

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BİY-DR-2010-0003**

**BİYOLOJİK MÜCADELE AJANI
ENTOMOPATOJENİK NEMATODLAR ÜZERİNE
ARAŞTIRMALAR**

Barış GÜLCÜ

**Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Selçuk HAZIR**

AYDIN

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

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Barış GÜLCÜ tarafından hazırlanan “Biyolojik Mücadele Ajanı Entomopatojenik Nematodlar Üzerine Araştırmalar” başlıklı tez, 24.05.2010 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan :	Doç. Dr. Selçuk Hazır	Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	
Üye :	Doç. Dr. Fatih M. Şimşek	Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	
Üye :	Doç. Dr. İbrahim Çakmak	Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü	
Üye :	Yrd. Doç. Dr. Mehmet Karagöz	Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü	
Üye :	Yrd. Doç. Dr. Galip Kaşkavalcı	Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun
 Sayılı kararıyla () tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ
 Enstitü Müdürü

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

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.

30/04/2010

Barış GÜLCÜ

ÖZET**BIYOLOJİK MÜCADELE AJANI ENTOMOPATOJENİK
NEMATODLAR ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

Barış GÜLCÜ

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Selçuk HAZİR
2010, 120 sayfa

Bu tez çalışması Türkiye'den elde edilmiş entomopatojenik nematod izolatlarının ekolojilerini, biyolojik mücadele potansiyellerini ve depolanmalarına yönelik araştırmaları içermektedir. İlk bölümde böcek kadavrası içerisindeki nematod/bakteri kompleksinin yağmacı böcekler tarafından saldırıya uğradığında gösterdiği hayatta kalma stratejisinin anlaşılmasına yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Karınca Uzaklaştırıcı Faktör (ADF) olarak bilinen madde ile yapılan önceki çalışmalar yalnızca karıncalar ile yapıldığından bu çalışmada ADF'nin diğer yağmacı böceklerde de etkili olup olmadığı araştırılmıştır. Bakteri ve kadavra denemeleri test edilen bütün yağmacılar üzerinde ADF'nin güçlü bir negatif etkiye sahip olduğunu göstermiştir. ADF'nin hücre dışına salgılanan, yüksek sıcaklıkla aktivitesi bozulmayan ve etkinliğini uzun süre koruyan bir madde(ler) olduğu da tespit edilmiştir.

İkinci çalışmada 6 farklı yerli entomopatojenik nematod izolatının biyolojik mücadele potansiyelleri *Spodoptera exigua* larvalarına karşı test edilmiştir. Laboratuvarında yapılan denemelerde *S. carpocapsae* türü gösterdiği 60 ml'lik plastik kaplarda %100 ve 30 x 30 cm'lik çim alan denemelerinde %77 larva ölüm oranları ile en etkili tür olmuştur.

Üçüncü olarak gıda maddelerinin depolanmasında kullanılan ve ucuz olan tetra pak kutuların nematodların muhafaza edilmesinde kullanılan saklama kaplarına mükemmel bir alternatif olduğu tespit edilmiştir. Tetra pak kutulardaki nematodların canlılık oranları 11 ay süresince pahalı hücre kültür kapları ile başabaş gitmiştir. Sonuç olarak bu tetra pak kutuların biyolojik mücadele programlarında nematodların saklanması amacıyla hücre kültür kaplarına alternatif olarak kullanılabilmesi belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Entomopatojenik nematodlar, *Steinernema*, *Heterorhabditis*, ADF, Tetra pak, Biyolojik mücadele, *Photorhabdus*, *Xenorhabdus*.

ABSTRACT**INVESTIGATIONS ON ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES AS
BIOLOGICAL CONTROL AGENTS**

Barış GÜLCÜ

PhD Thesis, Biology Department
Advisor: Associate Professor Dr. Selçuk HAZIR
2010, 120 pp.

The overall objective in this thesis was to investigate the ecology, biological control potential and storage of Turkish isolates of entomopathogenic nematodes. Objective 1 was to understand the survival strategy of the nematode/bacterial complex in an insect cadaver when the cadaver was attacked by insect scavengers. For objective 1, because earlier studies related with Ant Deterrent Factor (ADF) were only done with ant species, in this study other insect scavengers were investigated to determine whether they were also deterred by ADF. Bacteria and cadaver experiments showed that ADF had a strong negative effect on all tested scavengers. It was also determined that ADF was an extracellular substance(s) that maintained its activity at high temperatures and was stable for a long time.

For objective 2, the biological control potential of six native entomopathogenic nematode isolates was tested against *S. exigua* larvae. In laboratory studies, the nematode, *S. carpocapsae*, was the most effective species against the larvae causing 100% mortality in 20 ml plastic cups and 77% mortality in 30 x 30 cm containers with turfgrass.

For objective 3, inexpensive tetrapak boxes used for food storage were found to be excellent alternative storage containers for maintaining these nematodes. Nematode survival over 11 months was comparable to the expensive cell culture flasks. Consequently it was determined that these tetrapak boxes can serve as alternatives to the cell culture flasks to store nematodes for biological control programs.

Key words: Entomopathogenic nematodes, *Steinernema*, *Heterorhabditis*, ADF, Tetrapak, Biological control, *Photorhabdus*, *Xenorhabdus*.

ÖNSÖZ

Bugünlere gelmem de büyük emekleri olan, eğitimim esnasında hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen çok değerli aileme,

Lisans eğitimim sırasında tanıştığım, 9 yıl boyunca bilime ve hayata dair tecrübeleriyle bana daima yol gösterici olan, bir ağabey olarak kabul ettiğim danışman hocam Doç. Dr. Selçuk HAZIR'a,

Çalışmamın istatistiksel analizlerinde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. İbrahim ÇAKMAK (Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü)'a, böcekler ile yapılan deneylerde tecrübe ve bilgilerini paylaştan Yrd. Doç. Dr. Mehmet KARAGÖZ (Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü)'e,

Bütün çalışmalarımda konusundaki engin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaştan, her türlü yardım ve desteği sağlayan, kendisiyle tanışmış olmaktan onur duyduğum çok değerli bilim insanı Prof. Dr. Harry K. KAYA (California Üniversitesi, Nematoloji Bölümü)'ya,

ADF deneylerinde Biyokimya ve Mikrobiyoloji laboratuvarlarını tüm imkanlarıyla çalışmalarına açan değerli bilim insanları Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN ve Yrd. Doç. Dr. Halil BIYIK (Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü)'a, bakteri deneylerinde bilgi ve birikimlerini benimle paylaştan değerli arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL ve Arş. Gör. Öznur ARAT KOÇ (Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü)'a,

Tez çalışmasındaki bütün böcek gruplarının tür teşhislerinde karıncalar için Dr. Kadri KIRAN (Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü)'a, yabancarı için Erwin SCHEUHLE'ye ve *Gryllus bimaculatus* türü için Doç. Dr. Hasan SEVGİLİ (Ordu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü)'ye, *Spodoptera exigua* türü için Doç. Dr. Levent ÜNLÜ (Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü)'ye

Çalışmalarımda yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli dostlarım Derya AŞICI, Canan HAZIR, Zeynep İpek EKMEK, Karthik Raja RAMALINGAM ile laboratuvar ve arazi çalışmalarına katılan tüm öğrenci arkadaşlarıma, *Spodoptera exigua* türüne ait larvaların temin edilmesinde her türlü kolaylığı sağlayan Joy Pegasos Tropical&Palace Otel personeline,

Tez çalışmamı FBE-09014 nolu proje ile destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimine, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ.....	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xxi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxv
1. GİRİŞ	1
1.1. Nematodlar.....	1
1.2. Entomopatojenik Nematodlar (Fam: Steinernematidae ve Heterorhabditidae).....	1
1.3. Entomopatojenik Nematod-Bakteri İlişkisi.....	2
1.4. Entomopatojenik Nematodların Hayat Döngüleri.....	3
1.5. Entomopatojenik Nematodların Mutualistik Bakterileri: <i>Xenorhabdus</i> ve <i>Photorhabdus</i> spp.....	5
1.6. Entomopatojenik Nematodların Konukçu Dağılımı.....	7
1.7. Entomopatojenik Nematod-Konukçu İlişkileri.....	8
1.8. Entomopatojenik Nematodların Ekolojileri.....	10
1.9. Entomopatojenik Nematodların Konukçu Bulma Davranışları.....	10

1.10. Entomopatojenik Nematodların Dağılımları	11
1.11. Entomopatojenik Nematodları Etkileyen Biyotik ve Abiyotik Faktörler	12
1.11.1. Abiyotik Faktörler	12
1.11.1.1. UV	12
1.11.1.2. Nem	12
1.11.1.3. Sıcaklık	13
1.11.1.4. Toprak yapısı	13
1.11.1.5. Oksijen	13
1.11.1.6. PH	13
1.11.2. Biyotik Faktörler	14
2. KURAMSAL TEMELLER	15
2.1. ADF (Ant Deterrent Factor-Karınca Uzaklaştırıcı Faktör) Maddesinin Farklı Gruplardan Yağmacı Böceklerle Karşı Etkisinin Tespiti ve Maddenin Yapısını Aydınlatmaya Yönelik Çalışmalar	15
2.2. Entomopatojenik Nematodların Çizgili Pamuk Yaprak Kurdu <i>Spodoptera exigua</i> (Lepidoptera: Noctuidae)'ya Karşı Biyolojik Mücadelede Kullanılmasına Yönelik Araştırmalar	20
2.3. Entomopatojenik Nematod Kültürlerinin Muhafaza Edilmesinde Kullanılan Hücre Kültür Kaplarına Alternatif Yeni Bir Saklama Kabı	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM	25
3.1. ADF (Ant Deterrent Factor-Karınca Uzaklaştırıcı Faktör) Maddesinin Farklı Gruplardan Yağmacı Böceklerle Karşı Etkisinin Tespiti ve Maddenin Yapısını Aydınlatmaya Yönelik Çalışmalar	25

3.1.1. Nematod ve Bakteri Kùltürlerinin Hazırlanması	25
3.1.2. Kadavra Deneyleri	26
3.1.2.1. Karıncalar ile yapılan deneyler	26
3.1.2.2. Çekirgeler ile yapılan deneyler	27
3.1.2.2.1. Monoksenik entomopatojenik nematod kùltürü ile enfekte kadavra deneyleri	28
3.1.2.2.2. Aksenik entomopatojenik nematod kùltürü ile enfekte kadavra deneyleri	28
3.1.2.2.3. Monoksenik ve aksenik entomopatojenik nematodlarla enfekte kadvraların ADF açısından karşılaştırılması	30
3.1.2.2.4. Entomopatojenik bakteri <i>Serratia marcescens</i> ile enfekte larva deneyleri	30
3.1.2.2.5. Çürümekte olan larva deneyleri	31
3.1.2.3. Yabanarıları (wasp) ile yapılan deneyler	31
3.1.3. Bakteri Deneyleri	31
3.1.3.1. Bakteri kùltürlerindeki ADF aktivitesinin karıncalarda test edilmesi	31
3.1.3.2. Bakteri kùltürlerindeki ADF aktivitesinin yabanarıları (wasp) ile test edilmesi	32
3.1.3.3. Bakteri kùltürlerindeki ADF aktivitesinin leş sinekleri (Calliphoridae) ile test edilmesi	33
3.1.3.4. Yüksek sıcaklığın bakterilerin ürettiği ADF maddesi üzerine etkisinin araştırılması	33
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	34

3.1.5. İstatistiksel Analizler	37
3.2. Entomopatojenik Nematodların Çizgili Pamuk Yaprak Kurdu <i>Spodoptera exigua</i> (Lepidoptera: Noctuidae)'ya Karşı Biyolojik Mücadelede Kullanılmasına Yönelik Araştırmalar	38
3.2.1. Kullanılan organizmalar	38
3.2.2. <i>Spodoptera exigua</i> Larvalarına Karşı Nematodların Etkinliğinin Test Edilmesi	38
3.2.3. Çim Alan Denemeleri	39
3.2.4. İstatistiksel Analizler	41
3.3. Entomopatojenik Nematod Kültürlerinin Muhafaza Edilmesinde Kullanılan Hücre Kültür Kaplarına Alternatif Yeni Bir Saklama Kabı	42
3.3.1. Materyal ve Yöntem	42
3.3.2. İstatistiksel Analizler	43
4. BULGULAR	44
4.1. ADF (Ant Deterrent Factor) Maddesinin Farklı Gruplardan Yağmacı Böceklerle Karşı Etkisinin Tespiti ve Maddenin Yapısını Aydınlatmaya Yönelik Çalışmalar	44
4.1.1. Kadavra Deneyleri	44
4.1.1.1. Karıncalar ile yapılan deneyler	44
4.1.1.2. Çekirgeler ile yapılan deneyler	48
4.1.1.2.1. Monoksenik entomopatojenik nematod kültürü ile enfekte kadavra deneyleri	48
4.1.1.2.2. Aksenik entomopatojenik nematod kültürü ile enfekte kadavra deneyleri	50

