



T.C
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BİY-YL-2007-0004

ENTOMOPATOJENİK NEMATODLARIN
(STEINERNEMATIDAE VE HETERORHABDITIDAE)
AYDIN İLİ VE ÇEVRESİNDEKİ TOPRAKLARDA TÜR
ÇEŞİTLİLİĞİ VE DAĞILIMLARININ BELİRLENMESİ

Müfide Sonay AYDIN

DANIŞMAN
Doç. Dr.Selçuk HAZIR

AYDIN-2007

**T.C
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BİY-YL-2007-0004**

**ENTOMOPATOJENİK NEMATODLARIN
(STEINERNEMATIDAE VE HETERORHABDITIDAE)
AYDIN İLİ VE ÇEVRESİNDEKİ TOPRAKLARDA TÜR
ÇEŞİTLİLİĞİ VE DAĞILIMLARININ BELİRLENMESİ**

Müfide Sonay AYDIN

**DANIŞMAN
Doç. Dr.Selçuk HAZIR**

AYDIN-2007

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Müfide Sonay AYDIN tarafından hazırlanan Entomopatojenik nematodların (Steinernematidae ve Heterorhabditidae) Aydın ili ve çevresindeki topraklarda tür çeşitliliği ve dağılımlarının belirlenmesi başlıklı tez, 04.09.2007 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Unvanı Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Doç.Dr. Selçuk HAZIR	Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye : Doç.Dr. Hatice MERGEN	Hacettepe Üniversitesi	
Üye :Yrd.Doç.Dr. Fatih Mehmet ŞİMŞEK	Adnan Menderes Üniversitesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulununsayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Unvanı, Adı Soyadı
Enstitü Müdürü

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Adı Soyadı : Müfide Sonay AYDIN

İmza :

ÖZET**Yüksek Lisans Tezi****ENTOMOPATOJENİK NEMATODLARIN (STEINERNEMATIDAE VE
HETERORHABDITIDAE) AYDIN İLİ VE ÇEVRESİNDEKİ
TOPRAKLARDA TÜR ÇEŞİTLİLİĞİ VE DAĞILIMLARININ
BELİRLENMESİ**

Müfide Sonay AYDIN

Adnan Menderes Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Selçuk HAZIR

Bu çalışma, Türkiye’de çok önemli bir tarım bölgesi olan ve daha önce entomopatojenik nematod izole edilmemiş Aydın ili ve çevresindeki entomopatojenik nematodların dağılımları ve çeşitliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışma boyunca Aydın’ın farklı bölgelerinden toplanan 82 toprak örneğinin 10 tanesinden entomopatojenik nematod elde edilmiştir. Nematod elde edilme oranı %12.1 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan 28S rRNA, D2D3 ve ITS (internal transcribed spacer) bölgelerinin dizi analizleri ile morfolojik ve morfometrik incelemelerden elde edilen verilere dayanarak, elde edilen entomopatojenik nematodlardan, 1 tane Steinernema weiseri, 2 tane Steinernema feltiae ve 7 tanesinin ise Heterorhabditis bacteriophora türüne ait olduğu tespit edilmiştir. Akdeniz ikliminin hakim olduğu Aydın ilinde yapılan bu çalışma, Heterorhabditis cinsinin Steinernema cinsine oranla sayıca daha fazla olduğunu göstermiştir.

2007, 53 sayfa**Anahtar Sözcükler**

Biyolojik Kontrol, Steinernema, Heterorhabditis, Aydın

ABSTRACT**M.Sc. Thesis****DIVERSITY AND DISTRIBUTION OF ENTOMOPATHOGENIC
NEMATODES (STEINERNEMATIDAE AND HETERORHABDITIDAE) IN
AYDIN**

Müfide Sonay AYDIN

Adnan Menderes University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Selçuk HAZIR

This study was conducted to determine the diversity and distribution of entomopathogenic nematodes in Aydin which is one of the most important agricultural city in Turkey. There has been no record about entomopathogenic nematodes from Aydin. Totally 82 soil samples were collected and 10 entomopathogenic nematode isolates were recovered. The ratio of nematode recovery was determined as 12.1%. Nematodes were identified with molecular analyses 28S rRNA, D2D3 domains and ITS regions (internal transcribed spacer) and morphometric measurements. Isolated nematodes were identified as one *Steinernema weiseri*, two *Steinernema feltiae* and seven *H. bacteriophora* species from ten isolates. This study showed that genus *Heterorhabditis* was more common than *Steinernematids* in Aydin which has Mediterranean climate.

2007, 53 pagesKey Words: Biological Control, *Steinernema*, *Heterorhabditis*, Aydin

ÖNSÖZ

Yüksek lisansa başlamama, çalışmalarımı yapacağım laboratuvarın oluşumuna bizzat katkıda bulunmama, daha önce varlığından haberdar olmadığım canlıları tanımama, bu satırları yazmama olanak sağlayan, tüm bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan tez danışmanım Doç.Dr. Selçuk HAZIR'a

FEF-07005 no'lu proje ile çalışmalarımızı destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Grubuna,

Çalışma sürecinin bazen sonuçtan daha çok şey vaat edebileceğini, her şeyin insanla daha anlamlı olduğunu öğrettiği ve öğrencilikten keyif almamı sağladığı için Amerika Birleşik Devletleri Arizona Üniversitesinden Doç. Dr. Patricia STOCK'a,

Laboratuvar ve arazi çalışmalarım sırasında benden yardımını esirgemeyen ve bu deneysel ortamın ancak deneyerek öğrenilebilecek ayrıntılarını benimle paylaştıkları için Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden doktora öğrencisi Barış GÜLCÜ ve diğer öğrenci arkadaşlarıma,

Benden maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme, hayatımın her aşamasında varlığını hep yanımda hissettiğim, mükemmel kardeş ve arkadaşım Dt. Merih ŞANLITÜRK'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
İNTİHAL BEYAN SAYFASI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ.....	v
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1 Entomopatojenik nematodlar (Steinernematidae ve Heterorhabditidae).....	5
2.1.1 Taksonomi.....	5
2.1.2 Nematodların tür teşhisinde kullanılan moleküler yöntemler.....	8
2.1.2.1 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA).....	8
2.1.2.2 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	9
2.1.2.3 DNA sekanslama hedef bölgeleri.....	9
2.1.2.3.1 Nükleer genler (çekirdeğe ait genler).....	9
2.1.2.3.2 Mitokondriyal genler.....	10
2.1.3 Entomopatojenik nematodların biyolojisi ve ekolojisi.....	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1 Toprak Örneklerinin Alınması.....	17
3.2 Topraktan Entomopatojenik Nematod İzolasyonu.....	17
3.3 Steinernematid ve Heterorhabditidlerin Tür Teşhislerinin Yapılması....	18
3.4 Morfometrik Yöntem.....	18
3.5 Moleküler Yöntem.....	19
3.5.1 Fenol-Kloroform Ekstraksiyonunun Hazırlanması.....	19
3.5.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Örneklerin Hazırlanması.....	20
3.5.3 Agoroz jel Düzeneginin Hazırlanması.....	22
3.5.4 Sekans Analizi.....	23

4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	25
5. SONUÇ.....	35
KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ.....	43

SİMGELER DİZİNİ

AG	Anüs genişliği
a oranı	Toplam vücut uzunluğunun maksimum vücut genişliğine oranı
b oranı	Toplam vücut uzunluğunun özofagus uzunluğuna oranı
c oranı	Toplam vücut uzunluğunun kuyruk uzunluğuna oranı
d oranı (%D)	Anterior son ile boşaltım deliği arasındaki mesafenin özofagus uzunluğuna oranı X 100
e oranı (%E)	Anterior son ile boşaltım deliği arasındaki mesafenin kuyruk uzunluğuna oranı x 100
ES	Baştan özofagusun kaidesine olan uzaklık
EP	Baştan boşaltım deliğine olan uzaklık
Gub.U	Gubernakulum uzunluğu
MG	Maksimum vücut genişliği
Mucro uz	Mukro uzunluğu
NR	Baştan sinir halkası sonuna olan uzaklık
SU	Spikül uzunluğu
TL	Kuyruk uzunluğu
TU	Toplam vücut uzunluğu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 Aydın ili ve çevresindeki topraklardan elde edilen entomopatojenik nematodların dağılımları.....	26
Şekil 4.2 <i>Steinernema</i> cinsine ait entomopatojenik nematodların tür dağılımını gösteren filogenetik ağaç.....	31
Şekil 4.3 <i>Heterorhabditis</i> cinsine ait entomopatojenik nematodların tür dağılımını gösteren filogenetik ağaç.....	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 <i>Steinernema</i> , <i>Neosteinernema</i> ve <i>Heterorhabditis</i> cinslerine ait tanımlanmış entomopatojenik nematod türleri.....	6
Çizelge 2.2 Entomopatojenik nematodlar (<i>Steinernematidae</i> ve <i>Heterorhabditidae</i>) ve bunlarla mutualistik yaşayan bakteri türleri.....	13
Çizelge 2.3 Entomopatojenik nematodlar ile kontrol edilen bazı zararlılar ve kullanıldıkları yerler.....	15
Çizelge 4.1 Aydın ili ve çevresindeki topraklardan elde edilen entomopatojenik nematod türleri ve habitat özellikleri.....	26
Çizelge 4.2 <i>Steinernema feltiae</i> (izolat 09-38)'nin morfometrik ölçüm (μm) sonuçları.....	27
Çizelge 4.3 <i>Steinernema weiseri</i> (izolat 09-01)'nin morfometrik ölçüm (μm) sonuçları.....	28
Çizelge 4.4. <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (izolat 09-39)'nin morfometrik ölçüm (μm) sonuçları.....	29

1-GİRİŞ

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. 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”, “entomopatojenik” ya da bazen sadece “ faydalı nematodlar” olarak adlandırılırlar (Crow, 2002).

Entomopatojenik nematodlar (Rhabditida: Steinernematidae ve Heterorhabditidae) toprakta yaşayan zararlı böcekler üzerinde son derece başarılı biyolojik kontrol ajanı olarak bilinirler ve turunçgil bahçelerinde, çilek tarlalarında, yaban mersini yetişen tarlalarda, mantar yetiştirme alanlarında ve çimenlik alanlarda yaygın olarak kullanılırlar (Grewal, et al., 2005).

Entomopatojenik nematodların formülasyon teknolojileri ve kitlesel üretimindeki ilerlemeler ile pestisit kullanımdaki zararların daha iyi anlaşılması bu nematodların bilimsel ve ticari alanda çok büyük ilgi görmesine yol açmıştır (Georgis et al., 2006).

Entomopatojenik nematodlar, biyolojik kontrol ajanı olarak birçok kimyasala göre belirli avantajlara sahiptir. Buna rağmen bazı ülkeler kendisine ait olmayan canlı tür ve izolatların dışarıdan getirilip kullanımına izin vermezler (Smart, 1995). Konak özgüllüğü yani hedef zararlının kontrolünde uygun nematodun seçilmesi şartı, bu organizmaları kimyasal insektisitlerden ayıran en temel özelliklerden birisidir (Smart, 1995).

Dünyanın neredeyse bütün bölgelerinde entomopatojenik nematodlarla ilgili çalışmalar yapılmıştır. Entomopatojenik nematod izole edilmeyen tek kıta Antartika’dır (Uribe-Lorio et al., 2005).

