Steinernematidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, 92: 39-44.
- Han, R. C., 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.
- Hatting, J., Stock, S.P., Hazır, S. 2009. Biological diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae) in South Africa. **Journal of Invertebrate Pathology**, 102: 120-128.
- Hazır, S., Stock, S. P., Kaya, H. K., Koppenhöfer, A. M., Keskin, N., 2001, Developmental temperature effects on five geographic isolates of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, 77: 243–250.
- Hazır, S. 2002. Türkiye'deki Entomopatojen Nematodlar (Steinernematidae ve Heterorhabditidae) Üzerine Faunistik Çalışmalar. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora tezi, Ankara, Türkiye.
- Hazır, S., Keskin, N., Stock, S. P., Kaya, H. K., Özcan, S., 2003. Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Turkey. **Biodiversity and Conservation**, 12: 375-386.

- Hazir, S., Stackebrant, E., Lang, E., Ehlers, R. U., 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., Briscoe, B.R. 1990. Occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in British soils. **Parasitology**, 100: 295-302.
- 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.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R., Bollback, J.P., 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Science**, 294: 2310–2314.
- Jagdale, G. B., Gordon, R. 1998. Effect of propagation temperatures on temperature tolerances of entomopathogenic nematodes. **Fundam. Appl. Nematology**, 211: 177-183.
- Jagdale, G. B., Grewal, P. S., Salminen, S. O., 2005, Both heat-shock and coldshock influence trehalose metabolism in an entomopathogenic nematode. **Journal of Invertebrate Pathology**, 91: 988-994.
- Karagoz, M., Gulcu, B., Hazir, S., 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: 755-768.
- Kaya, H. K. 1990. Soil ecology. In: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control (Gaugler, R. and Kaya, H. K. Eds.). CRC Press, pp. 93-115, Boca Raton, FL.

- Kaya, H. K., 1993. Nematodes, nematomorphs and platyhelminthes. In: *Insect Pathology* (Kaya, H. K., Ed.). pp. 459-483.
- Kaya, H. K., Stock, S. P. 1997. Techniques in insect nematology. In: *Manual of Techniques in Insect Pathology* (Lacey, L., Ed.). Academic Press, pp. 281-324, San Diego, CA.
- Kaya, H.K., 2002. Natural enemies and other antagonists. In: *Entomopathogenic Nematology* (Gaugler, R., Ed.). CABI Publishing, pp. 189–202, Wallingford, UK.
- Kepekçi, İ., 2014. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidaematidae, Heterorhabditidae: Rhabditida). **Pakistan Journal of Nematology**, 32:59-65.
- Khan, A., Brooks, W.W., Hirschmann, H. 1976. *Chromonema heliothidis* n. gen., n. sp. (Steinernematidae, Nematoda), a parasite of *Heliothis zea* (Noctuidae, Lepidoptera), and other insects. **Journal of Nematology**, 8: 59-168.
- Klein, M.G. 1993. Biological control of scarabs with entomopathogenic nematodes. . In: *Nematodes and the Biological Control of Insects* (Bedding, R., Akhurst, R., H. Kaya, Eds.). CSRIO Publications, pp. 49-57, East Melbourne, Australia.
- Koppenhöfer, A. M., Kaya, H. K. 1999. Ecological characterization of *Steinernema rarum*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 73: 120–128.
- Koppenhöfer, A.M. 2000. Nematodes. In: *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (Lacey, L. A. and Kaya, H. K., Eds.). Kluwer. pp. 283-301, Dordrecht, The Netherlands.
- Koppenhöfer, A. M., Fuzy, E. M., 2007. Soil moisture effects on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei*, *S. glaseri*, *Heterorhabditis zealandica*, and *H. bacteriophora*. **Applied Soil Ecology**, 35: 128-139.
- Kung, S. P., Gaugler, R., 1990. Soil type and entomopathogenic nematode persistence. **Journal of Invertebrate Pathology**, 55:401-406.

- Kung, S.P., Gaugler, R., Kaya, H.K. 1991. Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. **Journal of Invertebrate Pathology**, 57: 242-249.
- Lewis, E. E., Grewal, P. S., Gaugler, R. 1995. Hierarchical order of host cues in parasit foraging: a question of context. **Parasitology**, 110: 207-213.
- Liu, J., Poinar, G. O., 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.
- Mracek, Z., Webster, J.M. 1993. Survey of Steinernematidae and Heterorhabditidae (Rhabditida: Nematoda) in western Can. **Journal of Nematology**, 25: 710-717.
- Mráček, Z., Becvar, S., Kindlmann, P., 1999. Survey of entomopathogenic nematodes from the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) in the Czech Republic. **Folia Parasitology**, 46: 145-148.
- Mracek, Z., Becvar, S. 2000. Insect aggregations and entomopathogenic nematode occurrence. **Nematology**, 2: 297-301.
- Nikdel, M., Niknam, G., Griffin, C.T., Kary, N.E. 2010. Diversity of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Steinernematidae, Heterorhabditidae) from Arasbaran forests and rangelands in north-west Iran. **Nematology**, 12: 767-773.
- Nylander, J. A. A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Orozco, R. A., Hill, T., 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: 30-39.