4.1.1.2.3. Monoksenik ve aksenik entomopatojenik nematodlarla enfekte kadvraların karşılaştırılması	52
4.1.1.2.4. Entomopatojenik bakteri <i>Serratia marcescens</i> ile enfekte larva deneyleri	54
4.1.1.2.5. Çürümekte olan larva deneyleri	57
4.1.1.3. Yabanarıları (wasp) ile yapılan deneyler	59
4.1.2. Bakteri Deneyleri	61
4.1.2.1. Bakteri kültürlerindeki ADF aktivitesinin karıncalar üzerinde test edilmesi	61
4.1.2.2. Bakteri kültürlerindeki ADF aktivitesinin yabanarıları (wasp) ile test edilmesi	63
4.1.2.3. Bakteri kültürlerindeki ADF aktivitesinin leş sinekleri (Calliphoridae) ile test edilmesi	65
4.1.2.4. Yüksek sıcaklığın bakterilerin ürettiği ADF maddesi üzerine etkisinin araştırılması	67
4.2. Entomopatojenik Nematodların Çizgili Pamuk Yaprak Kurdu <i>Spodoptera exigua</i> (Lepidoptera: Noctuidae)'ya Karşı Biyolojik Mücadelede Kullanılmasına Yönelik Araştırmalar	70
4.2.1. <i>Spodoptera exigua</i> Larvalarına Karşı Entomopatojenik Nematodların Etkinliğinin Test Edilmesi	70
4.2.2. Çim Alan Denemeleri	70
4.3. Entomopatojenik nematod kültürlerinin muhafaza edilmesinde kullanılan hücre kültür kaplarına alternatif yeni bir saklama kabı	72
4.3.1. İnfektif juvenillerin canlı-ölü oranları	72

4.3.2. İnfektif juvenillerin larvaları öldürme oranı.....	76
4.3.3. Larva içerisine girebilen nematod sayıları.....	82
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	87
5.1. ADF (Ant Deterrent Factor-Karınca Uzaklaştırıcı Faktör) Maddesinin Farklı Gruplardan Yağmacı Böceklere Karşı Etkisinin Tespiti ve Maddenin Yapısını Aydınlatmaya Yönelik Çalışmalar	87
5.2. Entomopatojenik Nematodların Çizgili Pamuk Yaprak Kurdu <i>Spodoptera exigua</i> (Lepidoptera: Noctuidae)'ya Karşı Biyolojik Mücadelede Kullanılmasına Yönelik Araştırmalar	94
5.3. Entomopatojenik nematod kültürlerinin muhafaza edilmesinde kullanılan hücre kültür kaplarına alternatif yeni bir saklama kabı	98
KAYNAKLAR	105
ÖZGEÇMİŞ.....	117

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
ADF	Ant Deterrent Factor
AQ	Anthraquinone
cm ²	santimetre kare
Dakika	dk
EPN	Entomopatojenik Nematod
G	Gravity
g	gram
IJ	İnfektif juvenil
J1	1. Juvenil evre
J2	2. Juvenil evre
J3	3. Juvenil evre
J4	4. Juvenil evre
Litre	l
Mcf	make caterpillar floppy
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
NBTA	Nutrient agar + bromothymol blue + tetrazolium chloride
NPRS	Non-ribosomal Peptide Synthetases
pH	Power of Hydrogen
Pir	Photorhabdus insect related
PKS	Polyketide Synthases
PVCs	Photorhabdus virulence cassettes
rpm	Revolutions per minute
SDF	Scavenger Deterrent Factor
sp.	Tür
spp.	Türleri
Tc's	Toxin complexes
TSB	Tryptic Soy Broth
UV	Ultraviolet
vd.	ve diğerleri
XCNs	Xenocoumacins

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Entomopatojenik nematodların genel hayat döngüsü.....	5
Şekil 3.1. Nematodların çim alanlara uygulanması.....	40
Şekil 3.2. Laboratuvarında kurulan çim alan denemeleri.....	41
Şekil 4.1. Enfekte <i>Galleria mellonella</i> larvalarının karıncalar tarafından tüketilme miktarları (%).....	45
Şekil 4.2. Gıda boyası ile boyanan ve <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> ile enfekte edilen kadvraların karşılaştırılması deneyinin 15. dakika görüntüsü.....	46
Şekil 4.3. Gıda boyası ile boyanan ve <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> ile enfekte edilen kadvraların karşılaştırılması deneyinin 1 saat sonraki görüntüsü.....	46
Şekil 4.4. Gıda boyalı ve <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> ile enfekte kadvraların karıncalar tarafından tüketilme miktarları. A- Gıda boyalı kadvralar B- <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> ile enfekte kadvralar.....	47
Şekil 4.5. Monoksenik <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> ve <i>Steinernema feltiae</i> ile enfekte kadvraların insektaryuma yerleştirildiği andaki görüntüsü.....	48
Şekil 4.6. Monoksenik <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> ve <i>Steinernema feltiae</i> ile enfekte kadvraların 48 saat sonraki durumu.....	49
Şekil 4.7. <i>Gryllus bimaculatus</i> 'lar tarafından monoksenik entomopatojenik nematod kültürü ile enfekte larvaların tüketilme miktarları (%). A- <i>Steinernema feltiae</i> ile enfekte larvalar, B- <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> ile enfekte larvalar	50
Şekil 4.8. Aksenik nematodla enfekte kadvraların deney alanına yerleştirildiği andaki görüntüsü	51

Şekil 4.9. Aksenik nematodla enfekte kadavraların deney sonundaki görüntüsü	51
Şekil 4.10. Aksenik entomopatojenik nematod kültürü ile enfekte kadavraların tüketilme miktarları (%).....	52
Şekil 4.11. <i>Steinernema feltiae</i> 'nin monoksenik ve aksenik kültürleri ile enfekte kadavraların deney alanına yerleştirildiği andaki görüntüsü.....	53
Şekil 4.12. <i>Steinernema feltiae</i> 'nin monoksenik ve aksenik kültürleri ile enfekte olan kadavraların <i>Gryllus bimaculatus</i> kolonisinin bulunduğu insektaryumda 48 saat sonraki durumu.....	53
Şekil 4.13. <i>Steinernema feltiae</i> 'nin monoksenik (A) ve aksenik (B) kültürleri ile enfekte kadavraların <i>Gryllus bimaculatus</i> 'lar tarafından tüketilme miktarları (%).....	54
Şekil 4.14. <i>Serratia marcescens</i> ve <i>Photorhabdus luminescens</i> ile enfekte larvaların deney alanına yerleştirildiği andaki görüntüsü.....	55
Şekil 4.15. <i>Serratia marcescens</i> ve <i>Photorhabdus luminescens</i> ile enfekte larvaların 48 saat sonra <i>Gryllus bimaculatus</i> insektaryumundaki durumu.....	55
Şekil 4.16. <i>Serratia marcescens</i> ve <i>Photorhabdus luminescens</i> ile enfekte larvaların tüketilme miktarları (%). A- <i>Serratia marcescens</i> ile enfekte larvalar, B- <i>Photorhabdus luminescens</i> ile enfekte larvalar.....	56
Şekil 4.17. Çürümekte olan larvaların deney alanına yerleştirildiği andaki görüntüsü.....	57
Şekil 4.18. Çürümekte olan larva deneyinde 48 saat sonraki durum.....	58
Şekil 4.19. Çürümekte olan larvaların tüketilme miktarları (%).....	58
Şekil 4.20. Yabancılara ile yapılan enfekte kadavra deneyi.....	59
Şekil 4.21. Deney sonunda kadavraların durumu.....	60

Şekil 4.22. Enfekte larvaların yabancıları tarafından tüketilme miktarları (%).....	60
Şekil 4.23. Farklı sürelerde üretilmiş bakteri kültürlerinin bulunduğu kuyucuklara gelen karıncalar.....	61
Şekil 4.24. Bir saat sonunda 24-384 saatlik <i>Photorhabdus luminecens</i> kültürlerinin olduğu kuyucuklardan beslenen ortalama birey sayıları....	62
Şekil 4.25. 24-384 saatlik <i>Photorhabdus luminecens</i> kültürlerinin bulunduğu kuyucuklarda kalan madde miktarları (ml).....	63
Şekil 4.26. <i>Photorhabdus luminescens</i> ve <i>Escherichia coli</i> süpernatantları ile suda bekletilmiş ciğer parçalarına yabancılarının gösterdiği tepki..	64
Şekil 4.27. Yabancıları <i>Vespa orientalis</i> ve <i>Paravespula</i> sp.'nin <i>Photorhabdus luminescens</i> , <i>Escherichia coli</i> süpernatantları ve suda bekletilmiş et parçacıkları üzerindeki beslenme davranışları	65
Şekil 4.28. <i>Photorhabdus luminescens</i> ve suyla muamele edilmiş et parçacıkları üzerine leş sineklerinin yumurta bırakma davranışları.....	66
Şekil 4.29. Leş sinekleri tarafından ziyaret edilen et parçacıklarındaki sinek yumurtaları ve larvaları	66
Şekil 4.30. Otoklavlanmış 24-192 saatlik <i>Photorhabdus luminescens</i> kültürlerinin deney sonunda kuyucuklarda kalan miktarları (ml).....	68
Şekil 4.31. <i>Photorhabdus luminescens</i> , <i>Escherichia coli</i> Süpernatant-Pelet deneyinde kuyucuklarda kalan sıvı miktarları (ml). (P.I-S: <i>Photorhabdus luminescens</i> süpernatantı; P.I-OS: <i>Photorhabdus luminecens</i> otoklavlanmış süpernatantı; P.I-P: <i>Photorhabdus luminescens</i> peleti; P.I-YP: <i>Photorhabdus luminescens</i> yıkanmış peleti; <i>E.coli</i> -S: <i>Escherichia coli</i> süpernatantı; <i>E.coli</i> -P: <i>Escherichia coli</i> peleti).	69
Şekil 4.32. Deney grubundaki larvaların 5 gün sonunda kontrol edilmesi ..	71

Şekil 4.33. Laboratuvarda yapılan çim alan denemelerindeki <i>Spodoptera exigua</i> larvalarının ölüm oranları (%).....	71
Şekil 4.34. 10°C’de tutulan kutulardaki infektif juvenillerin canlılık oranları (%).....	72
Şekil 4.35. 15°C’de tutulan kutulardaki infektif juvenillerin canlılık oranları (%)	74
Şekil 4.36. 10°C’de tutulan kutulardaki infektif juvenillerin <i>Galleria mellonella</i> larvalarını enfekte etme oranı (%).....	77
Şekil 4.37. 15°C’de tutulan kutulardaki infektif juvenillerin <i>Galleria mellonella</i> larvalarını enfekte etme oranı (%).....	79
Şekil 4.38. 10°C’de tutulan kutulardaki infektif juvenillerin her bir larva içerisine giren ortalama birey sayıları	82
Şekil 4.39. 15°C’de tutulan kutulardaki infektif juvenillerin her bir larva içerisine giren ortalama birey sayıları	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Otoklavlanmış ve normal 24-192 saatlik <i>Photorhabdus luminecens</i> kültürlerinin deney sonunda kuyucuklarda kalan miktarları (ml).....	68
Çizelge 4.2. 10°C’de kutulara göre infektif juvenillerin canlılık oranları (%)	73
Çizelge 4.3. 10°C’de kutulara göre infektif juvenillerin canlılık oranlarının Genel Doğrusal Model analizi ile değerlendirilmesi (%).....	73
Çizelge 4.4. 15°C’de kutulara göre infektif juvenillerin canlılık oranları (%).....	75
Çizelge 4.5. 15°C’de kutulara göre infektif juvenillerin canlılık oranlarının Genel Doğrusal Model analizi ile değerlendirilmesi (%)	75
Çizelge 4.6. 10 ve 15°C’de kutulara göre infektif juvenillerin canlılık oranlarının Genel Doğrusal Model analizi ile değerlendirilmesi (%).....	76
Çizelge 4.7. 10°C’de bekletilen kutulardaki infektif juvenillerin <i>Galleria mellonella</i> larvalarını enfekte etme oranları (%).....	78
Çizelge 4.8. 10°C’de bekletilen kutulardaki infektif juvenillerin <i>Galleria mellonella</i> larvalarını enfekte etme oranlarının Genel Doğrusal Model analizi ile değerlendirilmesi (%).....	79
Çizelge 4.9. 15°C’de bekletilen kutulardaki infektif juvenillerin <i>Galleria mellonella</i> larvalarını enfekte etme oranları (%).....	80
Çizelge 4.10. 15°C’de bekletilen kutulardaki infektif juvenillerin <i>Galleria mellonella</i> larvalarını enfekte etme oranlarının Genel Doğrusal Model analizi ile değerlendirilmesi (%).....	81
Çizelge 4.11. 10 ve 15°C’de bekletilen kutulardaki infektif juvenillerin <i>Galleria mellonella</i> larvalarını enfekte etme oranlarının Genel Doğrusal Model analizi ile değerlendirilmesi (%).....	81

Çizelge 4.12. 10°C’de bekletilen kutulardaki larva içerisine giren infektif juvenil sayıları	83
Çizelge 4.13. 10°C’de bekletilen kutulardaki larva içerisine giren infektif juvenil sayılarının Genel Doğrusal Model analizi ile değerlendirilmesi	83
Çizelge 4.14. 15°C’de bekletilen kutulardaki larva içerisine giren infektif juvenil sayıları.....	85
Çizelge 4.15. 15°C’de bekletilen kutulardaki larva içerisine giren infektif juvenil sayılarının Genel Doğrusal Model analizi ile değerlendirilmesi.....	86
Çizelge 4.16. 10 ve 15°C’de bekletilen kutulardaki larva içerisine giren infektif juvenil sayılarının Genel Doğrusal Model analizi ile değerlendirilmesi	86

1. GİRİŞ

1.1. Nematodlar

Nematodlar boyları birkaç mm ile birkaç metre arasında değişen segmentsiz, genellikle silindirik ve uzun bir vücut yapısına sahip canlılardır. Sindirim, üreme ve kas sistemleri olan nematodların, ayrıca basit bir boşaltım ve sinir sistemleri de bulunmaktadır. Ancak nematodlarda özelleşmiş bir dolaşım ve solunum sistemi yoktur (Koppenhöfer, 2007).