Amerikadaki çalışmaların çoğu Puerto Rico, Florida, Kuzey Carolina, Hawaii, New Jersey, Tennessee, Oregon ve California'da yapılmıştır (Stock et al., 1999).

Sri Lanka, Malezya, Vietnam ve Endonezya gibi Asya'nın tropikal güneydoğu ülkelerinde de birçok çalışma yapılmış ve yeni türler bulunmuştur (Stock et al., 1998; Luc et al., 2000)

Avrupa'da entomopatojenik nematodlarla ilgili çalışmalar en çok Almanya, Belçika, Çek Cumhuriyeti, Hollanda, İsveç ve İngiltere' de yapılmıştır (Spiridonov et al., 2005).

Türkiye sahip olduğu coğrafik ve ekolojik özellikleri bakımından entomopatojenik nematodların çeşitliliği ve dağılımı açısından son derece önemli bir ülkedir. Entomopatojenik nematodların Türkiye'deki dağılımları ve çeşitliliği ile ilgili ilk ayrıntılı çalışma 1999 ve 2001 yılları arasında Hazır et al., (2003) tarafından yapılmıştır. Ancak o çalışmada Ege bölgesinden sadece iki tane entomopatojenik nematod izolatu elde edilmiş ve bunların tür teşhisleri yapılmamıştır.

Bu tez çalışması için ülkemizin Ege bölgesinin önemli tarım alanlarından biri olan ve daha önce entomopatojenik nematod izole edilmemiş Aydın ili seçilmiştir. Çalışmanın amacı bu bölgedeki topraklarda yer alan olası entomopatojenik nematodların dağılımlarının ve çeşitliklerinin belirlenmesidir.

2-GENEL BİLGİ

Nematodlar ya da diğerk bir adıyla segmentsiz yuvarlak solucanlar, sayıca dünya üzerinde en fazla bulunan çok hücreli omurgasız hayvan şubesidir. Yeryüzündeki her çok hücreli beş organizmadan dördünün nematod olduğu düşünölmektedir. Nematodlar diğerk toprak solucanlarından (Annelidler) ve bilinen segmentli solucanlardan (Cestodlar) oldukça farklıdır (Crow, 2002).

Dünyada yaşayan nematod tür sayısının tahmini olarak 20 milyon olduğuna inanılmaktadır. Bunlardan sadece 25.000 civarında tür günümüzde tanımlanabilmiştir (Crow, 2002).

Nematodlar dünya üzerinde çok değışik yaşam yerlerine uyum sağlamışlardır. Denizlerde, tatlı su ortamlarında, karasal ortamlarda bazıları serbest, bazıları kommensal veya mutualistik, bazıları ise parazitik yaşar (Maggenti, 1981).

Nematodlar vücut duvarı, boşaltım sistemi, üreme sistemi, sindirim sistemi, kas ve sinir sistemine sahip olan segmentsiz canlılardır. Ancak özelleşmiş bir dolaşım ve solunum sistemleri yoktur (Kaya and Stock, 1997).

Nematodlar genelde ayrı eşeylidirler. Erkeklerin üreme sistemi ventral kısımda bulunan rektumdan oluşmuş bir kloak'a açılır. Bir ya da iki testisleri vardır. Çiftleşmeyi sağlayan bir çift spikülleri mevcuttur. Bunun yanında çiftleşmeye yardımcı olan gubernakulum adı verilen bir yapıya da sahiplerdir. Özel kaslar tarafından hareket ettirilen bu yapılar çiftleşme sırasında anüsten dışarı uzanarak dişi vulvasını açık tutar ve yan yana gelerek spermlerin akabileceğı bir kanal oluşturur. Ergin dişiler genelde vücudun orta kısmında ya da daha posterior kısımda yerleşmiş bir vulvayla dışarı açılan bir ya da iki ovaryuma sahiplerdir (Kaya and Stock, 1997).

Nematodlar hücresele olmayan elastik bir kutikula ile örtölüdürler. Nematod kutikulası abiyotik (toprak partikülü gibi) ve biyotik faktörlere (parazit, patojen ve predatör gibi) karşı bariyer olarak görev yapar. Bu kutikül yarı geçirgen bir membran olup sıvıların nematod vücudu içine ve dışına geçişine izin verir. Bu sayede nematod

ile çevresi arasında doğrudan ilişki sağlanır (Hazır, 2002). Kutikula 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 ‘Phasmidler’ denilen yapılar vardır. Bu papilla ve phasmidlerin sayı ve dizilimleri tür teşhisinde oldukça önemlidir (Hominick et al., 1997; Kaya and Stock, 1997).

Nematodlar genellikle aerobik organizmalardır. Özel bir solunum ve dolaşım sistemleri olmadığı için sahip oldukları kutikula ile dışarıdan oksijen alınır ve organlara aktarılır (Chen et al., 2004).

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

Nematodlarda boşaltım sistemi protonefridium ve alev hücreleri içermez. Boşaltım sistemleri çok basit yapıya hücre gruplarından oluşmuştur. Bu yapı serbest yaşayan formlarda ‘rennet bezi’, bir çok parazit türde ise ‘H’ ya da ‘U’ şeklindeki yan kanal sistemi şeklindedir. Nematodlarda boşaltım sistemi azotlu atıkların atılımında ve vücut boşluğunun turgor basıncını ayarlamada görevlidir (Viglierchio, 1991; Demirsoy, 1998).

Böceklerle ilişkili olan ya da parazitliğe sebep olan 30’den fazla nematod familyası vardır. Bu familyaların 7 tanesi biyolojik kontrol ajanı olarak bilinir. Bunlar Mermithidae, Allontonematidae, Neotylenchidae, Sphaerularidae, Rhabditidae, Steinernematidae ve Heterorhabditidae’dir. Toprakta yaşayan zararlılara karşı biyolojik kontrol ajanı olarak bilinen Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyaları son zamanlarda en çok ilgiyi çeken familyalardır (Stock and Hunt, 2005).

“Böcek paraziti nematodlar” ve “biyolojik kontrol sağlayan nematodlar” birbirinden farklı ifadelerdir. Gerçek parazitlik konağından beslenen parazitliktir. Buna rağmen

entomopatojenik nematodlarda durum biraz farklıdır. Biyolojik kontrol çalışmalarında kullanılan entomopatojenik nematodlar hem böcek dokusuyla hem de mutualistik ilişkili oldukları bakterilerle beslenirler. Aslında konağı öldüren gerçek parazit bakteridir. Çünkü patojeniteye bu bakteriler sebep olur. Doğrudan böcek paraziti olan nematodlar da vardır. Örneğin Mermiidler çekirge, hamamböceği ve sivrisinek parazitidir. Bu nematodlar sadece konak dokuları üzerinden beslenirler ve üretilmeleri için canlı böceklere ihtiyaç vardır. Bu ise etkili ve ucuz bir üretim yolu değildir. Biyolojik kontrol sağlayan entomopatojenik nematodlar ise özel nematod üretim tanklarında bakterilerle beslenmek suretiyle üretilebilirler. Dolayısıyla bu nematodların üretimi oldukça kolay ve daha ucuzdur (Crow, 2002).

2.1 ENTOMOPATOJENİK NEMATODLAR (STEINERNEMATIDAE VE HETERORHABDITIDAE)

2.1.1 Taksonomi

Blaxter ve arkadaşlarının (1998) moleküler filogenetik verilere dayanarak hazırladıkları taksonomik duruma göre entomopatojenik nematodların sınıflandırılması aşağıdaki gibidir.

Phylum: Nematoda

Class: Chromadorea

Subclass: Chromadoria

Order: Rhabditida

Suborder: Tylenchina

Superfamily: Strongyloidea

Family: Steinernematidae

Suborder: Rhabditina

Superfamily: Strongyloidea

Family: Heterorhabditidae

Günümüze kadar iki entomopatojenik nematod familyasına (Steinernematidae ve Heterorhabditidae) ait 3 cinse (Steinernema, Heterorhabditis ve Neosteinernema) bağlı bulunan 69 tür tanımlanmıştır(Çizelge 2.1).

Günümüz nematod sistematik çalışmalarında morfolojik ölçümler, moleküler analizler ve elektron mikroskop incelemeleri bir arada değerlendirilmektedir. Morfolojik çalışmalar sırasında en çok kullanılan yapılardan birisi ilk jenerasyon erkek nematodlara ait spikül ve gubernakulum yapılarının şekil ve pozisyonlarıdır. Aynı zamanda kuyruk tarafında bulunan papilla ve phasmidlerin sayısı ve dizilimleri tür teşhisinde oldukça önemlidir (Kaya and Stock, 1997; Stock et al., 2000).

Çizelge 2.1 *Steinernema*, *Neosteinernema* ve *Heterorhabditis* cinslerine ait tanımlanmış entomopatojenik nematod türleri

Nematod Türü	Kaynak
Genus: <i>Steinernema</i>	Travassos, 1927
<i>Steinernema kraussei</i>	(Steiner, 1923) Travassos, 1927
<i>S.abbasi</i>	Elawad et al., 1997
<i>S.aciari</i>	Qiu et al., 2005
<i>S.affine</i>	(Bovien, 1937) Wouts et al., 1982
<i>S.akhursti</i>	Qui, Hu, Zhou, Pang and Nguyen, 2005
<i>S.anatoliense</i>	Hazir et al., 2003
<i>S.arenarium</i>	(Artyukhovsky, 1967) Wouts et al., 1982
<i>S.ashiunense</i>	Phan, Nguyen, 2006**
<i>S.asiaticum</i>	Anis et al., 2002
<i>S.apuliae</i>	Triggiani et al., 2004
<i>S.beddingi</i>	Qui, Hu, Zhou, Pang and Nguyen, 2005
<i>S.bicornutum</i>	Tallosi et al., 1995
<i>S.carpocapsae</i>	(Weiser, 1955) Wouts et al., 1982
<i>S.caudatum</i>	Xu et al., 1991
<i>S.ceratophorum</i>	Jian et al., 1997
<i>S.costaricense</i>	Uribe-Lorio, Mora and Stock, 2006**
<i>S.cubanum</i>	Mráček et al., 1994
<i>S.diaprepesi</i>	Nguyen and Duncan, 2002
<i>S.feltiae</i>	(Filipjev, 1934) Wouts et al., 1982
<i>S.glaseri</i>	(Steiner, 1929) Wouts et al., 1982
<i>S.guangdongense</i>	Qiu et al., 2004
<i>S.intermedium</i>	(Poinar, 1985) Mamiya, 1988
<i>S.hermaphroditum</i>	Stock, GriYn and Chaenari, 2004
<i>S.jolietii</i>	Spiridonov et al., 2004
<i>S.karii</i>	Waturu et al., 1997
<i>S.krausseri</i>	Steiner, 1923
<i>S.kushidai</i>	Mamiya, 1988
<i>S.litorale</i>	Yoshida, 2004
<i>S.loci</i>	Phan et al., 2001a
<i>S.longicaudum</i>	Shen and Wang, 1991
<i>Syn.S. serratum</i>	Liu, 1992