- Özer, N., Keskin, N., Kırbaş, Z., 1995, Occurrence of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae: Heterorhabditidae) in Turkey. **Nematologica**, 41: 639-640.
- Parkman, J.P., 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., Stock, S.P. 2009. *Heterorhabditis gerrardi* n. sp. (Nematoda:Heterorhabditidae): the hidden host of *Photorhabdus asymbiotica* (Enterobacteriaceae: Proteobacteria). **Journal of Helminthology**, 83: 309-320.
- Poinar, G. O., Jr. 1979. Nematodes for Biological Control of Insects. CRC Press Inc, Boca Raton, FL. 277p.
- Poinar, G.O, Jr. 1990. Taxonomy and biology of *Steinernema* and *Heterorhabditis*. In: Entomopathogenic Nematodes for Biological Control (Gaugler R. and Kaya H. K. Eds.). pp. 23-61, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Rosa, J., Bonifassi, E., Simoes, N., Laumond, C. 1994. Pathogenicity of an isolate of *Steinernema carpocapsae* from the Azores apparently free of *Xenorhabdus*, in Abstracts of the sixth international colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Montpellier, France, p.274.
- Rosa, J.S., Bonifassi, E., Amaral, J., Lacey, L.A, Simoes, N., Laumond, C. 2000. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernema, Heterorhabditis) in the Azores. **Journal of Nematology**, 32: 215-222.
- Saunders, J.E., Webster, J.M. 2000. Laboratory tests of the susceptibility of some forest insect pests to *Heterorhabditis megidis* H90 (Nematoda). **Journal of Invertebrate Pathology**, 76: 76-78.
- Shapiro- Ilan, D. I., Gouge, D. H., Piggott, S. J., Fife, J. P., 2006, Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. **Biological Control**, 38: 124-133.

- Susurluk, A., Dix, I., Stackebrandt, E., Strauch, W. S., Ehlers, R.- U., 2001. Identification and ecological characterisation of three entomopathogenic nematode- bacterium complexes from Turkey. **Nematology**, 3: 833- 841.
- Stock, S.P. 1995. Natural populations of entomopathogenic nematodes in the pampean region of Argentina. **Nematropica**, 25: 143-148.
- Stock, S.P., Somsook, V., Reid, A.P. 1998. *Steinernema siyamkayai* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Thailand. **Systematic Parasitology**, 41: 105-113.
- Stock, S.P., Pryor, B.M., 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., Nadler, S.A. 2001. Phylogeny of *Steinernema* Travassos, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. **Journal of Pathology**, 87: 877-889.
- Stock, S. P., Griffin, C. T., 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., 2005. Insect – parasitic nematodes: From lab curiosities to model organisms. **Journal of Invertebrate Pathology**, 89: 57-66.
- Stuart, R. J., Barbercheck, M. E., Grewal, P. S., Taylor, R. A. J., Casey, W. H. 2006. Population biology of entomopathogenic nematodes: Concepts, issues and models. **Biological Control**, 38: 80-102.
- Sturhan, D., Liskova, M. 1999. Occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes in the Slovak Republic. **Nematology**, 1: 273-277.

- Tailliez, P., Laroui, C., Ginibre, N., Paule, A., Pages, S., 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., Kaya, H.K. 1993. Insect Pathology. CA, Academic Press, San Diego, 666p.
- Thanwisai, A., Tandhavanant, S., Saiprom, N., Waterfield, N.R., Long, P.K., Bode, H.B., Peacock, S.J., Chantratita, N. 2012. Diversity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. and their symbiotic entomopathogenic nematodes from Thailand. **Plos one**, 7: 1-9.
- Thompson, J.D., Gibston, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., 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.
- Ünlü, İ. O., Ehlers, R-U., Susurluk, A. 2007. Additional data and first record of the entomopathogenic nematode *Steinernema weiseri* from Turkey. **Nematology**, 9: 739-741
- Vainio, A., Vanninen, I., Hokkanen, H. 1994. Isolation and screening of entomopathogenic nematodes in Finland (COST 812, 1990-1993). In: **Int. Colloq. Inverteb. Pathol. Microb. Control**, 6th, 28 August-2 September 1994, Montpellier, France, Abstracts, VOL. 1, P. 267.
- Wang, H., Luan, J., Dong, H., Qian, H., Cong, B. 2014. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes in Liaoning (Northeast China). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, 17: 399-406.

- Waterhouse, D. F., Norris, K. R., 1987, Biological control Pacific prospects, **Avustralian Centre for Int. Agr. Research** . p. 454.
- White, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from culture. **Science**, 66: 302-303.
- Van Luc, P., Nguyen, K.B., Reid, A.P., Spiridonov, S.E. 2000. *Steinernema tami* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from cat tien forest, Vietnam. **Russian Journal of Nematology**, 8: 33-43.
- Yilmaz, H., Waeyenberg, L., Demir, İ., Moens, M., Demirbağ, Z. 2009. A new entomopathogenic nematode species for Turkey, *Heterorhabditis megidis* Poinar, Jackson and Klein 1987 (Rhabditia: Heterorhabditiae). **Turkish journal of Agriculture and Forestry**, 33: 385-391.
- Yoshida, M., Reid, A. P., Briscoe, B. R., Hominick, W.M. 1998. Survey of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Japan. **Fundamental Applied Nematology**, 21: 185-198.
- Zhou, X.S., Kaya, H.K., Heungens, K., Goodrich-Blair, H., 2002. Response of ants to a deterrent factor(s) produced by the symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes. **Applied and Environmental Microbiology**, 68: 6202–6209.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ayşe ARİ
Doğum Yeri ve Tarihi : Erzurum 01.12.1988

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yılı : 62 Sayılı Büyükkale Tarım Kredi Kooperatifi, Tire, İzmir 2012 -

İLETİŞİM

E-posta Adresi : arzuma_321@hotmail.com

Tarih : 01.07.2014