Metazoa grubu içerisinde yeryüzünde birey sayısı bakımından en fazla bulunan canlı grubu olan nematodların kambriyen patlamasıyla ya da bundan kısa bir süre önce ortaya çıktıkları düşünülmektedir. Tür sayısının 400.000 ile 10 milyon arasında hatta 100 milyon gibi daha yüksek bir rakamda olabileceği tahmin edilmektedir (Adams vd., 2006). Pek çok nematod türü böceklerle foreziden, parazitizm ve patojeniteye kadar değişen farklı ilişkiler içerisindedir (Koppenhöfer, 2007). Şimdiye kadar böceklerle ilişkili 30'dan fazla nematod familyası tanımlanmıştır. Bu familyalardan 7 tanesinde [(Mermithidae ve Tetradonematidae (Ordo: Stichosomida); Allantonematidae, Phaenopsitylenchidae ve Sphaerulariidae (Ordo: Tylenchida); Heterorhabditidae ve Steinernematidae (Ordo: Rhabditida)] bulunan türler böceklerle biyolojik mücadelede kullanılma potansiyeline sahiptir (Stock ve Hunt, 2005; Koppenhöfer, 2007). Ancak günümüzde yalnızca Heterorhabditidae ile Steinernematidae familyalarına ait nematodlar mikrobiyal insektisit olarak kullanılmakta ve dünya genelinde pek çok firma tarafından ticari olarak üretilmektedir (Koppenhöfer, 2007).

1.2. Entomopatojenik Nematodlar (Fam: Steinernematidae ve Heterorhabditidae)

Heterorhabditidae ve Steinernematidae familyalarındaki nematodlar doğada zorunlu böcek patojenleridir. Dünya üzerinde Antartika kıtası hariç hemen her yerden izole edilmişlerdir. Bu nematodlar topraktan elde edilirler ve dağılımları öncelikle uygun konukçularının varlığı ile sınırlanmaktadır (Adams vd., 2006). Steinernematidae familyasında *Steinernema* ve *Neosteinerinema* olmak üzere 2 farklı cins bulunmaktadır. Şimdiye kadar *Steinernema*'da 63 tür, *Neosteinerinema*

cinsinde ise yalnızca 1 tür tespit edilmiştir. Heterorhabditidae familyasında da *Heterorhabditis* (18 tür) ve *Heterorhabditoides* (1 tür) olmak üzere iki cins içerisinde toplam 19 tür tanımlanmıştır (Mráček vd., 2006; Uribe-Lorio vd., 2007; Zhang vd. 2008; Lee vd., 2009; Stock vd., 2009). Yapılan filogenetik çalışmalar Heterorhabditidae familyasının omurgalı canlılarda parazit olan Strongylida ile yakın akraba olduğunu göstermektedir. Strongylida ise serbest yaşayan ve bakteri ile beslenen *Pellioiditis* ile en yakın ortak atayı paylaşmaktadır. Bu nedenle Heterorhabditlerin muhtemelen serbest yaşayan ve bakteri ile beslenen bir atadan geldiği tahmin edilmektedir. Aynı hipoteze göre Steinernematidae familyasının serbest yaşayan, böceklerle ilişkili Panagrolaimoidea ve omurgalı paraziti Strongyloidea familyalarıyla yakın akraba olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlara göre Steinernematidae familyası serbest yaşayan, fungusla beslenen ve bitki parazitlerini içeren taksonların bulunduğu daha geniş bir gruba aittir. Bu nedenle kökeni ile ilgili belirsizlik vardır (Adams vd., 2006).

1.3. Entomopatojenik Nematod-Bakteri İlişkisi

“Entomopatojenik nematod (EPN)” terimi ile mutualistik bakteriler yardımıyla konukçularını kısa sürede öldürebilen (nematod ve konukçu türüne bağlı olarak 1-4 gün arasında değişen sürelerde) nematodlar kastedilmektedir (Adams vd., 2006). Steinernematidae familyası *Xenorhabdus*, Heterorhabditidae ise *Photorhabdus* cinsi bakteriler ile mutualistik ilişki içerisindedirler (Bode, 2009). Taksonomik çalışmalara göre her entomopatojenik nematod türü tek bir bakteri ile mutualistik ilişki içerisindeyken, bakteri simbiyotları birden fazla nematod türü ile ilişkili olabilmektedir (Hazır vd., 2003). Bu mutualistik ilişkilerin ilk defa Orta Paleozoikte (yaklaşık 350 milyon yıl önce) Heterorhabditlerin ve Steinernematidlerin atalarıyla *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* soylarını oluşturacak Gram-negatif enterik bakteriler (Enterobacteriaceae) arasında birbirinden bağımsız olarak başladığı düşünülmektedir. Bakteriler bu simbiyotik ilişkide dış ortamdaki çevre şartlarından ve topraktaki rekabet ortamından korunarak besince zengin böcek dokusuna kendilerini taşırlar (Adams vd., 2006). Nematodlar ise bakterinin patojenik özelliği ile konukçuyu öldürmesinden faydalanmaktadır. Bakteriler ayrıca nematodun gelişimi ve üremesi için böcek dokusunu uygun hale getirmektedir. Ayrıca topraktaki diğer mikroorganizmaların içerisinde

nematodların üremekte olduğu kadvraya yerleşmesini engellemektedir (Boemare, 2002; Griffin vd., 2005). Ortaya çıkan bu bakteri-nematod kompleksinin zararlı böceklerle karşı güçlü bir biyolojik mücadele silahı haline gelmesini son 15 yıldır bu gruplar üzerine yapılan araştırmaların artmasıyla açıklamak mümkündür (Adams vd., 2006).

Entomopatojenik nematod enfeksiyonları pek çok belirti ile tanımlanabilmektedir. Ölümden kısa bir süre sonra kadvralarda yumuşama ve renk değişimi gözlenmektedir. Mum güvesi, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarında nematod türüne göre kadvralarda farklı renklenmeler görülmektedir. Steinernematid enfeksiyonunda koyu sarıdan, kahverenginin farklı tonları veya tamamen siyaha kadar değişen renkler görülürken, heterorhabdit ile enfekte böcekler kırmızı, kiremit kırmızısı, mor, turuncu, sarı veya yeşil renkte olabilmektedir. Kadavranın renklenmesi özellikle *Photorhabdus* bakterilerinin ürettiği pigmentlerle ilişkilidir. Steinernematid ile enfekte olan böcekler nematod gelişimi sırasında yumuşak ve gevşek görünmektedirler. Bununla beraber heterorhabdit enfeksiyonlarında kadvralar daha sıkı bir görüntüye sahip olurlar. Eğer böcek kütikulu yeterince saydam ise içerideki nematodlar dışarıdan kolaylıkla görülebilmektedir. Enfekte olan kadvralar çürümez ve parçalandığında kötü bir koku yaymazlar. Kadavranın vücut içeriği zamanla azalmasına rağmen asla akışkan hale gelip bütünlüğünü kaybetmez. Heterorhabdit ile enfekte kadvralarının içeriği ise sakızimsı bir hal alır (Koppenhöfer, 2007).

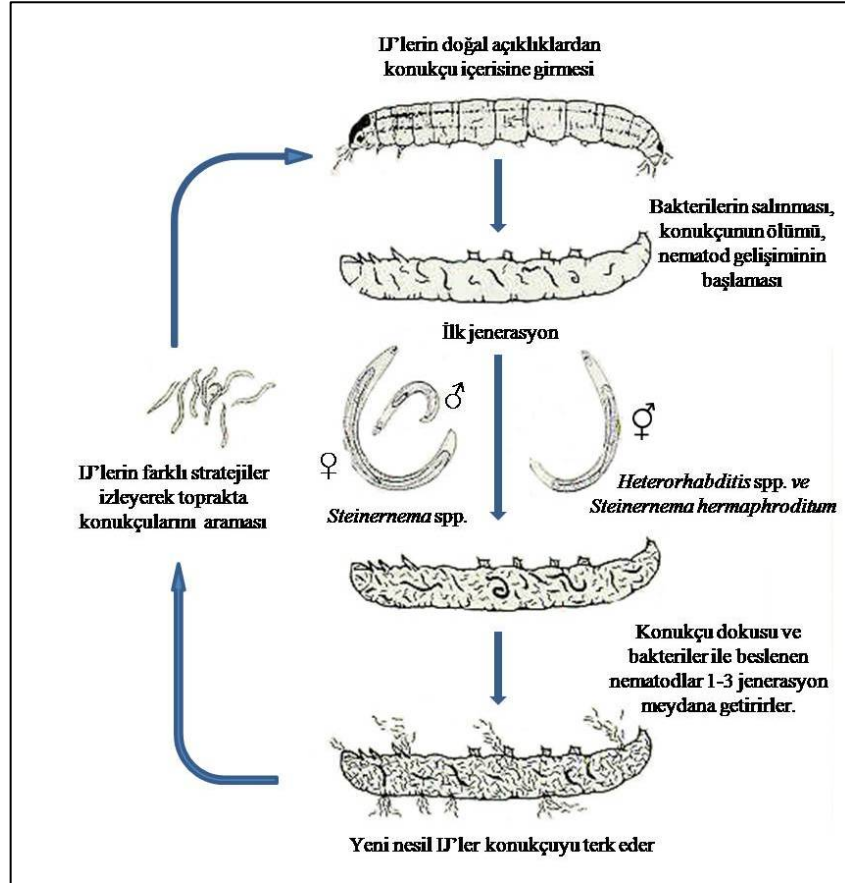
1.4. Entomopatojenik Nematodların Hayat Döngüleri

Bilinen bütün entomopatojenik nematod türleri benzer biyolojiye sahiptirler. Nematodun sadece infektif veya dauer juvenil (IJ) olarak adlandırılan evresi toprakta bulunmaktadır. Bu evrede ağız ve anüs kapalı durumda olup, beslenme ve üreme olayları gerçekleşmez (Kaya ve Gaugler, 1993). Toprakta kendilerine uygun bir konukçu bulan IJ'ler, böceğin doğal açıklıklarından (ağız, spirakıl, anüs) veya kütikulasındaki zayıf bölgelerden (sadece heterorhabditlerde görülmüştür) hemosol içerisine girip ortama simbiyont bakterilerini bırakmaktadırlar. *Xenorhabdus* bakterileri nematodların anüsünden, *Photorhabdus*'lar ise ağızlarından konukçu hemosolüne salınmaktadır (Adams vd., 2006). *Steinernema* türleri periyodik olarak salgıladıkları enzimlerle konukçunun bağışıklık sistemini baskılayabilmektedir. Bu sayede simbiyont bakterilerin ortama bırakılması

kolaylaşmaktadır. *Heterorhabditis* türlerinin buna benzer proteinler üretilip üretilmediği henüz bilinmemektedir. Mutualistik bakteriler *Steinernema* türlerinde infektif juvenillerin bağırsaklarındaki özel bir kesede, *Heterorhabditis* türlerinde ise özellikle bağırsağın anterior bölümünde yoğun olarak bulunurlar. Infektif juvenillerin içerisindeyken bu bakteriler durgun fazdadırlar (Boemare, 2002). Böcek hemosolü içerisine salınan bakteriler burada hızlı bir şekilde üremeye başlayarak bir dizi toksin ve hidrolitik enzim üretirler. Konukçu böcek bu olay sonucunda 24-48 saat içerisinde septisemia'dan ölmektedir. Salınan enzimler aynı zamanda böcek dokusunu parçalayıp nematodların üreme ve gelişimleri için gerekli olan bir besin çorbası oluştururlar. Ayrıca bakteriler ürettikleri bazı maddeler sayesinde kadavrayı diğer mikroorganizmaların istilasına karşı korumaktadır (Forst ve Clarke, 2002; Clarke ve Eberl, 2006). Konukçu içerisinde gelişmeye başlayan infektif juvenil nematodlar, parçalanmış böcek dokusu ve bakterilerden oluşan karışımla beslenerek 4. juvenil evre, ardından ergin dişi ve erkek nematodlar haline gelmektedirler. Çiftleşen dişiler yumurtalarını konukçu dokusuna bırakabilir veya olgun dişiler uterusları içerisinde yumurtalarını bekletebilmektedir. Gelişimlerini tamamlayıp açılan yumurtalardan çıkan yeni nesil nematodlar konukçunun veya dişi bireyin vücut dokusuyla beslenmeye başlamaktadır. Bu sırada vücutlarının içerisi yeni nesil infektif juvenillerle dolu olan dişi nematodların bu durumuna "Endotokia matricida" evresi adı verilmektedir (Griffin vd., 2005). Genel olarak bakıldığında entomopatojenik nematodların hayat döngülerinde 4 juvenil (J1, J2, J3, J4), ergin ve yumurta olmak üzere 6 evre bulunmaktadır. 1. ve 2. juvenil evre yumurta içerisindeydir. Yumurtadan 2. juvenil evrede çıkan bireyler sırayla J3, J4, ergin bireylere gelişmektedirler. Nematodların üremesi kadavradaki besin bitene kadar devam etmektedir. Bu sırada konukçunun büyüklüğüne bağlı olmakla beraber genellikle 1-3 jenerasyon meydana getirilmektedir. Besin tükendiği zaman gelişimlerini infektif juvenil (J3) safhasında durduran ve simbiyont bakterilerini vücutlarında tekrar depolayan yeni nesil IJ'ler kadavrayı terk ederek yeniden konukçu aramaya başlamaktadır (Adams ve Nguyen, 2002; Hazır vd., 2003) (Şekil 1.1.).