<i>S.monticolum</i>	Stock et al., 1997
<i>S.neocurtillae</i>	Nguyen and Smart, 1992
<i>S. oregonense</i>	Liu and Berry, 1996b
<i>S. pakistanense</i>	Shahina et al., 2001
<i>S. puertoricense</i>	Román and Figueroa, 1994
<i>S.puntauvense</i>	Uribe-Lorio, Mora and Stock, 2006**
<i>S.rarum</i>	(de Doucet, 1986) Mamiya, 1988
<i>S. riobrave</i>	Cabanillas et al., 1994
<i>S. ritteri</i>	de Doucet and de Doucet, 1990
<i>S. robustispiculum</i>	Phan et al., 2005
<i>S.sangi</i>	Phan et al., 2001b
<i>S.scapterisci</i>	Nguyen and Smart, 1990
<i>S.scarabaei</i>	Stock and Koppenhöfer, 2003
<i>S.serratum</i>	Liu, 1992 †
<i>S.siamkayai</i>	Stock et al., 1998
<i>S.silvaticum</i>	Sturhan, Spiridonov and Mracek, 2005
<i>S.tami</i>	Van Luc et al., 2000
<i>S.thanhi</i>	Phan et al., 2001a
<i>S.thermophilum</i>	Ganguly and Singh, 2000
<i>S.websteri</i>	Cutler and Stock, 2003
<i>S.weiseri</i>	Mráček et al., 2003
<i>S.thermophilum</i>	Ganguly and Singh, 2000
<i>S.yirgalomense</i>	Nguyen, Tesfamarian, Gozel, Gaugler and Adams
Genus: Neosteinernema	Nguyen and Smart, 1994
<i>Neosteinernema longicurvicauda</i>	Nguyen and Smart, 1994
Genus: Heterorhabditis	Poinar, 1976
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Poinar, 1976
<i>H.heliothidis</i>	(Khan et al., 1976) Poinar et al., 1977
<i>H.argentinensis</i>	Stock, 1993
<i>H.baujardi</i>	Phan et al., 2003
<i>H.brevicaudis</i>	Liu, 1994a
<i>H.downesi</i>	Stock et al., 2002
<i>H.indica</i>	Poinar et al., 1992
<i>Syn.H. hawaiiensis</i>	Gardner et al., 1994
<i>H.marelatus</i>	Liu and Berry, 1996a,b,c
<i>Syn. H. hepialius</i>	Stock et al., 1996
<i>H.megidis</i>	Poinar et al., 1987
<i>H.mexicana</i>	Nguyen et al., 2004
<i>H.poinari</i>	Kakulia and Mikaia, 1997a
<i>H.taysearae</i>	Shamseldean et al., 1996
<i>H.zealandica</i>	Poinar, 1990
<i>H.floridensis</i>	Khoun B. Nguyen, 2006
<i>H.amazonensis</i>	Andalo et al., 2006

* tip tür † tam olarak teşhis yapılmamış ** tanımlanmış olan türler basımda
(Nishimura et al., 1994; He et al., 2000; Koppenhöfer, 2000)

2.1.2 Nematodların tür teşhisinde kullanılan moleküler yöntemler

Tanımlanmış tür sayısının artmasıyla birlikte geleneksel olarak kullanılan morfometrik yöntemler entomopatojenik nematodların teşhisinde ve taksonomisinde yetersiz kalmıştır. Bu yüzden nematodlarda tür teşhisinde morfometrik ölçümler ve moleküler analizler birlikte kullanılmaktadır. Morfometrik yöntemin yeterli olmama sebepleri; a- Türler arasında yeteri kadar morfometrik farklılıkların olmaması b- Tür tanımlanmasında kullanılan karakterlerin çoğu sadece teşhis için kullanıldığında ve filogenetik bilgi az olduğunda daha anlamlıdır.

Tür tanımlanmasında kullanılan bir diğer yöntem de çiftleştirme testleridir. Nematodların tür tanımlanmasında çiftleştirme testleri genellikle pek tercih edilmez. Bunun en önemli sebebi zaman ve emek isteyen bir iş olmasıdır. Sonuçların evrimsel bir anlam taşıması gerektiği için çiftleştirme testleri tek başına anlamlı değildir. Aynı zamanda Steirnermatidlerde hefmafroditizm'in keşfedilmesiyle (Griffin et al., 2001) aynı grup içindeki türlerin doğruluğunu test etmek ve bunun için yapılan hibridizasyon uygulamalarını değerlendirmek oldukça zordur. Tüm bu zorlukların üstesinden gelmek için morfometrik yöntemlere ilaveten bir dizi moleküler yöntem kullanılmaktadır (Stock and Hunt, 2005).

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

2.1.2.1 RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA)

RAPD-PCR yöntemi *Heterorhabditis* ve *Steinernema* türlerinin teşhisinde kullanılan ilk yöntemdir. Günümüzde de halen *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 and Hunt, 2005).

2.1.2.2 RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

Restriksiyon enzimleri ve PCR-RFLP *Steinernematid* ve *Heterorhabditis*'ler için iyi bir yöntem olarak bilinir ve özellikle de *Steinernema* türlerinin ayırımında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Stock and Hunt, 2005). *Steinernema* türlerinin teşhisinde kullanılan 17 tane restriksiyon enzim 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 and 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 and Hunt, 2005).

2.1.2.3 DNA sekanslama hedef bölgeleri

2.1.2.3.1 Nüklear genler (çekirdeğe ait genler)

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

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

2.1.2.3.2 Mitokondriyal genler

Günümüzde, nematodlarda türler arasındaki ve içindeki 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 tarafından çalışılmıştır. Bu bölgeler tür seviyesindeki varyasyonları ve seçilmiş *Steinernema* türleri arasındaki ayrımı iyi bir şekilde göstermiştir. Buna rağmen birkaç *Steinernema feltiae* populasyonu ile çalıştıklarında tür içi seviyedeki varyasyonları göstermede başarısız olmuşlardır (Stock and Hunt, 2005).

2.1.3 Entomopatojenik nematodların biyolojisi ve ekolojisi

Nematodların sebep olduğu parazitizmde, nematodlar böcek konakları üzerinde birçok farklı zararlı etkiye sahiptir. Bunlar; kısırlaştırma, doğurganlığı, yaşam süresini ve avcudan kaçma aktivitesini azaltma, gelişmeyi geciktirme ya da davranışsal, fizyolojik ve morfolojik bozukluklar gibi olumsuz etkilerdir (Kaya and Stock, 1997).

Böceklerdeki enfeksiyonu, morfolojik ve fizyolojik açıdan toprakta uzun süre kalabilmeye uyum sağlamış olan infektif juveniller gerçekleştirir. Infektif juvenillerin rolü uygun bir konağın yerini bulmaktır. Konağın yerini bulmaya yardım eden iyi gelişmiş amfidlere ve baş bölgesinde papillara sahiplerdir. Hayatta kalma süreleri nematod türüne (fizyolojik adaptasyon) ve ortamın fiziksel şartlarına bağlıdır. Infektif juveniller hayatta kalmak için bir takım morfolojik adaptasyonlar kazanmışlardır. Örneğin, bağırsak kanalları ve farinks kapalı olduğu için sindirim sistemleri işlevsel değildir. Böylece sindirim sistemi boşluğu indirgenmiştir. Aynı zamanda ağız ve anüs kapalıdır. Aylarca beslenmeden yaşayabilecek biyolojik bir döneme girerek canlı kalabilirler. Bu durum nematodlar için en önemli hayatta kalma stratejisidir. Steinernematidler konak hemosölüne, böceğin sadece doğal açıklıklardan girerler (ağız, anüs ve spirakıl). Buna rağmen Heterorhabditler bir çift dorsal dişe (bazen iki daha küçük subventral) ya da kanca şeklinde yapıya sahip

oldukları için böceğin dış kutikulasını delerek doğrudan da girebilirler. İnfektif juveniller böceğin içine girdikten sonra taşıdıkları mutualistik bakterileri böceğin hemosölüne salarlar. Bakteriler girdikleri böcek dokusu içinde hızla çoğalır ve ürettikleri toksinle böceği birkaç gün içinde öldürürler (genelde 48 saat). Nematodlar hem üreyen mutualistik bakterilerin kendisiyle hem de bu bakterilerin uygun hale getirdiği böcek dokusuyla beslenir. Erginleşen nematodlar çiftleşir ve konak içinde ürerler. Böylece böceğin içi nematodlarla dolar ve infektif juveniller besin kalmayınca başka konak bulmak için kadavradan dışarı çıkarlar. Nematodlar konağın büyüklüğüne göre bir, iki ya da daha fazla jenerasyon geçirebilirler (Gaugler and Kaya, 1990).

Steinernema ve *Heterorhabditis* cinsleri arasındaki temel farklardan biri infektif evreyi oluşturan süreçteki gelişim şekilleridir. *Steinernema*'larda infektif juveniller genelde ayrı eşeyli olup, dişi ve erkeklere gelişirler. *Heterorhabditis*'lerde ise her bir infektif juvenil hermafrodit bir dişi bireye gelişir. Bunlarda sadece ikinci jenerasyonda erkek ve dişi bireyler ortaya çıkar (Gaugler and Kaya, 1990).

Oda sıcaklığında birçok Steinernematid için yaşam döngüsü yani enfeksiyondan sonra infektif juvenillerin ortaya çıkmasına kadar geçen süre, 7 ile 10 gün arasında değişir. *Heterorhabditis*'lerde ise bu süre 12- 15 gün kadardır (Bedding et al., 1994).

Yapılan çalışmalarda *Steinernema* cinsine ait infektif juvenillerin *Xenorhabdus* spp., *Heterorhabditis* juvenillerinin ise *Photorhabdus* spp. bakterileriyle mutualistik ilişkili oldukları bulunmuştur (Gaugler, 2002). *Steinernema* ve *Heterorhabditis* türleriyle ilişkili olan bakteriler Çizelge 2.2'de verilmiştir. Bu bakteriler sadece biyolojik kontrol ajanı entomopatojenik nematodlarda bulunur. Sadece III. evre juveniller diğer bir deyimle infektif juveniller mutualistik bakterileri taşırlar. *Steinernema* infektif juvenillerinde bakteriler, özofagusun arka kısmında bir kese içinde bulunurlar. *Heterorhabditis*'lerde böyle bir kese yoktur. Bakteriler bağırsağın 1/3'lik kısmında daha çok uç tarafta yoğun olarak bulunurlar. *Photorhabdus* türleri biyolojik ışımaya yapabilirler. Bu nedenle *Heterorhabditis*'le enfekte olmuş bir larva karanlık bir ortamda parlak görülür (Boemare, 2002).

Xenorhabdus ve *Photorhabdus*, entomopatojenik nematodlarla mutualistik olarak yaşayan Enterobacteriaceae familyasına ait gram negatif bakterilerdir. Her iki bakteri de fakültatif anaerob ve çubuk morfolojilidir. Nitratı nitrite indirgeyemezler. İki bakteri cinsi arasındaki fark *Photorhabdus* bakterilerinin biyolojik ışığa yapabiliyor; *Xenorhabdus*'ların yapamıyor olmasıdır. Ayrıca *Xenorhabdus* katalaz bakımından negatif, *Photorhabdus* ise katalaz bakımından pozitifdir. Bu bakterilerin en yakın oldukları cins *Proteus*'tur (Boemare, 2002).

Bakterilerde Faz-I ve Faz-II olmak üzere iki temel faz vardır Faz-I nematod gelişimi için en ideal fazdır. Bunlar diğer mikroorganizmaların konaktan faydalanmaması için çeşitli tipte antibiyotikler üretir (Gaugler and Kaya, 1990).