Heterorhabditler ile steinernematidlerin hayat döngüleri arasındaki en önemli farklılık *Heterorhabditis* erginlerinin kadavra içerisindeki ilk jenerasyonda hermafrodit bireylerden oluşmasıdır. Sonraki nesillerde ise hermafroditlerle birlikte ayrı eşeyli bireyler de görülmektedir (Gaugler ve Kaya, 1990). Oysa

Steinernema erginlerinde bütün jenerasyonlarda bireyler ayrı eşeylidir. Bir istisna olarak *Steinernema hermaphroditum* türünde ilk jenerasyonda hermafrodit bireylere rastlanmıştır (Stock vd., 2004).



Şekil 1.1. Entomopatojenik nematodların genel hayat döngüsü

1.5. Entomopatojenik Nematodların Mutualistik Bakterileri: *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* spp.

Xenorhabdus ve *Photorhabdus* bakterileri Protobacteria'nın γ -alt sınıfında bulunan Enterobacteriaceae familyası içerisinde yer alırlar. Bu familyanın üyeleri gram-negatif, çubuk morfolojili, fakültatif anaerobik, oksidaz negatif, sporlanmayan, kemoorganik heterotrof solunum yapan, fermentif metabolizmaya sahiptir. İki cins arasındaki temel farklılık, pek çok *Photorhabdus* izolatu biyoluminesens

yapmaktadır ve katalaz pozitifdir. Oysa *Xenorhabdus* cinsi her iki özelliğe de sahip değildir (Boemare ve Akhurst, 2006).

Her iki bakteri cinsinin fenotipik olarak farklı formları bulunmaktadır. Faz I olarak adlandırılan doğal form yalnızca ilişkili oldukları nematodlarda bulunur. Bununla beraber Faz II yani ikincil form bakteriler yapay ortamda üretildiği zaman kendiliğinden ortaya çıkmaktadır. Bu iki faz arasında morfolojik ve fizyolojik farklılıklar bulunmaktadır. Faz I'deki bakteriler antibiyotik üretmektedir. Belli boyaları absorblayabilir ve kristalleşmiş proteinlerden oluşan hücre içi inkülüzyon cisimciklerine sahiptirler. Oysa Faz II safhasındaki bakteriler bu özellikleri taşımamaktadır. Ürettikleri inkülüzyon cisimcikleri ise etkin değildir (Boemare ve Akhurst, 2006).

Photorhabdus bakterilerinin enfeksiyon esnasında belirli bir yol takip ettiği tespit edilmiştir. Öncelikle hemolenf içerisinde hızla üreyip immün sistem yok edilmekte, ardından orta bağırsak içerisine bir dizi toksin salınmaktadır. Enfeksiyonun ileri safhasında ise metallo-proteazlar salınarak bağırsak epitelini parçalanmakta ve dokular nematodların besleneceği hale getirilmektedir. *Photorhabdus* bakterileri mcf (make caterpillar floppy) geni tarafından kodlanan toksinlere sahiptir. Bu toksinler böceğin bağırsak dokusunu parçalamaktadır. *Xenorhabdus*'un konukçu dokusuna yerleşirken izlediği yol henüz tam anlaşılmamıştır. Fakat hücre dışı yüzeyinin lipopolisakkarit bileşenlerinden endotoksinler salgılayarak doku hücrelerini parçaladıkları tahmin edilmektedir (Adams vd., 2006).

Bakteriler kadavra içerisinde hızla çoğaldıktan sonra üreme safhalarının sonuna doğru, ortamı diğer mikroorganizmalara karşı koruyacak bir takım antimikrobiyal bileşikler üretmektedirler. Bu bileşikler diğer bakteri, fungus ve mayalara karşı etkili olan antibiyotikleri (Webster vd., 2002) ve *Photorhabdus* türlerine yakın bakterilere karşı aktif olan lumisinler (Sharma vd., 2002) ve xenorhabdisin (Thaler vd., 1995) gibi bakteriosinleri içermektedir. Bakteriosinlerin varlığı nematodla aralarındaki simbiyotik açısından önemlidir. Bu sayede rekabete girebilecek benzer bakteri gruplarına üstünlük sağlamaktadırlar. Lumisinler diğer *Photorhabdus* türleri dışında, filogenetik olarak da uzak bir tür olan *E. coli*'ye de etkilidir. Böylece böceğin bağırsak florasının temizlenmesinde de bu bakteriosinlerin rol oynadığı düşünülmektedir (Sharma vd., 2002).

1.6. Entomopatojenik Nematodların Konukçu Dağılımı

Laboratuvar koşullarında iyi bilinen pek çok entomopatojenik nematod türü (*S. carpocapsae*, *S. feltiae* ve *H. bacteriophora*) pek çok farklı böcek grubunu enfekte edebilmektedir. *S. carpocapsae*'nin laboratuvar şartlarında farklı ordolardan 250'den fazla böcek türünü enfekte ettiği bilinmektedir (Poinar, 1990). Ancak alan uygulamalarında nematodların ekolojisi, potansiyel konukçuları ve aynı zamanda çevresel faktörler nedeniyle infektif juveniller tarafından enfekte edilen konukçu çeşitliliği çok daha kısıtlıdır (Peters, 1996). Bilinen bazı entomopatojenik nematod türleri ise sınırlı bir konukçu dağılımına sahiptir. Örneğin *S. scapterisci* Gryllotalpidae familyasının üyelerine adapte bir türdür (Parkman ve Smart, 1996). *S. kushidai* ve *S. scarabaei* türleri ise Scarabaeidae familyasının larvalarına özelleşmişlerdir (Koppenhöfer ve Fuzy, 2003). Bu üç türün diğer böcek gruplarına karşı düşük patojenite gösterdikleri gözlenmiştir.

Nematod türlerinin topraktaki yerleşimleri de türler arasında farklılık göstermektedir. En çok çalışılan türlerden *S. carpocapsae*'nin genellikle toprağın ilk 1-2 cm'lik kısmında, *H. bacteriophora*'nın ise yaklaşık 8-10 cm derinliğe yerleştiği bildirilmektedir. Genel olarak *H. bacteriophora* populasyonlarının *S. carpocapsae* ve *S. feltiae*'ya göre düzensiz, parçalı bir dağılım gösterdikleri bilinmektedir. Bununla ilgili olarak düzenli dağılım oluşturacak şekilde alana uygulanan *H. bacteriophora* türünün, uygulamadan 2 ay sonra tekrar parçalı bir yayılım sergilediği tespit edilmiştir (Lewis, 2002).

Toprak tipi nematodların hareketini, canlılığını ve infektivitesini etkileyen abiyotik bir faktördür (Kung vd., 1990). Küçük partikül yapılı topraklar hareket etmeyi zorlaştırırken, kumlu ve kumlu-tınlı topraklar nematodların kolayca hareket etmelerine imkan vermektedir (Lewis, 2002).

Yapılan pek çok çalışmada elde edilen veriler ışığında entomopatojenik nematodların Symphyla, Collembola, Arachnida, Crustacea, Gastropoda, Diplopoda, Isopoda ve Tardigradae gibi pek çok farklı omurgasız canlı ve hedef olmayan organizma üzerinde önemli bir olumsuz etkisinin olmadığı görülmüştür. Ancak laboratuvar koşullarında ve yüksek dozlarda yapılan uygulamalarda entomopatojenik nematodların kesin olmamakla beraber böcekler dışındaki arthropod türlerini enfekte edip, üreyebildikleri bildirilmiştir (Poinar, 1989;

Jaworska, 1993). Toprak solucanları üzerinde hiçbir patojenik etki tespit edilememiştir (Akhurst ve Smith, 2002). Aynı şekilde omurgalılardan kurbağalar, kertenkeleler ve fareler ile yapılan çalışmalarda entomopatojenik nematodlar hiçbir patojenik etkiye neden olmamıştır (Poinar vd., 1982; Kermarrec vd., 1991; Akhurst ve Smith, 2002).

Nematodlar dışında bakteriyal simbiyontlarının da omurgalılara karşı muhtemel olumsuz etkileri araştırılmıştır. Yapılan deneylerde tavuklarda, yetişkin farelerde derialtına, yavru farelerde beyin içerisine enjekte edilen *X. nematophila* ve *P. luminescens* bakterilerinin hiçbir patojenik etki göstermediği bildirilmiştir (Poinar vd., 1982). Benzer şekilde kobay, fare ve sıçanlara oral yolla ya da deri altından verilen *X. bovienii* hiçbir toksik veya patojenik belirti meydana getirmemiştir. Ayrıca tavşanlarda yapılan konjuktival uygulamalarda, kobay ve farelere solunum yoluyla aşılmalarda hiçbir zararlı etki gözlenmemiştir (Obendorf vd., 1983; Akhurst ve Smith, 2002). Ancak klinik bir vaka ile keşfedilen *Photorhabdus asmybiotica* türünün insanlarda yumuşak dokularda lokal tahribatlara yol açtığı ve bakteremik enfeksiyonlar ile yayıldığı belirtilmiştir. Şimdiye kadar bu bakteriye Amerika Birleşik Devletleri ve Avustralya'da yalnızca klinik vakalarda rastlanmıştır. Ancak *P. asmybiotica*'nın ilişkili olduğu bir nematod türüne rastlanmamıştır (Gerrard vd., 2004). Daha sonra yapılan çalışmalarda bazı *P. asmybiotica* alt türlerinin *H. indica* türü ile mutualistik ilişki içerisinde olduğu tespit edilmiştir (Kuwata vd., 2008).

1.7. Entomopatojenik Nematod-Konukçu İlişkileri

Entomopatojenik nematodların etkinlik derecesi, nematod türü ya da izolatına, böcek türüne ve böcek türünün gelişim evresi gibi pek çok biyolojik faktöre bağlıdır (Eidt ve Thurston, 1995; Simoes ve Rosa, 1996).

Entomopatojenik nematodlar enfekte etmeye çalıştıkları konukçularının davranışsal veya mekanik engellemeleri ile karşılaşabilmektedir. Dolayısıyla böceğin içerisine girişte ağız, anüs gibi kısımlarına kolayca ulaşamamaktadır. Nematod saldırısı hissedildiğinde bacaklar kullanılarak sık sık vücudun temizlemesi (Scarabaeidae larvaları), kuvvetli çırpınmalar, ortamdan uzaklaşma gibi davranışsal tepkiler görülmektedir (Gaugler vd., 1994). Ayrıca septa denen yapılar (Elateridae) ya da Scarabaeidae, Tipulidae larvalarında bulunan delikli

yapıdaki plakalar ile kaplı spirakıllar mekanik bir bariyer olarak böceğin içerisine girişte trakeal sistemin kullanılmasını zorlaştırmaktadır. Yine bazı Lepidoptera veya Diptera türlerinde ise spirakıllar çok dar basit yapılı borular halini almıştır. Pek çok böcek türünde segmentler arası, bağırsağın ön ve arka kısımlarının iç tarafı veya peritrofik membran bu yolla konukçuya girişi engellemek için çok kalın ve sıkı yapıdadır. Ayrıca ağızdaki mandibuller ile nematodların parçalanması, yüksek miktarda dışkı atımı veya anüsün kaslarla sıkıca kapatılması, CO₂ salınımının azaltılması, geçirgen olmayan kokon veya toprakta odacık yapımı gözlenen diğer tepkilerdir (Gaugler vd., 1994; Eidt ve Thurston, 1995; Dowds ve Peters, 2002). Sosyal böceklerde nematodlara karşı bireysel tepkilerin yanında patojenlere karşı koloni halinde gösterilen davranışlarda (temizlenme, enfekte bireyin yuvadan izole edilmesi veya uzaklaştırılması, koloninin yer değiştirmesi) bulunmaktadır (Klein, 1990; Gouge, 2005).

İnfektif juveniller konukçunun vücut boşluğuna ulaşabilmek için ince kütikülü, dokuları, ve mukus sıvısı gibi doğal bariyerleri geçmek zorundadır. Bağırsağın başlangıcına, malpigi tüplerine veya peritrofik membran ile orta bağırsak epiteli arasındaki vücut boşluğuna ulaştıkları zaman ancak vücut dışına atılmaktan kurtulurlar. Bunları yapabilmek için nematodlar fiziki güç kullanırlar. Örneğin vücutlarını ince kütikülden içeriye iterler ya da heterorhabditlerde olduğu gibi ağızlarında terminal olarak yerleşmiş dişler ile bunu gerçekleştirebilirler (Koppenhöfer, 2000; Dowds ve Peters, 2002).

Böceklerin nematodlara gösterdikleri tepki birbiriyle etkileşim halinde olan hücresel ve humoral eylemlerden (fagositoz, nodül oluşumu, hücresel veya melanotik kapsülleme, antimikrobiyal peptid üretimi) oluşmaktadır. İlk aşamada gösterilen tepki nematodlara yöneliktir. Çünkü bakteriler bu esnada zaten nematodun içerisinde bulunmaktadır. Ancak bakteriler nematodun konukçuya girmesinden sonraki 30 dakika ile 5 saat arasında böcek hemosolüne bırakılırlar. Nematodlar çoğunlukla melanin ile sağlamlaştırılmış hücresel kapsüllerle veya yapısında melanin bulunan vücut sıvılarıyla çevrelenerek hapsedilmektedir. Kapsül içerisine alma Orthoptera, Coleoptera, Diptera ve Lepidoptera gruplarında görülmektedir. Bununla beraber tepkinin derecesi böceğin ve patojenin türüne ve o anki fizyolojik durumuna göre değişiklik göstermektedir (Dowds ve Peters, 2002). Örneğin *Acheta domesticus* (Gryllidae), *S. carpocapsae* ve *H. bacteriophora* türlerini kapsül içerisine alırken, *S. scapterisci* türüne karşı etkisizdir. *S. glaseri*

türü *Popillia japonica* (Scarabaeidae) larvasında tanınıp kapsül içerisine alınmasına rağmen bu kapsülün içinden kaçıp kurtulabilmektedir (Wang vd., 1995). Bir başka çalışmada ise *Heterorhabditis* infektif juvenillerinin penetrasyon esnasında J2 kütikülünü geride bırakarak tipulid larvalarında kapsül içine alınmaktan kurtuldukları tespit edilmiştir (Peters vd., 1997).