Çizelge 2.2 Entomopatojenik nematodlar (Steinernematidae ve Heterorhabditidae) ve bunlarla mutualistik yaşayan bakteri türleri

Mutualistik bakteri	İzole edilen nematod türü	Kaynak
<i>X. nematophila</i>	<i>S. carpocapsae</i>	(Poinar and Thomas, 1965) Thomas and Poinar, 1979
<i>X. bovienii</i>	<i>S. affine</i> , <i>S. feltiae</i> , <i>S. intermedium</i> , <i>S. kraussei</i>	(Akhurst, 1983)
<i>X. poinarii</i>	<i>S. glaseri</i> , <i>S. cubanum</i>	(Akhurst, 1983)
<i>X. beddingii</i>	<i>S. longicaudum</i>	(Akhurst, 1986) Akhurst and Boemare (1993)
<i>X. japonica</i>	<i>S. kushidai</i>	Nishimura et al., 1994
<i>X. budapestensis</i>	<i>S. bicornutum</i>	Lengyel et al., 2005
<i>X. ehlersii</i>	<i>S. serratum</i>	Lengyel et al., 2005
<i>X. innexi</i>	<i>S. scapterisci</i>	Lengyel et al., 2005
<i>X. szentirmaii</i>	<i>S. rarum</i> (Cordoba, Argentina)	Lengyel et al., 2005
<i>P. luminescens</i>	<i>H. bacteriophora</i> Brecon	(Thomas and Poinar, 1979) Boemare et al., 1993
<i>P. luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	<i>H. indica</i>	Fischer-Le Saux et al., 1999
<i>P. luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i>	<i>H. bacteriophora</i> HP88	Fischer-Le Saux et al., 1999
<i>P. temperata</i>	<i>H. zealandica</i> , <i>H. bacteriophora</i> NC1, <i>H. megidis</i> (Neoarctic izolat)	Fischer-Le Saux et al., 1999
<i>P. temperata</i> subsp. <i>temperata</i>	<i>H. megidis</i> (Palearctic izolat)	Fischer-Le Saux et al., 1999
<i>P. luminescens</i> subsp. <i>kayaii</i>	<i>H. bacteriophora</i>	Hazir et al., 2004
<i>P. luminescens</i> subsp. <i>thracensis</i>	<i>H. bacteriophora</i>	Hazir et al., 2004

Diğer biyolojik kontrol ajanları gibi Steinernematid ve Heterorhabditidler laboratuvarında geniş bir böcek grubuna karşı etkilidirler. Bu etkileşim optimal çevre şartları ve hiçbir ekolojik ya da davranışsal sınırların olmadığı laboratuvar şartları gibi ortamlarda gerçekleşir (Kaya and Gaugler, 1993). Buna en iyi örnek ağaç yapraklarıyla beslenen kelebek larvalarıdır. Bu böcekler petri kaplarında enfeksiyona oldukça hassastırlar ama doğada nadiren etkilenirler. Çünkü nematodlar çevresel şartlardan olumsuz yönde etkilenirler. Örneğin kuruma, radyasyon ve sıcaklık

nematodlar üzerinde etkili olan abiyotik faktörlerden birkaçıdır (Kaya and Gaugler, 1993).

Toprak, entomopatojenik nematodların doğal yaşam ortamlarıdır ve toprak içerisindeki zararlı böceklerle karşı yapılacak başarılı bir biyolojik kontrol uygulaması için büyük avantaj sağlarlar (Shapiro-Ilan et al., 2005). Entomopatojenik nematodlar, toprak üzerindeki canlılara etkili değildir ve toprak içerisinde konaklarını, ürettikleri CO₂ 'le bulurlar (Hazır, 2002).

Bazı Steinernematid ve Heterorhabditidler poliokseniktirler. Örneğin *S.carpocapsae* laboratuvar koşullarında farklı ordolardan 250'den fazla böcek türünü enfekte etmiştir (Poinar, 1979). Benzer olarak *H. bacteriophora* da geniş bir konak dağılımı gösterir (Hazır, 2002).

Bütün entomopatojenik nematodların farklı böceklerin mücadelesinde etkinlikleri eşit değildir. Herhangi bir entomopatojenik nematodun belirli bir böceği enfekte etme yeteneği böcek ve nematodun davranışı, fiziksel engeller ve immun cevaplarla belirlenir (Crow, 2002). *S. scapterisci* Orthoptera grubuna özellikle de *Gryllotalpidae* üyelerine adapte olmuştur (Grewal et al., 1993; Parkman and Smart, 1996). *S. kushidai* ise daha çok Scarabeidae larvalarına adapte olmuş bir türdür (Mamiya, 1989; Tanada and Kaya, 1993). Çizelge 2.3'te entomopatojenik nematodlarla kontrol edilebilen bazı zararlılar verilmiştir.

Çizelge 2.3 Entomopatojenik nematodlar ile kontrol edilen bazı zararlılar ve kullanıldıkları yerler.

Uygulama alanı	Zararlı	Nematod türü
Çilek, kiraz,vb.	Maymuncuklar (Örn: <i>Otiorhynchus spp.</i>)	<i>H. bacteriophora</i>
Turunçgil	Maymuncuklar (Örn: <i>Diaprepes abbreviatus</i>).	<i>S. riobravisi</i>
Mantar	Mantar sinekler (Örn: <i>Lycoriella sp.</i>) <i>Bradysia sp.</i>	<i>S. feltiae</i>
Süs bitkileri	Maymuncuklar (Örn: <i>Otiorhynchus spp.</i>)	<i>H. bacteriophora, H. megidis</i>
	Odun böcekleri(Örn: <i>Capnodis spp.</i>)	<i>S. carpocapsae, H. bacteriophora</i>
Çim	Manas larvası	<i>H. bacteriophora</i>
	Danaburnu (Örn: <i>Grylotalpa grylotalpa</i>)	<i>S. riobravisi, S. scapterisci</i>
	Bozkurtlar, (Örn: <i>Agrotis segetum</i>)	<i>S. carpocapsae</i>

Doğal düşmanlar bütün organizmalar için populasyon ekolojisinde önemli bir faktördür. Toprakta yaşayan entomopatojenik nematodların populasyonu bakteriler, funguslar, akarlar predatör nematodlar ve toprakta yaşayan diğer organizmalarla azalır. Sterilize edilmiş toprakta hayatta kalma süresi sterilize edilmemiş olana göre daha uzundur. Akarlar bilinen en iyi nematod predatörleridir (Kaya, 2002).

Toprağa nematod uygularken dikkat edilmesi gereken en önemli faktör nematod kurumadan ve UV den zarar görmeden hızlı bir şekilde yüksek konsantrasyonda suyla birlikte toprağa vermektir (Bedding et al., 1994).

Steinernematid ve Heterorhabditidleri etkileyen abiyotik faktörler; nem, sıcaklık, UV, toprak yapısı, oksijen, pH ve tuzluluk gibi faktörlerdir (Kung et al., 1990).

Nem, nematodların canlı kalmasındaki en önemli faktördür. Nematodlar hareket edebilmek için suya ihtiyaç duyarlar. Sıcaklık ise entomopatojenik nematodların gelişimini, üremesini ve infektivitesini etkileyen önemli ikinci faktördür. Genelde Steinernematidler düşük sıcaklıklara, Heterorhabditidler ise yüksek sıcaklıklara daha iyi adaptasyon gösterirler. Entomopatojenik nematodlar düşük ve yüksek sıcaklık derecelerinde inaktiftirler (Grewal et al., 1994; Mracek and Webster, 1993).

Entomopatojenik nematodlar çoğunlukla kumlu ve kumlu-tınlı topraklardan elde edilmişlerdir. Nematodlar killi topraklarda az bulunur. Bunun sebebi killi toprakların daha az boşluğa ve dolayısıyla daha düşük oksijene sahip olmasıdır (Portillo-Aguilar, et al., 1999).

Nematodlar için en uygun toprak pH değeri 4-8 arasındadır (Kung et al., 1990).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 TOPRAK ÖRNEKLERİNİN ALINMASI

2006-2007 yılları arasında Aydın ili ve çevresinde arazi çalışması yapılarak toprak örnekleri alınmıştır. Örnek alınan yerler rastgele seçilmiştir. Toprak alımında yüzeyden başlayıp 15- 20 cm'lik derinliğe kadar olan bölge tercih edilmiştir (Mracek and Becvar, 2000). Alınan örnekler arasında en az 10 km'lik bir mesafe bırakılmıştır. Seçilen alanda aralarında yaklaşık 5-6 metre mesafe olan bir üçgen oluşturularak toplam 3 ayrı örnek alınmıştır. Aynı alandan alınan bu örnekler karıştırılarak elde edilen karışımın içerisinde yaklaşık 1 kg kadar toprak alınmıştır. Örnek alma işleminde kullanılan alet her toprak alımından sonra % 70'lik etil alkolle steril edilmiştir (Stock et al., 1999). Toprak örneği alınan bölgenin adı, yüksekliği, vejetasyon tipi, toprak sıcaklığı ve GPS koordinatları kaydedilmiştir. Her toprak örneğine bir kod numarası verilerek etiketlenmiştir. Alınan toprakların kurumasını önlemek için örnekler plastik torbalar içerisinde buzluklara yerleştirilmiştir (Kaya and Stock, 1997; Stock et al., 1999; Mracek and Becvar, 2000).

3.2 TOPRAKTAN ENTOMOPATOJENİK NEMATODLARIN İZOLASYONU

Araziden toplanıp laboratuvara getirilen toprak örnekleri 250 ml hacimli plastik kaplara aktarılmıştır. Hazırlanan her bir toprak örneği içerisinde 5'er tane Büyük Mum Güvesi *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) son evre larvaları konulmuştur (Lopez-Nunez et al., 2007; Simard et al., 2007). Deney kapları 23-24°C'lik oda sıcaklığında beklemeye alınmıştır. Konulan larvaların enfekte olup olmadığını anlamak için 3'er gün arayla bu kaplar toplam 15 gün süresince kontrol edilmiştir (Hazır et al., 2003). Bu süre içerisinde enfekte olan larvalar topraktan çıkarılarak White trap (White, 1927) adı verilen ortama alınmışlardır. White trap, nematodlarla enfekte olmuş larvadaki infektif juvenillerin toplanması için hazırlanmış olan bir sistemdir. Bu sistem iç içe geçmiş iki petri kabından oluşur. İçte filtre kağıdı olan küçük petri dışta ise nematodların çıkması için su dolu olan büyük petri bulunur. Enfekte olan bu larvalar filtre kağıdı üzerine yerleştirilir ve büyük olan petrinin

kapağı kapatılır. Yeni nesil nematodlar, filtre kağıdının olduğu küçük petriyi terkedip büyük olan petri kabındaki suya geçerler. Böylece bu su alınarak nematodların infektif juvenil evreleri elde edilmiş olur (Kaya and Stock, 1997; Koppenhöfer and Kaya, 1999).

Elde edilen infektif juveniller yüzeylerinin temizlenmesi için cam bir beher içerisine alınmış ve üzerlerine steril distile su eklenmiştir. Nematodlar dibe çöktükten sonra üstteki distile su uzaklaştırılıp yerine yeniden steril distile su ilave edilmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlanmış ve böylece nematodların yüzeyleri yıkanmıştır. Temizlenen bu nematodlar özel saklama kaplarına alınarak 10 ve 15 °C'lik iklim dolaplarında saklanmıştır (Kaya and Stock, 1997; Koppenhöfer and Kaya, 1999).

3.3 STEINERNEMATİD VE HETERORHABDİTİDLERİN TÜR TEŞHİSLERİNİN YAPILMASI

Elde edilen entomopatojenik nematodların tür teşhis işlemleri için morfolojik ve morfometrik yöntemlerin yanı sıra moleküler teknikler de kullanılmıştır.

Moleküler çalışmalarda sekans analizleri için Steinernematidlerde 28S rDNA'nın büyük alt ünitesi (LSU), Heterorhabditidler içinse ITS (internal transcribed spacer) bölgesi kullanılmıştır. Sekans sonuçları Gen Bankasında mevcut olan diğer türlere ait sekanslarla karşılaştırılmıştır. Tüm izolatlar Stock et al., (2007) uygun olarak Arizona Üniversitesinde moleküler yöntemle analiz edilmiştir.

3.4 MORFOMETRİK YÖNTEM

Entomopatojenik nematodların tür teşhisi yapılırken morfometrik ölçümlerde infektif juveniller ve ilk jenerasyona ait erkek nematodlar kullanılmıştır (Hominick et al., 1997; Kaya and Stock, 1997). Her *Steinernema* cinsine ait nematod izolatu için birinci jenerasyona ait ergin erkekler ile infektif juvenillerden 20 örneğin ölçümü yapılmıştır (Hazir et al., 2003)

Morfometrik ölçümler Amerika Birleşik Devletleri Arizona Üniversitesi Plant Pathology bölümünde Dr. Patricia Stock'un laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

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 özofagus kaidesine olan uzaklık (ES), kuyruk uzunluğu (TL), anüs genişliği (AG), "a" oranı (toplam vücut uzunluğunun maksimum vücut genişliğine oranı), "b" oranı (toplam vücut uzunluğunun özofagus uzunluğuna oranı), "c" oranı (toplam vücut uzunluğunun kuyruk uzunluğuna oranı), "d" oranı (%D) (anterior sonu ile boşaltım deliği arasındaki mesafenin özofagus uzunluğuna oranı X 100), dır "e" oranı (%E) (anterior sonu ile boşaltım deliği arasındaki mesafenin kuyruk uzunluğuna oranı X 100) dır. Bunlara ilaveten erkek nematodlar için spikül uzunluğu (SU), gubernaculum uzunluğu (Gub.U), genital papillaların sayısı ve dizilimleri de göz önüne alınmıştır (Hominick et al.1997; Kaya and Stock, 1997).

3.5 MOLEKÜLER YÖNTEM

3.5.1 Fenol-Kloroform ekstraksiyonunun hazırlanması

Nükleik asit amplifikasyonu için, *Heterorhabditis* izolatları için 7-8 günlük; *Steinernema* izolatları içinse 3-4 günlük enfekte olmuş *Galleria* larvaları parçalanarak dişi ve erkek nematodlar elde edilmiştir. Elde edilen bu nematodlar 1.7 ml'lik eppendorf tüplerine alınıp üzerine lizis tamponu ilave edilmiştir.

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 50°C'lik sıcak su banyosunda bir gece 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.

Eğer parçalanma tam olarak gerçekleşmiş ise örnekler bir gün süreyle +4 °C'de buzdolabında 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 metaryal 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).

3.5.2 Polimeraz zincir reaksiyonu için örneklerin hazırlanması

PCR, DNA molekülleri topluluğunda, özgül hedef DNA dizilerinin doğrudan çoğaltılmasına dayanır ve bu yöntemin uygulanabilmesi için çok az miktarda DNA bile yeterlidir. Bir PCR reaksiyonunda 25-30 döngü yeterlidir. Bir döngü 4-5 dakika sürer. 25-30 döngü sonunda, DNA miktarında yaklaşık 1,000,000 kez artma olur.

İşlem, thermocycler (ısı döngücüsü) denilen makinelerde, önceden döngü sayısı ve sıcaklıkları belirlenen programlarla, otomatik olarak gerçekleştirilir.

PCR üç temel basamaktan oluşur

- Çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir (90-95°C' de, yaklaşık 5 dakika).
- Primerler tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanır (50-70°C' de 15-30 nükleotit uzunluğunda).
- DNA polimerazın ısıya dayanıklı bir şekli, nükleotitleri 5' den 3' ne doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur (70-75°C).

PCR'nin Temel Bileşenleri

- Kalıp DNA
- DNA polimeraz enzimi
- Primerler
- dNTP karışımı
- Tampon ve MgCl₂

(Temizkan ve Arda, 2003)

1. Buzdolabından çıkarılan DNA tüpleri kısa bir vorteksdan sonra 30 sn süreyle santrifüjlenmiştir.
2. Her bir örnek için 0.2 µl'lik özel PCR tüpleri kullanılmıştır.
3. Her bir 0.2 µl'lik boş ependorf tüpüne;

Heterorhabditisler için,

7.0 µl steril distile H₂O

12.5µl Red taq

1.25µl Primer 93

1.25µl Primer 94

94 (forward) 5'- TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3'
 93 (reverse) 5'-TTGAACCGGGTAAAAGTCG-3' (Ellis et al.,1986; Stock et al,2001).

Steinernematidler için;

7.0 µl steril distile H₂O

12.5µl Red taq

1.25µl Primer 391

1.25µl Primer 501

391 (direct) 5'-AGCGGAGGAAAAGAACTAA-3'

501 (reverse) 5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3'

eklenmiş ve bu maddeler vorteks ile karıştırılmıştır.

5. PCR için gerekli maddelerin eklendiği bu tüplerin her birine önceden elde edilen DNA'dan 3µl ilave edilmiştir.

6. Hazır hale gelen tüpler PCR aletine yerleştirilmiş ve Heterorhabditisler için, ITS-60°C'lik program, *Steinernematidler* için; 28S-52°C'lik program seçilerek işlem başlatılmıştır.

3.5.3 Agaroz jel düzeneğinin hazırlanması

%1.3'lük Agaroz jel hazırlamak için;

0.36 gr Agaroz (Omnipur)

28 ml 1X TBE kullanılmıştır.

Agaroz eritilerek hazırlandıktan sonra içerisinde 1X TBE tamponu bulunan jel tankına dikkatlice aktarılmıştır. Jel yaklaşık 20 dakika süreyle donmaya bırakılmış ve bu arada PCR'dan çıkan tüpler buz içerisine konulmuştur.

Jel yüklemek için hazır hale geldiğinde içerisinde;

3µl steril distile H₂O

2µl Tracking dye (mavi renkli yükleme boyası)

2µl DNA

bulunan her bir örnek için yeni 0.2µl'lik tüpler hazırlanmıştır. Bu tüplerin yanı sıra bir de DNA ladder hazırlanmıştır. Bunun içerisinde de;

4 µl steril distile H₂O

2µl Tracking dye

1µl DNA ladder (farklı uzunluktaki DNA fragmanlarından oluşan kullanıma hazır referanslar) ilave edilmiştir.

Hazırlanan bu tüpler önce vorteklenip daha sonra 15 sn süreyle santrifüj edildikten sonra agaroz jel'in her kuyucuğa 7 µl olacak şekilde yükleme yapılmış ve yürütme tankının kapağı kapatılıp voltaj 100-103 volta ayarlanmıştır. Yaklaşık 45 dakika süreyle beklendikten sonra içinde tampon bulunan jel içinde 33µl Ethidium Bromide bulunan bir kaba aktarılmış ve kap çalkalayıcı üzerine yerleştirilmiştir. 15 dakika süreyle bu ortamda bekleyen jel içerisinde sadece distile su bulunan başka bir kaba aktarılıp tekrar 15 dakika süreyle çalkalayıcı üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra Ethidium Bromide içeren jel'e temas etmeden jel, ultraviole (UV) aleti üzerine yerleştirilmiş ve karanlık bir ortamda görüntülenmiştir.

Moleküler düzeyde yapılan çalışmalar Arizona Üniversitesi Plant Pathology bölümünde Dr. Patricia Stock'la birlikte gerçekleştirilmiştir.

3.5.4 Sekans analizi

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

10 µl PCR ürünü

4 µl exoSAP-IT (usb) (exoSAP-IT 100bp den büyük 20 kb dan küçük olan PCR ürünlerini temizlemek için kullanılır.) bulunan 0.2 µl'lik yeni tüpler hazırlanmış ve bu tüpler

37°C'de 15 dakika bir kez, 80°C'de 15 dakika bir kez olmak üzere PCR makinesinde tutulmuştur.

Steinernema spp. LSU sekansları için ileri yöndeki no.502 (5'-CAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGGC) primerleri kullanılmıştır. Ters yöndeki primerler olarak no.503 (5'-CCTTGGTCCGTGTTTCAAGACG) kullanılmıştır (Stock et al., 2001).

Sekans reaksiyonları ABI BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit ile firmanın önerdiği protokole uygun olarak yapılmıştır. Sekans reaksiyonu sonrası örnekler Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer aleti kullanılarak yürütülmüştür.

Bu tez çalışmasında elde edilen *Steinernema* cinsine ait nematod türlerinin moleküler analizi için 856 baz çifti uzunluğundaki 28S ribozomal RNA büyük alt biriminin D2D3 gen bölgesi, *Heterorhabditis*'ler için ise ITS bölgesi kullanılmıştır. 28S rDNA dizi analizleri PAUP Version 4.0b10 Macintosh (PPC/Altivec) filogeni çizim programı kullanılarak oluşturulmuştur.

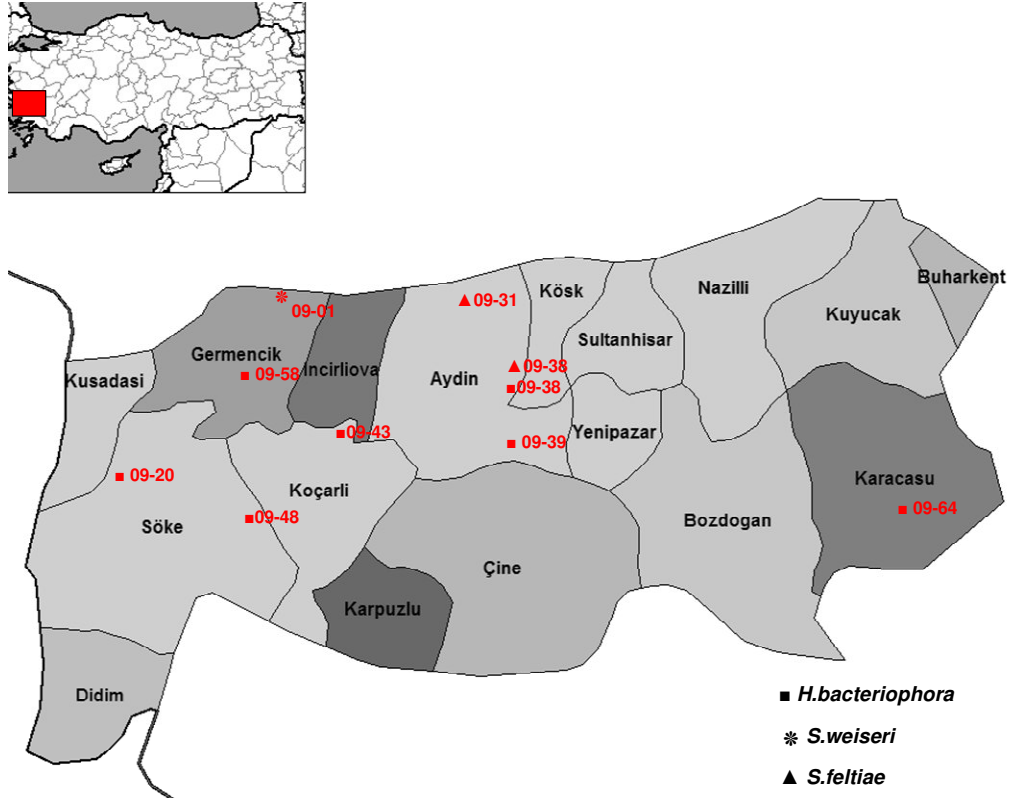
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışma entomopatojenik nematodların dağılımlarıyla ilgili olarak Aydın ilinde yapılan ilk araştırma özelliğini taşımaktadır. Çalışma sonucunda Aydın ili ve çevresindeki topraklarda bulunan entomopatojenik nematodların çeşitliliği ve dağılımları belirlenmiştir. 2006-2007 yılları arasında yapılan arazi çalışmalarında toplam 82 toprak örneği alınmış ve bunların 10 tanesinden entomopatojenik nematod elde edilmiştir. Pozitif örneklerin toplam sayısal oranı %12'dir. Hazır ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan ve Türkiye'nin tamamını kapsayan araştırma sonucunda toplam 1167 toprak örneği incelenmiş ve 24 entomopatojenik nematod izolatu elde edilmiştir. Bu çalışmada pozitif çıkan toprakların oranı %2 olarak tespit edilmiştir. Aydın bölgesinde yapılan detaylı çalışmadan elde edilen %12'lik oran Türkiye ortalamasına oranla oldukça yüksek bir değerdir.