Böcekler nematodların simbiyontu olan bakterileri fagosite ederek, granüositler tarafından nodül içerisine alarak veya sekropin gibi antimikrobiyal peptidler ile yok etmeye çalışmaktadır. Ancak bakteriler nodül içerisinde de çoğalmaya devam edebilmektedir. Eğer nodül yapısı uygun ise tekrar hemolenfe çıkarak, konukçuyu öldürmektedirler. Nematod-bakteri birlikteliği böceğin bağışıklığına karşı ortak hareket etmektedir. Nematodlar melanin oluşumu için gerekli pro-feniloksidaz salınımını ve bununla beraber hemolenfteki antimikrobiyal aktiviteyi inhibe etmektedir. Bakteriler ise enzimatik aktiviteler ile böceğin bağışıklığını bozmaktadır. Örneğin *X. nematophila*'nın lipopolisakkaritleri feniloksidaz aktivasyonunu baskılamaktadır. Ayrıca bu bakterinin lipid A molekülü hemositlere toksik etki yapmaktadır (Dowds ve Peters, 2002; Ciche vd. 2006). Simbiyotik bakteriler aynı zamanda konukçuyu paralize eden egzotoksinler, sitotoksinler ve hücre dışı proteolitik enzimler üretebilmektedir (Boemare vd., 1997; Forst vd., 1997).

1.8. Entomopatojenik Nematodların Ekolojileri

Entomopatojenik nematodların bolluğu ve dağılımları muhtemelen pek çok toprak bileşeni tarafından etkilenmektedir. Toprak entomopatojenik nematodlar açısından değerlendirildiğinde konukçu ve konukçu olmayan artropodlar, rekabetçiler, predatörler, parazitler ve patojenler bakımından büyük bir çeşitliliğe sahiptir (Stuart vd., 2006). EPN'lerin bir alandaki kalıcılığını ve varlığını etkileyen temel biyotik faktör muhtemelen uygun konukçuların varlığıdır (Mráček vd., 1999).

1.9. Entomopatojenik Nematodların Konukçu Bulma Davranışları

İnfektif juveniller toprakta konukçularını iki farklı stratejiyle; pusu kurarak "ambusher" veya aktif bir şekilde dolaşarak "cruiser" aramaktadır. Pusu kurma stratejisini *S. carpocapsae*, *S. scapterisci*, *S. siamkayai* gibi türler tercih etmektedir ve toprak yüzeyine yakın durma eğilimindedirler. Bu türler pusu kurma esnasında

vücutlarının %95'ten fazlalık bölümünü substrat üzerinde yukarı kaldırarak kuyrukları üzerinde durabilmektedir. Böylece yanlarından geçen konukçulara temas edebilmektedirler. Bu davranış "nictation" olarak tanımlanmaktadır. Ancak bu davranışın vücudun dümdüz, hareketsiz bir şekilde tutulması, kısmen kaldırılması ve ileri geri sallanma şeklinde farklı formları bulunmaktadır. Pusu kuran türlerin en tipik örnekleri olan *S. carpocapsae* ve *S. scapterisci* infektif juvenillerinin saatlerce hareketsiz biçimde kaldıkları bilinmektedir. Bunu yapan türler aynı zamanda sıçrama yeteneğine de sahiptirler. Doğrudan sıçrama konukçuya tutunma için kullanılırken, dolaylı sıçramanın dağılımda rol oynadığı düşünülmektedir. İnfektif juveniller böylece bulunduğu bölgeden başka bir bölgeye geçerek orada konukçu arama işlevlerini sürdürebilmektedir. *S. carpocapsae*'nin kendi vücut uzunluğunun 10 katı mesafeye sıçrayabildiği bilinmektedir. Pusu kuran türler genellikle konukçularının kendilerine gelmesini beklerler (Lewis 2002; Campbell vd. 2003; Lewis vd., 2006). *S. glaseri* ve *H. bacteriophora* gibi türler ise genellikle aktif olarak konukçularını arayan bir stratejiyi tercih etmektedir. Bu stratejiyi kullanan türler toprakta sabit veya çok az hareket eden konukçuları bulup enfekte etmektedir. Aktif arama davranışı gösteren nematodların hiç biri "nictation" hareketini yapmazlar. *S. riobrave* ve *S. feltiae* türleri ise bu iki davranış biçiminin ortasında bir davranışa (intermediate) sahiptirler (Campbell ve Gaugler, 1997).

1.10. Entomopatojenik Nematodların Dağılımları

İnfektif juveniller toprakta konukçuları aktif olarak arayıp bulabilen canlılardır. Yapılan çalışmalar sonucunda 30 gün içerisinde toprakta yatay veya dikey olarak 90 cm kadar bir mesafe katedebildikleri tespit edilmiştir. Bunun yanında su, rüzgar, forezis, enfekte konukçular, insan aktivitesi vb. yollarla pasif olarak daha uzak mesafelere yayılabilmektedirler (Kaya, 1990).

Doğada populasyonlar genel olarak düzgün, rastgele veya parçalı dağılım göstermektedir. Ancak gözlemlenen modeller değerlendirme ölçütüne bağlıdır. Parçalı dağılımlar tür-içi veya türler arası etkileşimler veya kaynakların dağılımına bağlı olarak şekillenmektedir. Entomopatojenik nematod populasyonlarının doğada pek çok sebepten dolayı parçalı dağılım gösterdikleri tahmin edilmektedir. Bunun nedenleri arasında uygun habitatların ve konukçuların sayıca fazlalığı, tek bir konukçu içerisinde çok sayıda IJ'in (30000-40000 IJ) üremesi, toprakta sınırlı

mesafelerde dağılım göstermeleri, bir alana yerleşirken ve varlıklarını devam ettirirken karşılaştıkları koşullar sayılmaktadır (Stuart vd. 2006).

İnfektif juvenil popülasyonlarının uygulamalarda canlılıklarını uzun süre koruyamadıkları bilinmektedir. Toprağa uygulandıkları zaman ilk birkaç saat içinde %50'si UV ışınları ve kurumadan dolayı ölmektedir. Hayatta kalan IJ'lerin ise her gün ortalama %5-10 kadarı kaybedilmektedir. Böylece 1-6 hafta içerisinde uygulanan miktarın %1'nin geriye kaldığı tespit edilmiştir. Bu nedenle entomopatojenik nematodların zararlıların duyarlı evrelerinin bulunduğu zamanda kullanılması oldukça önemlidir (Kaya, 1990; Koppenhöfer, 2007).

1.11. Entomopatojenik Nematodları Etkileyen Biyotik ve Abiyotik Faktörler

1.11.1. Abiyotik Faktörler

Entomopatojenik nematodların doğal koşullar altında hayatta kalmalarını etkileyen biyotik ve abiyotik faktörler bulunmaktadır. Abiyotik faktörlerle nematod varlığını etkileyen sıcaklık, nem, toprak yapısı, UV, PH, tuzluluk ve kimyasal pestisitler kastedilmektedir (Kaya, 2002).

1.11.1.1. UV

UV ışığı nematodları inaktive eden ve dakikalar içerisinde ölmelerine neden olan önemli bir abiyotik faktördür (Gaugler ve Bousch, 1978).

1.11.1.2. Nem

Nem ise nematodların performansını etkileyen en önemli faktördür. IJ'ler etkili biçimde ilerleyebilmek için bir su filmine ihtiyaç duymaktadırlar. Toprakta, IJ'ler partiküller arasındaki boşlukları kaplayan su filmlerini kullanarak hareket ederler. Eğer bu su filmi kurak topraklardaki gibi çok ince veya suya doymuş topraklarda partiküller arası boşluklar tamamen dolu olursa nematodların hareketi kısıtlanmaktadır (Kung vd., 1991; Brown ve Gaugler, 1997).

1.11.1.3. Sıcaklık

Sıcaklığın nematod performansına etkisi türlere veya soylara göre değişiklik göstermektedir (Grewal vd., 1994). Genel olarak IJ'ler düşük sıcaklık derecelerinde (<10-15°C) durgunlaşmaktadır. Daha yüksek derecelerde ise (>30-40°C) inaktive olmaktadır. 0°C'nin altında ve 40°C üzerindeki sıcaklıklar maruz kalınan süreye de bağlı olarak nematodlar için öldürücüdür (Glazer, 2002). Pek çok tür için canlı kalınan en uygun sıcaklık aralığı 5-15°C arasındadır. Daha yüksek sıcaklıklar metabolik aktiviteyi artırarak enerji rezervlerinin tükenmesine ve yaşam süresinin kısalmasına sebep olmaktadır (Georgis, 1990).

1.11.1.4. Toprak yapısı

Nematodların yayılmaları ve canlılıklarını korumaları toprak tipleri arasında da farklılık göstermektedir. İnce-taneli yapıdaki topraklarda canlı kalma oranlarının ve yayılmalarının daha düşük olduğu varsayılmaktadır. Ancak en düşük canlılık oranı killi topraklarda görülmektedir. Daha düşük hayatta kalma oranının muhtemelen toprak porlarındaki az oksijen miktarıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (Kaya, 1990; Alekseev vd., 2006).

1.11.1.5. Oksijen

Benzer biçimde oksijen, suya doymuş veya yoğun miktarda organik materyal içeren topraklarda sınırlayıcı bir faktör olabilmektedir (Kaya, 1990).

1.11.1.6. PH

Toprağın PH değerleri IJ canlılığı üzerinde önemli bir etkiye sahip değildir. PH 4 ile 8 arasındaki değerlerde IJ etkinliği değişiklik göstermemektedir. Ancak PH 10'da IJ canlılık oranı hızla düşmektedir (Kung vd., 1990). Bununla beraber ilave araştırmalara göre çeşitli toprak parametrelerinde farklı nematod türleri farklı şekilde etkilenmektedir (Koppenhöfer ve Fuzy, 2003).

1.11.2. Biyotik Faktörler

Nematodlar için gerekli olan biyotik faktörler ise ortamdaki konukçu, doğal düşman veya bitki varlığıdır. Bunlar ortamın fiziksel koşullarını (toprağın nemi, sıcaklığı, gözenekliliği vb.) iyileştirerek nematodların hayatta kalmasına uygun bir çevre yaratmaktadırlar (Kaya, 2002). Biyotik faktörler ve etkileriyle ilgili pek çok kapsamlı araştırma yapılmıştır. Antibiyozis olarak adlandırılan bazı durumlarda topraktaki bitki köklerinden birtakım kimyasallar salınmakta ve bunlar IJ'lerin konukçu aramasını olumsuz etkilemektedir. Bazen ise enfekte konukçu içerisinde bulunan kimyasallar nematod enfeksiyonunu ve üremesini etkilemektedir. Bir konukçu içinde çok fazla sayıda IJ'nin bulunması durumunda türü rekabet nedeniyle ortamın nematodlar için uygunluğu azalabilmektedir. Türlerarası rekabet olduğu durumlarda ise lokal türlerden birisinin ortadan kalkmasına neden olabilmektedir. Türler arası rekabet özellikle aynı bölgeye uygulandıklarında diğer böcek patojenleri arasında da yaşanabilmektedir. Rekabetin sonucu, rekabetçilerin türüne (entomopatojenik fungus, bakteri veya virüs), enfeksiyon zamanına veya sıcaklık ve nem gibi çevresel faktörlere bağlıdır (Koppenhöfer, 2007).

Üzerinde pek çok araştırma yapılmış nematofag funguslar dışında nematodların diğer doğal düşmanları collembola, tardigrad, akar ve predatör nematodlar gibi omurgasız canlılardır. Bu doğal düşmanların laboratuvarında yapılan toprak denemelerinde nematod populasyonlarında düşüslere neden oldukları tespit edilmiştir. Ancak tarla şartlarında etkileri ile ilgili çok az şey bilinmektedir (Kaya, 2002).

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. ADF (Ant Deterrent Factor-Karınca Uzaklaştırıcı Faktör) Maddesinin Farklı Gruplardan Yağmacı Böceklere Karşı Etkisinin Tespiti ve Maddenin Yapısını Aydınlatmaya Yönelik Çalışmalar

Bakteriler, dünya üzerindeki biyolojik ve filogenetik olarak en fazla çeşitlenmiş canlı grubudur. Yaklaşık olarak 3,5-4 milyar yıl önce ortaya çıktıkları tahmin edilmektedir (Francino vd., 2006). Son 20 yılda yapılan çalışmalarla çoğunluğu gen dizi analizlerine göre yaklaşık 44 bakteri filumu tanımlanmıştır (Adams vd., 2006).

Pek çok bakteri ökaryot konukçuları ile uzun süreli ve karşılıklı olarak yarar sağlayan ilişkiler içerisindedir. Bakteriler ve hayvanlar arasındaki mutualistik ilişkilerden en iyi bilineni, Hawaii kısa kuyruk mürekkep balığı *Euprymna scolopes* (Sepioloidea) ile biyoluminesens yapan *Vibrio fischeri* türü bakteriler arasındadır. Mürekkep balığı bakterilere amino asit formunda besin sağlamakta, buna karşılık bakterinin biyoluminesens özelliğini kullanmaktadır. Biyoluminesens ile bir çeşit kamuflaj oluşturarak suyun derinliklerinden saldırabilecek predatörlerden saklamaktadır (Singleton, 1999; Forst ve Clarke, 2002). Bakteriler ve nematodlar arasında da mürekkep balığı-bakteri arasındaki gibi benzer mutualistik ilişkiler bulunmaktadır. Buna en iyi örneklerden birisi *Steinernema* ve *Heterorhabditis* cinsine ait entomopatojenik nematodlar ile Enterobacteriaceae familyasındaki *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterileri arasındaki ilişkidir (Forst ve Clarke, 2002). Enterobacteriaceae familyasındaki bakteriler ökaryotik konukçuları ile fırsatçı patojenlikten, mutualistik ilişkilere kadar farklı etkileşimler içerisindedirler (Adams vd., 2006; Francino vd., 2006).

Bakterilerin çoğu kendi türlerinden veya diğer türlerden bakterileri inhibe eden çeşitli moleküller üretme yeteneğindedir. Bu moleküllere örnek olarak, toksinler, bakteriyolitik enzimler, primer metabolik yan ürünler, antibiyotik bileşikler, bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddeler verilebilir (Jack vd., 1995; Başbülbul, 2009).

Genel anlamıyla antibiyotikler, bir organizma tarafından üretilen ve diğer bazı organizmaların gelişimi açısından zararlı olan kimyasallardır. Pratik anlamda

antibiyotikler nispeten küçük konsantrasyonlarda gelişimi önleyen sekonder metabolitlerdir. Bu özellikleriyle amonyak, organik asitler ve hidrojen peroksit gibi metabolik yan ürünlerden farklıdır. Bakteriyosinler ise enfeksiyonlara karşı klasik anlamda bir koruyuculuk olmasa da aynı çevrede bulunan bakterilerin, diğer bakterileri öldürerek, besin için rekabet etmesinde avantaj sağlarlar (Hancock ve Diamond, 2000). Laktik asit bakterileri başta olmak üzere *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Mycobacteria*, *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Streptomyces* gibi pek çok cinse ait üyelerin bakteriyosin sentezlediği bilinmektedir (Tagg vd., 1976).

Bakteriyolitik enzimlere ise lizostafin, fosfolipaz ve hemolizinler örnek olarak verilebilir. Organik asitler, amonyak ve hidrojen peroksit gibi primer metabolik yan ürünler ve bakteriler tarafından üretilen pek çok sekonder metabolitler antibakteriyal aktiviteye sahiptirler (Jack vd., 1995).

Xenorhabdus ve *Photorhabdus* bakterileri pek çok ikincil metabolitin yanında faz durumlarına bağlı olarak bakteriosinler, kolisin E3 tip öldürücü proteinler ve böcek toksin kompleksleri (Tc's) üretmektedirler. Çünkü bu bakteriler kompleks hayat döngülerinde yalnızca konukçuyu öldürmekle kalmayıp, kadavrayı böceğin bağırsak florasından ve topraktan gelen diğer rekabetçi mikroorganizmalara karşı da savunmak zorundadırlar (Bode, 2009). *Photorhabdus* bakterileri faz I evrelerinde bir bölümü antimikrobiyal özelliğe sahip olan ikincil metabolitler üretirler. Şimdiye kadar bu metabolitlerle ilgili hidroksi-stilben ve poliketidler (Antraquinon türevleri) olmak üzere iki farklı grup kimyasal tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda bazı *Photorhabdus luminescens* subsp. *luminescens* ve *P. temperata* izolatlarının *in vitro* şartlarda antibakteriyal antraquinone pigmentleri ve hem antibakteriyal hem de antifungal özelliğe sahip trans-stilben ürettikleri tespit edilmiştir (Boemare ve Akhurst, 2006; Bode vd., 2007). Aynı zamanda *Photorhabdus* bakterileri faz I evrelerinde pigmentte üretmektedir. Bakteri soylarına göre renklenme değişiklik göstermekle birlikte bu pigmentten dolayı enfekte kadavralar genelde kırmızı renkli olmaktadır (Boemare ve Akhurst, 2006).

Photorhabdus, izopropylstilben (isopropylstilbenes) ve etilstilben (ethylstil-benes), antraquinon (anthraquinones-AQs) ve sidrofor fotobaktin (sidero-phore photobactin) ürettiği bilinen tek bakteri cinsidir (Bode, 2009). Özellikle stilbenler ve AQ'ler çok basit bileşiklerdir; ancak sıra dışı bir biyosentezin sonucunda

kompleks bir ekolojik rolleri vardır. Oysa stilbenler tipik bitki metabolitleridirler (örneğin üzümdeki veya kırmızı şaraptaki resveratrol gibi). *Photorhabdus* bakterileri bitkiler alemi dışında stilben üretebilen tek canlıdır. Stilbenler gram-pozitif bakterilere ve funguslara karşı antibiyotik aktivite gösterirler, böceklerin immün sistemindeki fenol-oksidadları inhibe ederler ve nematodların tam bir gelişim göstermeleri için gerekli sinyal molekül olarak görev yaparlar (Bode, 2009).

AQ'lar ise bitki, fungus ve bakterilerdeki yaygın metabolitlerdir. Genel olarak karınca ve kuşları uzaklaştırıcı özellikleriyle bilinen bu bileşik sınıfının *Photorhabdus* bakterileri için önemli bir ekolojik duruma hizmet ettikleri varsayılmaktadır (Pankewitz ve Hilker, 2008; Bode, 2009). *Photorhabdus* bakterilerince üretilen AQ'lar biyokimyasal olarak poliketid sentaz (PKS) tip-2 mekanizmasıyla meydana getirilmektedir. Şimdiye kadar farklı *Photorhabdus* soylarından 7 tane AQ tanımlanmıştır. Bunlardan 5'i yapay ortamda üretilen bakterilerden elde edilmişken, diğer 2 bileşik yalnızca böcek larvasındaki *Photorhabdus* kültürlerinden izole edilmiştir (Bode vd., 2007). *Photorhabdus* bakterileri Gram-negatif bakteriler içerisinde PKS tip-2 mekanizmasına sahip ikinci örnektir (Bode, 2009).

Buna ek olarak bazı *Photorhabdus* soyları tarafından üretilen protein toksinlerinin oral yolla ya da enjeksiyon yoluyla pek çok böcek türüne etkili olması son yıllarda biyolojik mücadelede bunlara olan ilgiyi artırmıştır. Her ne kadar oral enfeksiyonun *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus*'un biyolojisinde önemli olmadığı düşünülse de, toksin kompleksleri (Tc's) ve *Photorhabdus* böcek-ilişkili (*Pir*) toksinlerin her ikisi de bazı böcek türlerine karşı oral aktiviteye sahiptir. Bunların aksine tırtıl yumuşatıcı (make caterpillar floppy) toksinler *mcf1* ve *mcf2* ile *PVCs* (*Photorhabdus* virulence cassettes) toksinlerinin her ikisi de enjeksiyon yoluyla etkin olabilmektedir. (Boemare ve Akhurst, 2006; Ffrench-Constant vd., 2007).

Toksin kompleksleri (Tc's) yüksek moleküler ağırlığa sahip, birden fazla alt ünitesi bulunan Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen insektisit özelliğine sahip toksinlerdir. Bunu kodlayan genler ilk olarak entomopatojenik nematodlar ile ilişkili *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* bakterilerinde tanımlanmıştır. Bunun ardından toksin komplekslere benzer lokuslar tamamen böceklerle ilişkili (*Serratia entomophila* vb.) veya böceklerle

belirli bir ilişkisi bulunmayan bir dizi bakteride de tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalar ile toksin kompleksler pek çok kromatografi basamağıyla *Tca*, *Tcb*, *Tcc* ve *Tcd* olarak adlandırılmış 4 farklı komplekse ayrılmıştır. Saflaştırılmış *Tca*'nın *Bacillus thuringiensis* tarafından yapılan δ -endotoksin gibi böceğin orta bağırsağının epitelyumunu parçaladığı tespit edilmiştir (Ffrench-Constant vd., 2007).

Faz I evresindeki *Xenorhabdus* bakterileri için şimdiye kadar bilinen ikincil metabolit moleküller çoğunlukla benzilidenaseton (benzylideneacetone), iodin (iodine), fenetilamid (phenethylamides) ve indol (indole) türevleridir. Ancak bunun yanında hibrid PKS/NRPS sisteminden köken almış Xenorhabdins, Xenorxides (oksitelemiş Xenorhabdinler) ve Xenocoumacins (XCNs) gibi daha kompleks bileşikler de bilinmektedir. Basit yapılarına rağmen bu bileşiklerin farklı biyolojik aktiviteleri tanımlanmıştır (Boemare ve Akhurst, 2006; Bode, 2009).

Entomopatojenik nematodlar (Steninerematidae ve Heterorhabditidae) ve mutualistik ilişkili bakterileri (*Xenorhabdus* spp. ve *Photorhabdus* spp.) doğal düşmanları ile beraber aynı toprak ortamında bulunurlar. İnfektif juvenillere saldıran birkaç doğal düşmanın (protozoa, turbellaria, tardigrad, oligocheta, nematod, akar ve böcekler) olduğu bilinmekle beraber, doğal koşullarda bunların nematod popülasyonları üzerindeki etkileri hakkında çok az şey bilinmektedir (Kaya, 2002). Entomopatojenik nematodların predasyona uğramasıyla ilgili olarak ilk kayıt Poinar (1979) tarafından bildirilmiştir. Bu çalışmada *Macrocheles* cinsine ait akarların *S. carpocapsae* infektif juvenilleri ile beslendiği gözlemlenmiştir. Bunu takiben Ishibashi vd. (1987) yaptıkları çalışmalar ile mesostigmatid akar *Eugamasus* sp., tardigrad *Macrobiotus richtersi* ve *Clarkus* sp. ile *Actinolaimus* sp. nematodlarının *S. carpocapsae* infektif juvenillerini avladığını rapor etmişlerdir (Kaya, 2002). Yapılan bir başka çalışmada da Gilmore ve Potter (1993) *Folsomia candida* (Isotomidae) ve *Sinella caeca* (Entomobryidae) türlerine ait collembolaların *S. carpocapsae* infektif juvenilleri ile beslendiklerini bildirmişlerdir. Karınca (Formicidae), hamamböceği (Blattidae), kulağakaçan (Forficulidae) veya sümüklüböcekler gibi diğer yağmacıların da nematod enfeksiyonunun erken safhalarında kadvralar ile beslenerek infektif juvenil üremesinin yarıda kesilmesine neden oldukları bilinmektedir (Baur vd., 1998; Zhou vd., 2002).

Omnivorlar ve yağmacılar entomopatojenik nematodların populasyon dinamikleri üzerinde önemli bir rol oynamaktadırlar. İnfektif juveniller konukçularını enfekte ettikten sonra simbiyont bakterileri konukçuyu 48 saat içerisinde öldürmektedir. Bundan sonraki dönemde nematodlar konukçu içerisinde üremektedir. Yeni nesil infektif juvenillerin çıkış yapmasına kadar geçen sürede (7-15 gün) kadavra toprağın içerisinde ya da üzerindedir. Bu esnada kadavra içerisinde gelişmekte olan nematodlar omnivorların veya yağmacıların saldırılarına açık vaziyettedir (Baur vd., 1998; Kaya, 2002). Muhtemelen böyle bir durumda omurgasız canlıların kadvraları diğer yağmacılar tarafından birkaç dakika veya saat içerisinde hızlı bir biçimde tüketilmektedir (Foltan ve Puza, 2009). İnfektif juvenillerin kadavra içerisinde kaldığı sürenin uzunluğu nematodun türüne veya çevresel şartlara göre değişiklik göstermektedir. Ancak nematod populasyonlarının varlığı ve biyolojik mücadele çalışmalarının başarısı bu 7-15 günlük süre içerisinde kadvralardaki nematodların hayatta kalabilmesine bağlıdır. Yağmacıların ve omnivorların etkileri çok iyi bilinmemekle beraber oldukça önemli olduğu düşünülmektedir (Baur vd., 1998; Kaya, 2002).

Yapılan ön çalışmalarda karıncaların böcek kadvraları üzerinde önemli yağmacılar oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca karıncalar yağmacı, herbivor ve predatör olarak dünya genelinde önemli bir role sahiptirler (Baur vd., 1998). Ancak yapılan bazı çalışmalarda böcek kadvraları nematodla enfekte ise karınca gibi yağmacıların bunlara karşı ilgisinin azaldığı gözlenmiştir. Bu araştırmacılar ADF (Karınca uzaklaştırıcı faktör) olarak adlandırdıkları bir maddenin kadvraların yağmalanmasını engellediğini ileri sürmüş ve ADF'nin entomopatojenik nematodların simbiyontları (*Photorhabdus* ve *Xenorhabdus*) tarafından üretilen bir kimyasal olduğunu belirtmişlerdir.

Tez çalışmasının bu bölümünde Türkiye topraklarından izole edilmiş olan nematodlar ve mutualistik ilişkide oldukları bakterilerin ADF aktiviteleri üzerine araştırmalar yapılmıştır. Karınca uzaklaştırıcı faktör olarak adlandırılan ADF maddesinin karıncalar ve diğer olası yağmacı böcek grupları üzerindeki etkilerine de bakılmıştır. Ayrıca maddenin yapısını aydınlatmaya yönelik çalışmalar da gerçekleştirilmiştir.