Morfometrik, morfolojik ve moleküler verilerinin bir arada değerlendirilmesi sonucunda Aydın ili ve çevresinde gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda elde edilen 10 entomopatojenik nematod izolatının 3 tanesinin *Steinernema* cinsine, 7 tanesinin ise *Heterorhabditis* cinsine ait olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.1).

Çizelge 4.1. Aydın ili ve çevresindeki topraklardan elde edilen entomopatojenik nematod türleri ve habitat özellikleri

izolat no	Entomopatojenik nematod	Örnek alınan yerler	Toprak Sıcaklığı (°C)	Yükseklik (metre)	Örnek alma zamanı	Habitat
09-01	<i>S.weiseri</i>	Germencik	17	467	21.03.2006	Çam Ormanı
09-20	<i>H. bacteriophora</i>	Davutlar	23.4	31	23.02.2006	Meyve bahçesi
09-31	<i>S.feltiae</i>	Paşayaylası	15.3	204	30.04.2006	Sebze tarlası
09-38	<i>S.feltiae</i>	Umurlu	23.9	66	30.04.2006	Karpuz tarlası
09-38	<i>H. bacteriophora</i>	Umurlu	23.9	66	30.04.2006	Karpuz tarlası
09-39	<i>H. bacteriophora</i>	Yenipazar	25.3	63	30.04.2006	Meyve bahçesi
09-43	<i>H. bacteriophora</i>	İncirlioiva	29.6	29.6	20.06.2006	Meyve bahçesi
09-48	<i>H. bacteriophora</i>	Bıyıklı köyü	27.2	55	20.06.2006	Sebze tarlası
09-58	<i>H. bacteriophora</i>	Alangüllü köyü	27	57	20.06.2006	Sebze tarlası
09-64	<i>H. bacteriophora</i>	Yenice	24.1	318	15.07.2007	Sebze tarlası



Şekil 4.1 Aydın ili ve çevresindeki topraklardan elde edilen entomopatojenik nematodların dağılımları.

Elde edilen her türe ait bir izolataın tür teşhisinde kullanılan morfometrik ölçüm sonuçları Çizelge 4.2, 4.3 ve 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.2 *Steinernema feltiae* (izolat 09-38)'nin morfometrik ölçüm (μm) sonuçları

Tür adı: *Steinernema feltiae*

İzolat no: 09-38

İnfektif juveniller

	TU	MG	ES	EP	NR	TL	AG	a	b	c	d	e
Min	775.7	27.8	118.5	55.0	97.0	69.1	15.9	19.7	6.3	10.6	43.9	70.1
Ort	875.6	36.5	126.1	60.9	112.3	76.0	18.6	24.3	6.9	11.5	48.3	80.3
Maks	936.1	44.9	136.8	65.0	125.9	83.8	22.4	28.5	7.7	12.6	53.6	89.1
Ss	39.1	4.6	5.1	2.6	6.7	4.1	1.7	2.7	0.3	0.6	2.5	5.1

İlk jenerasyon erkek nematodlar

	TU	MG	ES	EP	NR	TL	AG	SU	Gub.U	a	b	c	d	e
Min	1013.6	71.7	112.1	61.4	102.9	20.1	33.7	58.0	32.1	13.0	7.9	31.9	42.3	175.0
Ort	1315.4	82.1	134.1	77.1	123.1	29.0	38.7	68.4	45.8	19.5	8.3	29.0	119.7	418.3
Maks	1639.5	96.0	152.1	87.2	141.5	38.7	45.5	76.5	58.7	19.7	13.0	66.8	74.7	363.3
Ss	193.3	8.2	12.8	8.7	12.2	4.9	3.0	5.9	7.3	1.8	31.8	4.5	466.4	65.4

Min: Minimum

Ort: Ortalama

Maks: Maksimum

Ss: Standart sapma

Çizelge 4.3 *Steinernema weiseri* (izolat 09-01)'nin morfolometrik ölçüm (μm) sonuçlarıTür adı: *Steinernema weiseri*

İzolat no:09-01

İnfektif juveniller

	TU	MG	ES	EP	NR	TL	AG	a	b	c	d	e
Min	814.7	23.9	112.6	55.2	93.4	61.6	14.5	22.6	6.7	11.8	45.2	79.4
Ort	914.6	30.8	121.3	60.0	106.6	68.8	17.3	30.0	7.6	13.3	49.5	87.4
Maks	989.0	38.4	130.8	66.1	118.9	77.9	19.1	37.9	8.7	15.2	57.7	95.1
Ss	51.4	3.9	4.7	3.5	6.3	4.0	1.3	3.7	0.5	0.8	3.1	4.4

İlk jenerasyon erkek nematodlar

	TU	MG	ES	EP	NR	TL	AG	SU	Gub.U	a	b	c	d	e
Min	1054.2	75.0	122.5	54.1	104.9	20.9	31.5	67.5	40.2	1.7	7.6	29.5	43.0	160.9
Ort	1392.9	132.0	134.2	77.6	120.3	31.7	40.5	79.5	52.3	19.5	8.3	29.0	119.7	418.3
Maks	1782.8	947.0	144.5	98.5	138.3	46.7	50.7	86.4	61.7	19.6	12.9	65.9	69.8	394.2
Ss	210.5	192.0	7.1	11.8	9.2	5.6	4.8	5.3	5.6	3.8	31.8	4.5	466.4	65.4

Min: Minimum**Ort:** Ortalama**Maks:** Maksimum**Ss:** Standart sapma

Çizelge 4.4 *Heterorhabditis bacteriophora* (izolat N09-39)'nın morfometrik ölçüm (μm) sonuçları

Tür adı: *Heterorhabditis bacteriophora*

İzolat no: 09-39

İnfektif juveniller

	TU	MG	ES	EP	NR	TL	AG	a	b	c	d	e
Min	521.2	22.3	114.7	124.1	104.4	61.4	10.0	19.4	4.2	7.0	97.4	155.1
Ort	577.7	24.8	124.2	132.4	113.2	68.6	11.7	23.4	4.7	8.5	106.7	194.5
Maks	618.9	31.2	130.1	140.9	122.9	83.1	14.2	26.42	5.08	10.0	122.84	223.7
Ss	26.3	2.2	4.1	4.8	4.8	5.9	1.2	1.9	0.2	0.8	5.8	18.1

Erkek nematodlar

	TU	MG	ES	EP	NR	TL	AG	SU	Gub.U	a	b	c	d	e
Min	797.3	39.6	104.7	113.8	91.2	22.6	16.1	40.6	17.6	15.8	7.4	10.4	106.1	160.6
Ort	896.0	46.0	108.1	129.5	95.9	30.9	18.4	44.9	22.4	19.5	8.3	29.0	119.7	418.3
Maks	1024.0	53.9	111.2	147.5	103.3	88.2	21.7	50.8	26.7	22.3	9.2	39.9	132.9	570.0
Ss	61.1	4.0	1.9	9.0	3.3	13.7	1.5	2.9	2.5	1.5	31.8	4.5	466.4	65.4