2.2. Entomopatojenik Nematodların Çizgili Pamuk Yaprak Kurdu *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae)'ya Karşı Biyolojik Mücadelede Kullanılmasına Yönelik Araştırmalar

Dünya genelinde doğal çayırlar milyonlarca hektar alanı kaplamaktadır ve yaban hayatı için besin kaynağı olmaktadır. Günümüzde golf sahalarından, stadyumlara ve evlerin bahçelerine kadar pek çok alanda çim sahalar ana vejetasyonu oluşturmaktadır. Rekreasyon ve besin amaçlı kullanımının yanısıra meralar ve yeşil alanlar, erozyonu önleyerek, toprağın iyileştirilmesi ve yenilenmesini sağlamaktadır. Bunun yanında yaban hayatı için devamlı bir habitat yaratarak, karbon gazlarını tutarak, sıcaklığı ayarlayarak, gürültü ve ışık kirliliğini azaltarak, ayrı bir öneme sahiptir. Çayırlar pek çok omurgasız türe yaşam alanı olmaktadır. Ancak bu canlıların çoğu doğrudan vejetasyon üzerinden beslenmekte ve önemli ölçüde zarara sebep olmaktadır (Grewal vd., 2005; Klein vd., 2007).

Dünya genelinde özellikle Scarabaeidae ve Curculionidae familyaları ile Lepidoptera takımının larvaları yeşil alanlarda önemli zararlara sebep olmaktadır. Ayrıca bazı böcek (Curculionidae) ve sinek (Diptera) larvalarının bitkilerin gövdelerine girerek sürgünlerin ölümüne sebep oldukları bilinmektedir. Çim alanlardaki zararlı türlerin beslenme davranışları onların topraktaki yerleşim yerlerini belirlemektedir. Örneğin Scarabaeidae (Coleoptera) larvaları genellikle yeşil bitkilerin köklerini tercih etmekte ve bu nedenle toprak içerisinde bulunmaktadır. Lepidoptera larvaları ise daha çok yapraklar, bazen de köklerle beslenmektedir. Yaprak ile beslenen türler kesici tırtıllar veya çim tırtılları olarak bilinmektedir. Kesici tırtıllar olarak adlandırılan türler gündüzleri bitki örtüsünün altında veya toprak içerisinde saklanırlar. Geceleri ise yapraklar ve sürgünlerle beslenmek için yüzeye çıkmaktadırlar. Kozmopolit zararlılar olan *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae) ve *Agrotis segetum* türleri Kore'deki golf sahalarında önemli zararlara yol açmaktadır. Zaman zaman ortaya çıkan bu türler ilkbaharın başlangıcında ya da sonbaharda etkili olmaktadır. Tüm Kuzey Amerika'ya yayılmış olan *A. ipsilon* yılda birkaç döl verebilmektedir. Golf sahaları ve yürüyüş yollarındaki yeşil alanlar için sürekli bir problemdir. Ancak çayırlarda bu kadar önemli zarar meydana getirmemektedir. Diğer bir Lepidoptera türü *Spodoptera deprevata*'nın (Japon kesici tırtılı) ise yılda 3-4 defa epidemiyaptığı bildirilmiştir (Grewal vd., 2005; Klein vd., 2007). Ülkemizde ise *Spodoptera exigua*

(Lepidoptera: Noctuidae) türünün larvaları çok sayıda kültür ve yabani bitkilerinde zarar yapmaktadır. Zararlı olduğu bitkiler arasında pamuk, mısır, ayçiçeği, tütün, sebzeler ve bunlara benzer daha birçok bitki sayılabilir. Bundan başka orman ve meyve ağaçlarında da zararlı olabilmektedirler (Anonim, 2008). Bu türün kelebeğinin kanat açıklığı 18-30 mm arasındadır. Ön kanatlar esmerimtrak kahverengiden açık gri renge kadar değişiklik gösterir. Bu kanatların orta bölümlerinde; dıştaki böbrek, içteki yuvarlak biçiminde olmak üzere açık renkli iki leke vardır. Arka kanatlar beyazimtrak, damarları ise koyu renklidir. Kanatların etrafı koyu kahverengi saçaklarla çevrilidir. Larvalar tam gelişince 3 cm kadar boy alırlar. Renkleri; konukçu bitkiye bireylerin toplu veya dağınık halde bulunmalarına ve aynı zamanda gelişme dönemlerine göre büyük değişiklik göstermekle birlikte, genellikle yeşilimsi ve kahverengimsi bir görünüştedirler. Yanlarında vücut boyunca uzanan bantlar bulunur. Yumurtalar beyaz renkli olup, yaklaşık olarak 0.4 mm çapındadırlar. Kümeler halinde bırakılan yumurtalar tüylerle örtülüdür. Kışı genellikle pupa durumunda geçirirler. Kışlayan dölün kelekleri nisan sonlarına doğru görülmeye başlarlar. Gündüzleri çeşitli yerlerde saklanarak geceleri uçuşurlar. Yumurtalarını genellikle yaprakların alt yüzüne, bazen de üst yüzüne kümeler halinde koyarlar. Bir dişi 1700 kadar yumurta bırakabilir. Yumurtaların kuluçka süresi sıcaklığa bağlı olarak 3-6 gün arasında değişir. Larvalar gelişmelerini 10-35 gün arasında tamamlarlar. Olgunlaşan larvalar toprak içinde veya yüzeyinde pupa olurlar. Yılda 3-5 döl verirler (Anonim, 2008; Capinera, 2008).

Gruplar halinde yaşayan genç larvalar, buldukları yaprak ve tomurcukların epidermisini yiyerek zararlı olurlar. Larvalar geliştikçe yaprak damar aralarını yiyerek geride yalnız yaprak damarlarını bırakırlar. Daha ileriki dönemlerde ise yaprağın tamamını yiyip bitirirler. Boylanan bitkilerde toprak üzerinde bulunan yan köklerle de beslenirler. Zarar derecesi bitkinin durumuna ve zararlı yoğunluğuna bağlı olarak büyük farklılıklar gösterir. Bazı durumlarda % 100'e yakın zarar yapabilmektedir. Bu zararlı ülkemizde hemen her yerde görülmektedir. Bunlarla mücadelede yaygın olarak kimyasal insektisitler kullanılmaktadır. Ülkemizde de bu zararlılar ile mücadelede Tarım ve Köyişleri Bakanlığı tarafından Carbaryl ve Malathion isimli kimyasal insektisitler tavsiye edilmektedir (Anonim, 2008). Ancak Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa ülkelerinde son yıllarda yapılan çalışmalarla buna benzer Lepidoptera türlerine karşı kimyasal

insektisit kullanımına sınırlama getirilmiştir. Amerika Birleşik Devletlerinde pek çok organik fosforlu ve sentetik piretroid, carbaryl ve halofenozidler kesici tırtıllarla mücadelede kullanılmaktadır. Kullanılan kimyasallar ülkelere göre çeşitlilik göstermektedir. Kimyasalların çevre ve insan sağlığı üzerine olumsuz etkileri ve zararlıların direnç kazanmaları uzmanları biyolojik mücadele yöntemlerine ve bu amaçla kullanılan canlılara yöneltmiştir. Bunlardan birisi çevre ile dost, insan sağlığına olumsuz etkileri olmayan, geniş konukçu dağılımları olan ve kitle üretimleri yapılabilen entomopatojenik nematodlardır. Bu canlılar uygulama yapıldığı alanda şartlar uygun olduğu sürece kendi kendine üreyerek varlığını devam ettirebilmektedirler. Aynı zamanda uygulanan diğer kimyasal ve biyolojik pestisitlerle de uyumludurlar (Hazır vd., 2003; Grewal vd., 2005; Georgis vd., 2006). Günümüzde bazı entomopatojenik nematod türleri örneğin *Steinernema carpocapsae* yeşil alanlarda çim zararlısı Lepidoptera türlerine karşı oldukça başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Grewal vd., 2005).

Tez çalışmasının bu kısmında ülkemiz topraklarından elde edilmiş yerli entomopatojenik nematod türleri, Muğla'nın Ortaca ilçesine bağlı Sarıgerme Beldesindeki çim alanlarda çok yoğun zarar yapan *S. exigua* larvalarına karşı test edilmiştir.

2.3. Entomopatojenik Nematod Kültürlerinin Muhafaza Edilmesinde Kullanılan Hücre Kültür Kaplarına Alternatif Yeni Bir Saklama Kabı

Bir konukçu dışında bulunabilen ve toprak içerisinde aktif olarak konukçu arayan infektif juvenil (IJ) evre nematodları canlı olarak muhafaza etmenin en basit yolu sulu süspansiyonlar içerisinde saklamaktır (Kaya ve Stock, 1997; Koppenhöfer, 2007). Dünyada entomopatojenik nematodlarla ilgili çalışma yapılan pek çok laboratuvarında *in vivo* ya da *in vitro* kültürlerde üretilip toplanan IJ'ler doku kültür kaplarında IJ'lerin boyutları ve hareketliliğine bağlı olarak 300-5000 IJ/ml yoğunluğunda depolanmaktadır. Hava geçirebilen ve vidalı kapaklı doku kültür kaplarına yatık olarak konduğunda genelde derinliği 5-7 mm olacak şekilde nematod süspansiyonu konmaktadır. Daha yüksek nematod konsantrasyonları (100.000 IJ/ml) süspansiyon uygun şekilde havalandırıldığı takdirde (ör: akvaryum pompası kullanılarak) aynı yöntemle saklanabilmektedir. Ayrıca IJ'lerin kabın yüzeyine yapışmasını engelleyen Triton X-100 maddesinden veya özellikle heterorhabditlerin kümelenmelerini engelleyen birkaç damla sodyum

bikarbonattan süspansiyonlara eklenmektedir (Koppenhöfer, 2007). IJ'ler aktivitelerini kaybetmeden sulu süspansiyonlar halinde 4-15°C'de (nematod türüne bağlı olarak) steinernematidler için 6-12, heterorhabditler için 3-6 ay saklanabilmektedirler (Kaya ve Stock, 1997). Daha yüksek sıcaklık derecelerinde depolama ömrü epeyce azalmaktadır. Denemelerde ise nematodlar üretildikten sonra tercih edilen bekletme süresi 4-15°C'ler için <1-2 aydır. Ancak oda sıcaklığında bu süre 2 haftadan daha azdır (Koppenhöfer, 2007).

Günümüzde nematod kültürlerinin saklanmasında kullanılan doku/hücre kültür kapları polistiren malzemeden üretilmektedir (Becton Dickinson and Company (<http://www.bd.com/>; <http://tr.wikipedia.org/wiki/Polistiren>). Polistiren monomer haldeki stirenden polimerizasyon ile üretilen bir polimerdir. Petrolden elde edilir. Plastik endüstrisinde daha çok "PS" kısaltması ile kullanılır. Oda sıcaklığında, polistiren katı halde bir termoplastiktir. Yoğunluğu 1.03-1.06 gr/ml arasında değişir. Maksimum sıcaklık dayanımı 70°C dir. Oldukça sert, kırılğan ve parlaktır. Nispeten düşük erime noktasına sahip, çok pahalı olmayan bir reçinedir. UV ışınlarına iyi direnç gösterir, iyi darbe ve gerilme direnci, düşük fiyat ve işleme kolaylığı vardır. Asit alkali ve tuzlara karşı da üstün bir direnç gösterir. Özellikle genetik ve moleküler biyolojinin en temel uygulamalarından biri olan hücre kültür kapları dışında izolasyon malzemesi olarak ince cidarlı kaplarda, soğutma kulelerinde, boru köpük, kauçuk, çeşitli aletler, otomobil parçaları, paneller ve elektronik aletlerin plastik aksamalarında yaygın olarak kullanılır. Tek kullanımlık bardak, tabak, yoğurt kapları, ayran kaplarının yapısında sıklıkla bulunur (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Polistiren>).

İsveç firması olan Tetra Pak'ın aynı isimle ürettiği Tetra Pak malzeme süt ürünleri, gıda ve meyve suyu kategorilerinde ambalajlama, paketleme ve saklamada kullanılmaktadır. Kozmopolit bir malzeme olup içeriğinde %75 oranında kağıt ve %25 oranında polietilen+alüminyum (polialüminyum) bulunmaktadır (<http://www.Tetrapak.com.tr>). Tetra Pak ambalaj malzemesi, (dıştan içe) 7 ayrı katmandan oluşmaktadır. Bu tabakalar ve işlevleri şöyle sıralanabilir:

1. Polietilen: Dış etkilere ve neme karşı koruma
2. Baskı mürekkebi
3. Karton: Sağlamlık

4. Polietilen: Yapıştırıcı tabaka
5. Alüminyum folyo: Oksijen, tat ve ışık engeli
6. Polietilen: Yapıştırıcı tabaka
7. Polietilen: Sıvı tutucu tabaka

(http://tr.wikipedia.org/wiki/Tetra_Pak_Paketleme_Sanayi_ve_Ticaret_A.Ş.)

Polistiren çok düşük fiyatlarla üretilen bir malzemedir (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Polistiren>). Ancak polistiren yapılı hücre kültür kaplarının fiyatları ise oldukça yüksektir. Örneğin bilimsel araştırmalarda ürünleri en çok tercih edilenlerden birisi olan NUNC® firmasının hücre kültür kaplarının 50 adetlik paket fiyatları hacme göre 200-600 USD arasındadır (<http://www.coleparmer.com>). Corning® CellBIND® firmalarının hücre kültür kaplarının paket fiyatları ise yine hacme göre 242-342 Euro arasında değişmektedir (<http://www.sigmaaldrich.com>).