Min: Minimum

Ort: Ortalama

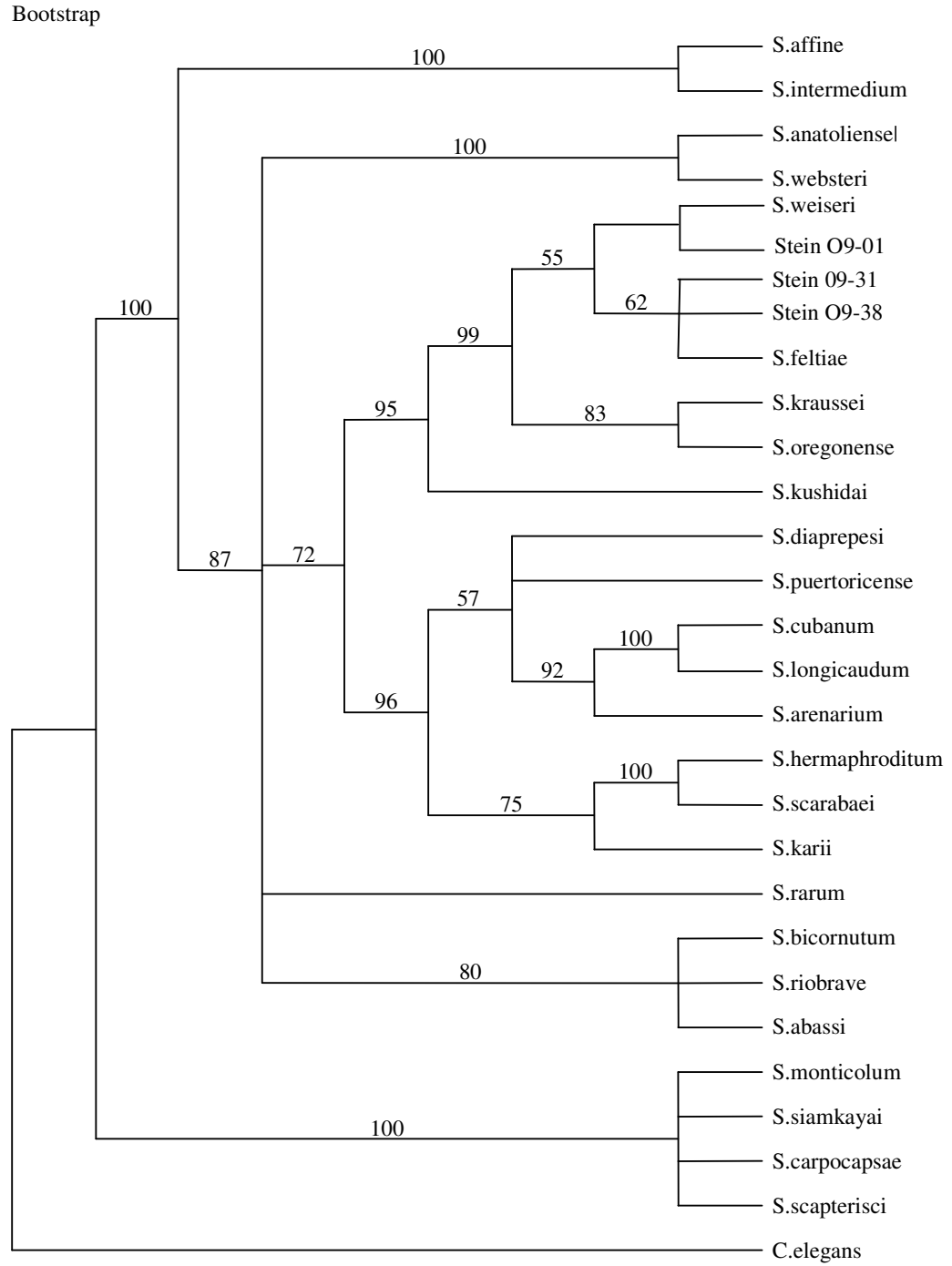
Maks: Maksimum

Ss: Standart sapma

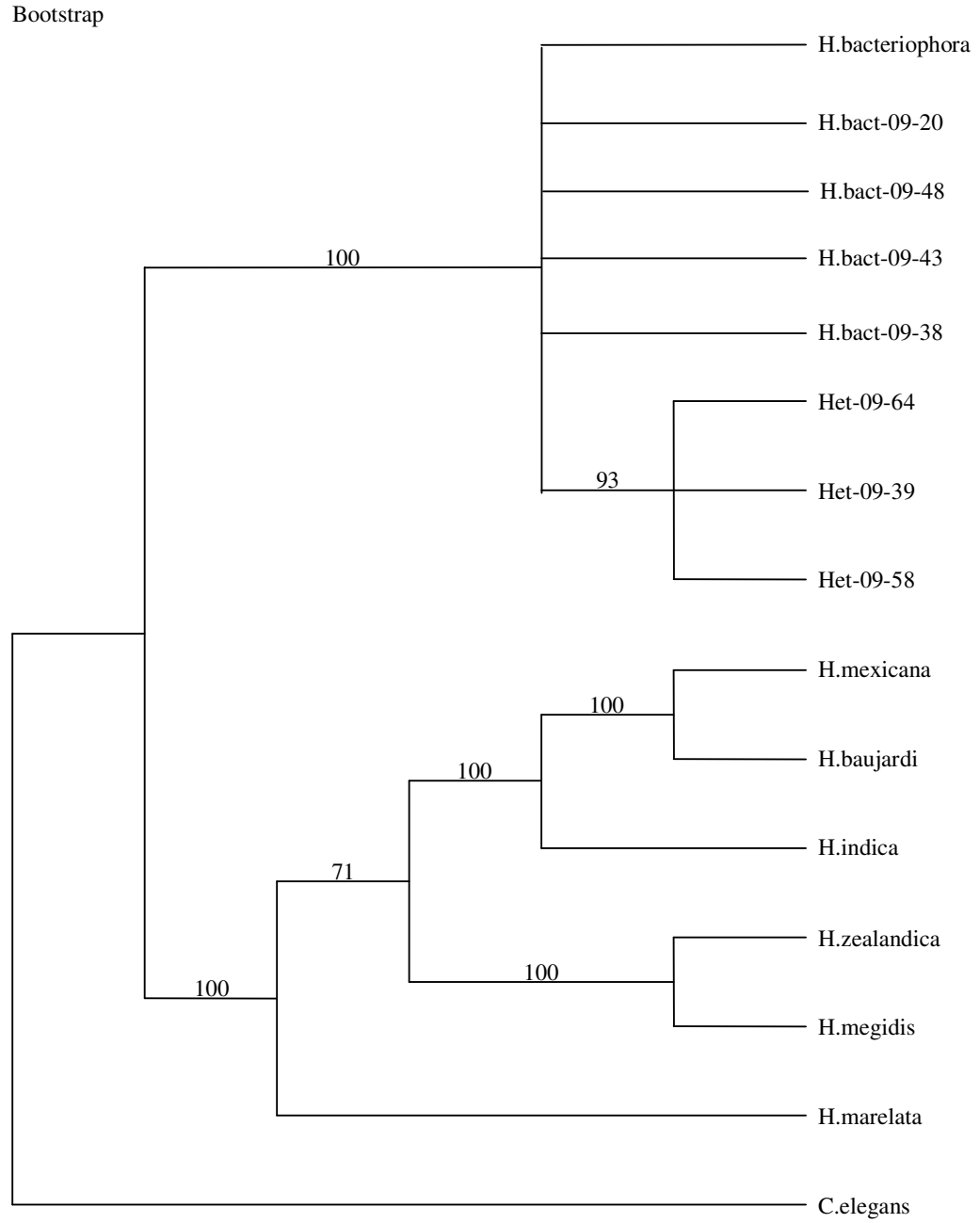
Moleküler analizler sonucu elde edilen filogenetik ağaçlar *Steinernema* ve *Heterorhabditis* türleri arasındaki ilişkileri göstermiştir (Şekil 4.2 ve 4.3).

Steinernematidler için oluşturulan filogenetik ağaca göre, 09-31 ve 09-38 izolatlarının *S. feltiae* olduğu belirlenmiştir. 09-01 no'lu izolatın ise ayrı bir grupta yer aldığı ve bu izolatın *S. weiseri* türüne ait olduğu tespit edilmiştir. *S. feltiae* ve *S. weiseri* türlerinin birbirine yakın türler olduğu ve bu iki ayrı türe en yakın türlerin *Steinernema kraussei* ve *Steinernema oregonense* olduğu filogenetik ağaçta görülmektedir (Şekil 4.2).

Heterorhabditidler için oluşturulan filogenetik ağaca göre bütün izolatların aynı tür olduğu ancak 09-39, 09-58 ve 09-64 izolatların bir grup, 09-38, 09-20, 09-43, 09-48 izolatlarının ise kendi aralarında bir grup oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4.3) 09-39, 09-58 ve 09-64 izolatlarının diğerlerinden ayrılıp aynı grup içinde toplanma sebebi bu türlerin 2 bazının diğerlerinden farklı olmasıdır.



Şekil 4.2 *Steinernema* cinsine ait entomopatojenik nematodların tür dağılımını gösteren filogenetik ağaç



Şekil 4.3 *Heterorhabditis* cinsine ait entomopatojenik nematodların tür dağılımını gösteren filogenetik ağaç

Hazir et al., (2003) tarafından yapılan çalışmada Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilen 24 izolatın 17 tanesi *Steinernema*, 7 tanesi ise *Heterorhabditis* cinsine aittir. Aydın ili ve çevresinde *Heterorhabditis*'lerin daha yoğun olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada elde edilen *Steinernema* cinsine ait olan 3 izolattan 2 tanesinin *Steinernema feltiae* (izolat no 09-38 ve 09-31), 1 tanesinin ise *Steinernema weiseri* (izolat no 09-01) türüne ait olduğu belirlenmiştir. Elde edilen *S. feltiae* izolatlarından biri Paşayaylası bölgesindeki sebze bahçesinden, diğeri ise Umurlu ilçesindeki karpuz tarlasından elde edilmiştir. *S. weiseri* izolatı ise Germencik ilçesinin Habibler köyü çam ormanından elde edilmiştir.

S. feltiae türü dünyadaki en yaygın entomopatojenik nematod türü olarak kabul edilmektedir. Bunun olası nedeni olarak *S. feltiae* türünün ya kıtalar ayrılmadan önce ortaya çıkmış bir tür olmasından ya da etkin bir dağılım gösterebilen özellik taşıyor olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Hominick et al., 1996). Türkiye'den ilk elde edilen entomopatojenik nematod türü de *S. feltiae*'dir (Özer et al., 1995). Hazir et al (2003) tarafından yapılan çalışmada elde edilen 17 *Steinernema*'nın 10 tanesi yine *S. feltiae* türüne ait bulunmuş ve Türkiye'deki en yaygın entomopatojenik nematod türü olduğu belirtilmiştir.

Aydın ili ve çevresinden elde edilen diğeri *Steinernema* türü olan *S. weiseri* ise son yıllarda ve sadece Avrupa'da tespit edilen bir türdür. Bugüne kadar Çek Cumhuriyeti, Almanya, Slovakya, İngiltere ve İskoçya'dan izole edilmiştir (Mracek et al., 2003). Türkiye'de *S. weiseri*'nin ilk tespiti ise Ankara'dan olmuştur (Unlu et al., 2007). İzole edildiği bölgelere bakıldığında *S. weiseri*'nin soğuk bölgelere adapte bir tür olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda bu türün daha çok çim alanlardan ve meyve bahçelerinden, daha az sıklıkla ormanlık alanlardan izole edildiği belirtilmiştir. Ünlü ve arkadaşları (2007) *S. weiseri* türünü Ankara, Beytepe'den çam ağacı ormanından izole etmiştir. Benzer olarak bu çalışmada elde edilen *S. weiseri* de çam ormanından izole edilmiştir. Bazman ve arkadaşları, (yayınlanmamış veri) *S. weiseri*'nin ekolojisiyle ilgili yaptıkları detaylı çalışmada bu türün soğuğa adapte bir tür olduğunu belirlemiştir. Aydın ili ve çevresi genelde ılıman Akdeniz iklimine sahiptir. Ancak *S. weiseri*'nin izole edildiği Germencik-

Habibler köyü dağlık bir bölge olup deniz seviyesinden yüksekliği yaklaşık 500m. civarındadır.

Aydın ilinden elde edilen *Heterorhabditis* cinsine ait izolatların hepsinin *Heterorhabditis bacteriophora* türüne ait olduğu belirlenmiştir. Türkiye’de bugüne kadar yapılan çalışmalardan elde edilen *Heterorhabditis*’lerin tamamı *H. bacteriophora* türüne ait çıkmıştır. Daha önce yapılan çalışmada da (Hazir et al., 2003) elde edilen *Heterorhabditis* izolatlarının hepsinin *H. bacteriophora* türüne ait oldukları bildirilmiştir. Susurluk et al., (2001), yaptıkları çalışmada *H. bacteriophora* türüne ait (izolat Tur-H1 ve Tur-H2) entomopatojenik nematodlar izole etmişlerdir. *S. feltiae* gibi *H. bacteriophora* da dünyanın en yaygın entomopatojenik nematod türlerinden birisidir. Genelde *S. feltiae* soğuk iklim bölgelerinden ve daha çok kıyıda uzak kesimlerden elde edilen bir türdür (Wright, 1992; Hominick et al., 1996). *H. bacteriophora* ise sıcak bölgelerden ve özellikle kıyıya yakın yerlerdeki topraklardan elde edilen bir türdür (Hominick et al., 1996). İklim şartları göz önüne alındığında Aydın ili ve çevresinden elde edilen entomopatojenik nematodların çoğunun *Heterorhabditis bacteriophora* türüne ait olmaları daha önceki çalışmaları desteklemektedir. Aydın ilinin özellikle deniz kıyısına yakın yerlerinden alınan toprak örneklerinden *H. bacteriophora* izole edilmiş olması bu türün kıyıya yakın ve sıcak bölgelere adapte bir tür olduğunu bir kez daha göstermiştir. Zaten *Heterorhabditis* cinsine ait nematodların izole edildiği toprakların sıcaklık değerleri de *Steinernema* cinsine ait nematodların bulunduğu toprakların sıcaklık değerlerine oranla daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Genelde aynı toprak örneğinde birden fazla tür elde edilememektedir. Ancak yapılan bu çalışmada 09-38 no’ lu toprak örneğinden hem *S. feltiae* hem de *H. bacteriophora* türlerine ait iki ayrı entomopatojenik nematod izole edilmiş olması oldukça ilginçtir (Şekil 4.1, Çizelge 4.1).

5. SONUÇ

Yapılan çalışmada alınan 82 toprak örneğinin 10 tanesinden entomopatojenik nematod elde edilmiştir. Aydın ili sınırlarından alınan toprak örneklerinde entomopatojenik nematod bulunma oranı %12 olarak tespit edilmiştir. Bu 10 pozitif örnekten 3 tanesi *Steinernema* cinsine (%30), 7 tanesinin de *Heterorhabditis* cinsine (%70) ait olduğu belirlenmiştir Morfometrik, morfolojik ve moleküler verilerin bir arada değerlendirilmesi sonucunda elde edilen *Steinernema* cinsine ait nematodların *S. feltiae* ve *S. weiseri* oldukları, *Heterorhabditis* cinsine ait tüm izolatların ise *H. bacteriophora* türüne ait olduğu belirlenmiştir.

Toprak içerisindeki entomopatojenik nematodların izolasyonu için konak organizma olarak *Galleria mellonella* larvaları kullanılmıştır. Dolayısıyla Lepidoptera larvalarını enfekte edebilen türler izole edilebilmiştir. İleride yapılacak yeni çalışmalarda farklı ordolara ait böcek konakların kullanılması entomopatojenik nematodların çeşitliliğini arttırabilecektir.

Bu çalışma sonucunda tarımın yaygın olarak yapıldığı bir bölge olan Aydın ilindeki entomopatojenik nematod türlerinin dağılımı ve çeşitlilikleri belirlenmiştir. Elde edilen yeni izolatlar Türkiyenin biyolojik çeşitliliğine katkıda bulunmuştur. Aydın ili, iklim, toprak, topoğrafik yapı ve diğer ekolojik özellikleri nedeniyle polikültür tarım yapılan bir şehirdir. Akdeniz ikliminin hakim olduğu Aydın ilinde incir, zeytin ve kestane başta olmak üzere pamuk, narenciye, karpuz, kavun, çilek ve çeşitli sebze-meyve üretimi gerçekleştirilmektedir. Tarım bölgesi olması dolayısıyla bu bölgede çok sayıda toprak altı zararlısı mevcuttur. Toprak doğal yapısı itibariyle uygulanan insektisitlere karşı doğal bir bariyer özelliği taşımaktadır. Bu nedenle toprak altı zararlılarıyla mücadele etmek oldukça zordur. Oysa toprak doğal yaşam ortamları olduğu için entomopatojenik nematodlar açısından böyle bir bariyer söz konusu değildir. Ayrıca kimyasal insektisitlerin kullanımının çevre insan sağlığı açısından ortaya çıkardığı olumsuz sonuçlar, entomopatojenik nematodlar için geçerli değildir. Bu nedenlerden dolayı elde edilen entomopatojenik nematod izolatlarının gelecekte bu bölgedeki zararlı organizmalara karşı etkin bir biyolojik kontrol ajanı olarak

kullanılması mümkün olabilecektir. Milyonlarca yıllık bir süreç içerisinde bulunduğu çevreye uyum sağlamış olan, o bölgeye özgü entomopatojenik nematod izolatlarının kullanılması biyolojik kontrolün başarı oranını arttıracak en önemli unsur olacaktır.

KAYNAKLAR

Bedding, R., Akhurst, R., Kaya, H. 1994. Nematodes and the Biological Control of Insect Pests. CSIRO Publishing, 178p., USA.

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.

Boemare, N. 2002. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: Gaugler, R.(Ed.), Entomopathogenic Nematology. CABI. Wallingford, UK, 35-57pp.

Chen, Z. X., Chen, S. Y. and Dickson, D. W. 2004. Nematology- Advances and Perspectives Volume I: Nematode Morphology, Physiology and Ecology. Tsinghua University Pres. Beijing, China. 636p.

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.

Demirsoy, A. 1998. Yaşamın Temel Kuralları (Omurgasızlar). H.U Yayınları, Cilt 2/ Kısım 1. Meteksan A.Ş. Ankara. 417-440.

Demirsoy, A. 2001. Yaşamın Temel Kuralları (Omurgasızlar) H. U. Yayınları, Cilt 2/ kısım 1. Ankara. 417- 440. Meteksan A. Ş.

Ellis, R.E., Sulston, J.E. and Coulson, A.R. 1986. The rDNA of *C.elegans*: sequence and structure. **Nucleic Acids Research**, 14; 2345-2364.

Gaugler, R., Kaya, H. 1990. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Pres, 365p., USA.

- Gaugler, R. 2002. Entomopathogenic Nematology. CABI publishing, 440p., USA.
- Georgis, R., Koppenhöfer, A. M., Lacey, L. A., Belair, G., Duncan, L. W., Grewal, P. S., Samish, M., Tan, L., Torr, P., van Tol, R.W.H.M. 2006. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. **Biological Control**, 38; 103-123.
- Grewal, P.S., Gaugler, R., Kaya, H.K and Wusaty, M.1993. Infectivity of the entomopathogenic nematode *Steinernema scapterisci* (Nematode: Steinernematidae). **J.Inverteb.Pathol.**, 62; 22-28.
- Grewal, P. S., Selvan, S., 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., Ehlers, R.U., Shapiro-Ilan, D.I. 2005. Nematodes as Biocontrol Agents. CABI Publishing, 506p., USA.
- Griffin, C.T., O'Callaghan, K.M and Dix, I. 2001. A self-fertile species of *Steinernema* from Indonesia: further evidence of convergent evolution amongst entomopathogenic nematodes. **Parasitology**.
- Hazır, S. 2002. Türkiye' deki Entomopatojenik Nematodlar (Steinernematidae ve Heterorhabditidae) Üzerine Faunistik Çalışmalar. Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 158s.
- Hazır, 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.
- 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, P., Sturhan, D., Waturu, C. and Yoshida, M. 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions. **J.Helminthol.**, 71; 271-298.

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” (L. Lacey, Ed.), pp. 281-324 Academic Pres, San Diego, CA.

Kaya, H.K., 2002. Natural enemies and other antagonists. In: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology. CABI. Wallingford, UK. 189-203pp.

Koppenhofer, A.M. and Kaya, H.K. 1999. Ecological characterization of *Steinernema rarum*. **J.Inverteb. Pathol.**, 73; 120-128.

Kung, S.P, Gaugler, R. and Kaya, H. 1990. Influence of soil pH and Oxygen on Persistence of *Steinernema* spp. **Journal of Nematology**, 22; 440-445.

Lopez-Nunez, J.C., Cano, L., Gongora-B, C.E. and Stock P.S. 2007. Diversity and evolutionary relationships of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from the Central Andean region of Colombia. **Nematology**, 9; 333-341

Luc, P.V., Nguyen, K:B., Reid, A.P. and Spiridonov, S.E. 2000. *Steinernema tami* sp.n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Cat Tien Forest, Vietnam. **Russian Journal of Nematology**, 8; 33-43.

Maggenti, A. 1981. General nematology. Springer-Verlag, 372p., New York.

- Mamiya, Y. and Ogura, N. 1989. Search for Steinernematidae and Heterorhabditidae in some locality. **Ann. Meet. Jap. Soc. App. Ent.**, Zool. 49
- Mracek, Z. and Webster, J.M. 1993. Survey of Steinernematidae and Heterorhabditidae (Rhabditida: Nematoda) in western Can. **J. Nematol.**, 25; 710-717.
- Mracek, Z. and Becvar, S. 2000. Insect aggregations and entomopathogenic nematode occurrence. **Nematology**, 2; 297-301.
- Mracek, Z., Sturhan, D. and Reid, A., 2003. *Steinernema weiseri* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Europe. **Systematic Parasitology**, 56; 37-47.
- Nishimura, Y., Hagiwara, A., Suzuki, T and Yamanaka, S. 1994. *Xenorhabdus Japonicus* sp. nov. Associated with the nematode *Steinernema kushidai*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 10; 207-210.
- Özer, N., Keskin, N. And Kırbaş, Z., 1995. Occurrence of the entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Turkey. **Nematologica**, 41; 639-640.
- 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.
- Poinar, G.O. Jr. 1979. Nematodes for biological control of insects. CRC Press, CRC Press Boca Raton, FL.
- Portillo-Aguilar C., Villani M.G., Tauber M.J., Tauber C.A. and Nyrop, J.P. 1999. Entomopathogenic Nematode (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) Response to Soil Texture and Bulk Density. **Environ.Entomol.**, 28; 1021-1035.

- Shapiro-Ilan, D. I., Gouge, D. H., Piggott, S. J., Fife, J.P. 2005. Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. **Biological Control**, 38; 124-133.
- Simard, L., Belair, G., Stock P.S., Mauleon, H. and Dionne, J. 2007. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) on golf courses in eastern Canada. **Nematology**, 9; 325-332.
- Smart, G.C. 1995. Entomopathogenic Nematodes for the Biological Control. **Supplement to the Journal of Nematology**, 27(4S); 529-534.
- Spiridonov, S.E., Sturhan, D., Mracek, Z. 2005. *Steinernema silvaticum* sp.n. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Europe. **Nematology**, 7 (No.2); 227-241.
- Stock, P.S., 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., Mracek, Z., Webster J.M. 2000. Morphological Variation between allopatric populations of *Steinernema kraussei* (Steiner, 1923) (Rhabditida: Steinernematidae). **Nematology**, 2, (2); 143-152.
- 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. **J.Parasitol.**, 87; 877-889.

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.

Susurluk, A., Dix, I., Stackebrandt, E., Strauch, W. S. and Ehlers, R.U. 2001. Identification and ecological characterisation of three entomopathogenic nematode-bacterium complexes from Turkey. **Nematology**, 3 (8); 833-841.

Temizkan, G., Arda, N. 2003. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. BİYOGEM, 342s, İstanbul.

Tanada, Y. and Kaya, H.K. 1993. Insect Pathology. CA, Academic Press 666p., San Diego.

Unlu, I.O., Ehlers, R.U. and Susurluk, A. 2007. Additional data and first record of the entomopathogenic nematode *Steinernema weiseri* from Turkey. **Nematology**, 1-3. In press.

Uribe-Lorio, L., Mora, M., Stock, S. 2005. First record of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Costa Rica. **Journal of Invertebrate Pathology**, 88; 226–231.

Viglierchio, D.R. 1991. The World of Nematodes. University of California, Davis. 266pp. Sacramento, USA.

White, G.F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from culture. **Science**. 66; 302-303.

Wright, P.J. 1992. Cool temperature reproduction of Steinernematid and Heterorhabditid nematodes. **J. Inverteb. Pathol.**, 60; 148-151.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Müfide Sonay AYDIN
Doğum Yeri ve Tarihi :Elazığ 28.12.1982

EĞİTİM DURUMU

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

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar

-SCI

-Diğer

b) Bildiriler

-Uluslararası

-Ulusal

c) Katıldığı Projeler

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl :

İLETİŞİM

E-posta Adresi :msonayaydin@hotmail.com

Tarih :06.08.2007