Yürütülen bu çalışmada doku kültür kaplarına alternatif olarak Tetra Pak malzemenin imal edilen karton kutular nematod kültürlerinin saklanması için kullanılmak amacıyla test edilmiştir. Gıda maddelerinin saklanması için tercih edilen, doku kültür kaplarına göre yapısında daha az kimyasal madde içeren ve günlük hayatta aldığımız besin maddeleriyle evlerimize sıklıkla giren bu Tetra Pak kutularının nematod kültürlerinin saklanması için firmalar tarafından özel olarak üretilen doku kültür kaplarına karşı iyi bir alternatif olup olmayacağı test edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. ADF (Ant Deterrent Factor-Karınca Uzaklaştırıcı Faktör) Maddesinin Farklı Gruplardan Yağmacı Böceklere Karşı Etkisinin Tespiti ve Maddenin Yapısını Aydınlatmaya Yönelik Çalışmalar

3.1.1. Nematod ve Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması

Enfekte kadavra deneylerinde Aydın ili sınırları içerisinde izole edilmiş *Heterorhabditis bacteriophora* (izolat 09-43) ve *Steinernema feltiae* (izolat 09-31) türü entomopatojenik nematodlar kullanılmıştır. Nematod kültürleri laboratuvar şartlarında içerisinde kepek, un, bal, gliserin, maya, balmumu ve süt tozu bulunan yapay ortamda (Mohammed ve Coppel, 1983) kültürleri yapılan *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvaları kullanılarak üretilmiştir (Hazır vd., 2003). Üretilen nematodlar 15°C'de yaklaşık 1000 infektif juvenil/ml'lik sulu süspansiyonlar halinde saklanmıştır. Kullanılan bütün nematod izolatları en fazla 3 hafta bekletilmiştir.

Bakteri deneyleri *H. bacteriophora* türünün mutualistik bakterisi *Photorhabdus luminescens* ile yapılmıştır. Bakteri izolasyonu için nematodla 24 saatlik enfekte *G. melonella* larvaları kullanılmıştır. Yüzeyi %70'lik alkol ile 4 dakika süreyle steril edilen larvaların bacak köklerine steril iğne batırılarak hemolenf sıvılarının dışarıya çıkması sağlanmıştır. Bu hemolenf sıvısı steril bir öze kullanılarak alınmış ve daha önceden hazırlanan Nutrient agar + bromtimol mavisi + tetrazolium klorid (NBTA) ortamına aktarılmıştır (Akhurst, 1982). 28°C'de 48 saatlik inkübasyon sonunda üreyen koloniler koloni morfolojisi, mikroskopik incelemeler ve katalaz testlerinin ardından sıvı besi ortamı olan Tryptic Soy Broth (TSB) (Fluka) ve Caso agar (Fluka) besi yerlerine aktarılmıştır. Caso agarda üretilen kolonilerden çalışma süresince kullanmak üzere Skimmilk (Fluka) ortamına stok kültürler alınmış ve -80°C de saklanmıştır. Bütün deneylerde kullanılan bakteriler TSB ortamında çalkalamalı inkübatörde ve 28°C'de üretilmiştir.

3.1.2. Kadavra Deneyleri

3.1.2.1. Karıncalar ile yapılan deneyler

Çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Kampüs alanında ve yaklaşık 10 km uzaklıktaki Serçeköy bölgesinde bulunan *Lepisiota frauenfeldi* (Hymenoptera: Formicidae) türüne ait karınca kolonileri ile yapılmıştır. Deneyler 2007-2009 yıllarının Haziran-Eylül ayları arasındaki dönemde ve öğleden sonra 15:00-18:00 saatleri arasında gerçekleştirilmiştir. Deney sahasının doğrudan güneş ışığı almamasına dikkat edilmiştir. Hava sıcaklığı deneyler esnasında ortalama 30-35°C derece olarak ölçülmüştür. Her iki karınca kolonisinden tür teşhislerinin yapılması için %70'lik alkol içerisine birey örnekleri alınmıştır. *L. frauenfeldi* türünün teşhisi Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden Prof. Dr. Nihat Aktaç tarafından yapılmıştır.

İlk olarak Baur vd. (1998) ve Zhou vd. (2002) tarafından yapılan çalışmalardaki gibi karıncaların entomopatojenik nematodlar ile enfekte böcek kadvralarına verdikleri tepkiler gözlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla *H. bacteriophora* ve *S. feltiae* ile 2 ve 4 günlük enfekte kadvralar hazırlanmıştır. İçlerinde filtre kağıdı bulunan 10 cm'lik petripler içerisine 1000 IJ/ml nematod süspansiyonundan 800 µl uygulanmıştır. Ardından petrilere 5'er adet son dönem *G. mellonella* larvası (180-230 mg) eklenmiştir (Zhou vd., 2002). İki ve 4 günlük enfekte larvalar elde etmek için aynı işlem 2 gün sonra yeni larvalar ile tekrarlanmıştır. Larvaları eklenen petripler nem kaybını engellemek için plastik poşetler içerisinde muhafaza edilmiş ve oda sıcaklığında (23-24°C) bekletilmiştir. Enfekte kadvralar ilgilerini kolayca çekmek için karınca kolonisinin yuva girişine veya sürekli kullandıkları yollara bırakılmıştır. Denemelerde önce kadvralar sabitlenmeden toprağın üzerine bırakılmıştır. Ancak karıncaların denemeler sırasında kadvraların yerini sık sık değiştirmesi ve bu nedenle deney gruplarının karışmasından dolayı sonraki denemelerde larvalar 20 numara toplu iğne (Balkaya A. Ş.) ile karton zemine sabitlenmiştir. Bu sırada koloni bireylerinin davranışları takip edilmiş, filme alınıp fotoğraflanmıştır. Kontrol grubu olarak -20°C de 2 saat süreyle dondurularak öldürülmüş *G. mellonella* larvaları kullanılmıştır (Baur vd., 1998; Zhou vd., 2002).

Baur vd. (1998) tarafından öne sürülen kadavralarda bakterilerin oluşturduğu kırmızı renk nedeniyle karıncaların tepki verdiği yönündeki hipotezi test etmek için 1 ile 6 gün arasında *H. bacteriophora* ile enfekte bir kadavra serisi oluşturulmuştur. Diğer yandan enfekte kadavralarla eşlenecek şekilde 1-6 günlük dondurularak öldürülmüş ve daha sonra kırmızı gıda boyasıyla boyanmış larvalar hazırlanmıştır. Karton bir zemine 20 numara toplu iğneler ile sabitlenen kadavralar karınca yuvasının girişine bırakılmıştır. Karıncaların davranışları 3 saat süreyle kamera ile kaydedilmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.1.2.2. Çekirgeler ile yapılan deneyler

Deneyler için Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Kampüs alanından ve Aydın ilinin Kuşadası ilçesine bağlı Güzelçamlı kasabası çevresinden toplanan *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera: Gryllidae) türü kara çekirgeler ile 25 bireyden oluşan laboratuvar kolonileri oluşturulmuştur. Dişi, erkek ve nimflerden oluşan koloniler, 25°C sıcaklıkta, 30x30x50 cm ebatlarındaki insektaryumlarda tutulmuştur. İsektaryumlar pencere önüne konularak mevsimsel bir ışık periyodu sağlanmıştır. Kolonilere besin olarak kuru köpek maması ve dondurularak öldürülmüş *G. mellonella* larvaları, elma, portakal ve taze çimen verilmiştir. *G. bimaculatus*'un ADF maddesine duyarlılığı enfekte kadavralar kullanılarak test edilmiştir. Bunun için dört farklı kadavra grubu hazırlanmıştır.

- 1) Monoksenik entomopatojenik nematod kültürleri ile enfekte
- 2) Aksenik entomopatojenik nematod kültürleri ile enfekte
- 3) Entomopatojenik bakteri *Serratia marcescens* ile enfekte
- 4) Çürümekte olan larvalar

Karton bir zemin üzerine 0.10 numara (Austerlitz Insect Pins®) böcek iğneleriyle sabitlenen kadavralar 24 saat aç bırakılmış çekirge kolonilerine beslenmeleri için verilmiştir. Kontrol grubundaki larvalar -20 °C'de 2 saat süreyle dondurulmuştur. Denemeler oda sıcaklığında (23±1 °C) yürütülmüştür. Kadavralar 48 saat insektaryumda bırakılmıştır ve çekirgelerin davranışları takip edilip, filme alınmıştır. Ayrıca denemelerin başlangıcında ve sonunda kadavraların fotoğrafları çekilmiştir.

3.1.2.2.1. Monoksenik entomopatojenik nematod kültürü ile enfekte kadavra deneyleri

Monoksenik terimi simbiyotik bakterisini taşıyan entomopatojenik nematodlar için kullanılmaktadır (Boemare, 2002). Çalışmada *H. bacteriophora* ve *S. feltiae* türleri kullanılmıştır ve 24 saatte bir her ikisi ile daha önce belirtilen yöntem kullanılarak 5'er adet *G. mellonella* larvası enfekte edilmiştir. Larvaların enfekte edilmesi *H. bacteriophora* ile 9, *S. feltiae* ile 3 gün boyunca tekrarlanmıştır. Sonuçta *H. bacteriophora* ile enfekte olmuş 1-9 günlük, *S. feltiae* ile enfekte olmuş 1-3 günlük enfekte larva serileri elde edilmiştir. Hazırlanan enfekte kadvralar karton bir zemine 0.10 numara böcek iğnesi yardımıyla sabitlenmiştir. Hazırlanan deney düzeneği 24 saat aç bırakılmış *G. bimaculatus* kolonisine besin olarak verilmiş ve 48 saat sonra ortamdan uzaklaştırılıp kontrol edilmiştir. Bu süre içerisinde sık sık çekirgelerin davranışları incelenip kaydedilmiştir.

Çekirgelerin çok uzun süre aç kalması durumunda enfekte kadvraları besin olarak tüketip tüketmeyeceklerini test etmek amacıyla bir başka çalışma daha yürütülmüştür. Burada çekirgeler 1 hafta süreyle aç bırakıldıktan sonra yukarıdaki düzeneğinin aynısı çekirge kolonisinin yaşadığı inektaryuma bırakılmış ve 10 gün süreyle burada tutulmuştur.

3.1.2.2.2. Aksenik entomopatojenik nematod kültürü ile enfekte kadavra deneyleri

Aksenik terimi mutualistik bakterilerini taşımayan entomopatojenik nematodlar için kullanılmaktadır (Dowds ve Peters, 2002). ADF'nin bakteriyel kaynaklı bir madde olup olmadığını kesin olarak belirlemek amacıyla *G. bimaculatus* kolonisine aksenik nematodlarla enfekte kadvralar besin olarak verilmiştir. Bu çalışma için *S. feltiae*'nin aksenik kültürü hazırlanmıştır. Aksenik nematod kültürü elde etmek için Ehlers vd. (1997) takip ettikleri yöntem birkaç değişiklik yapılarak uygulanmıştır.

Aksenik nematod kültürünün hazırlanmasında izlenen yol:

- Kuyucuklarında 0,5 g steril kum bulunan 24 gözenekli kaplarda son evre *G. mellonella* larvaları *S. feltiae* ile (100 IJ/larva) enfekte edilmiştir.
- Enfekte kadavrular oda sıcaklığında ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) 3 gün bekletildikten sonra parçalanmıştır. Yumurtalı dişiler toplanarak içerisinde distile su bulunan bir petri kabına aktarılmıştır.
- İnce uçlu pens yardımıyla toplanan dişi nematodlar parçalanmıştır. Nematod dokuları ve yumurtalar 50 µm por çaplı elekten süzülerek birbirinden ayrılmıştır.
- Yumurtalar 2 ml'lik ependorf tüplerine aktarılıp 2000 rpm de 1 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür.
- Çöktürülen nematod yumurtaları steril ependorf tüplerine aktarılıp üzerlerine 1 ml yüzey sterilizasyon sıvısı (Bkz. Sf. 37) eklenmiştir. Daha sonra yumurtalar 4 dk boyunca yavaşça çalkalanarak yüzeyleri steril edilmiştir. Ardından 2000 rpm de 2 dk süreyle santrifüjlenmiştir.
- Üstteki yüzey temizleme sıvısı uzaklaştırılıp, tüpe Yeast Salts veya YS Broth (YSA) besiyeri eklenerek yumurtaların yüzeyi yıkanmıştır. Daha sonra yumurtalar Nutrient Lipid Agar (Woust Agar) besi yerine aktarılmıştır. Oda sıcaklığında bekletilen yumurtalar 2 gün içerisinde açılmıştır. Çıkan 2. juvenil evre (J2) nematodların beslenmesi için ortama Nutrient Broth (Merck) besiyerinde üretilmiş 24 saatlik *Escherichia coli* (ATCC 25922) kültüründen birkaç µl eklenmiştir.

Üreyen aksenik nematod kültürü steril olarak hazırlanan White trap (White, 1927) sistemine alınmıştır. Suya çıkan infektif evre (J3) nematodlar toplanarak 24 gözenekli hücre kültür kaplarında 7 gün boyunca *G. mellonella* larvalarını enfekte etmek için kullanılmıştır.

3.1.2.2.3. Monoksenik ve aksenik entomopatojenik nematodlarla enfekte kadvraların ADF aısından karşılaştırılması

Önceki deney düzeneklerine ilaveten, mutualistik bakterilerin ADF oluşumundaki rolünü daha iyi anlayabilmek için monoksenik ve aksenik kültürlerdeki infeksiif juvenil nematodlarla enfekte kadvralar bir arada test edilmişlerdir. Bu amaçla hem monoksenik hem de aksenik nematodlarla 1-7 günlük enfekte larva serileri oluşturulmuştur. Hazırlanan enfekte larvalar 0,10 numara böcek iğneleriyle baş ve kuyruk kısımlarından karton levhalara sabitlenip 24 saat aç bırakılmış *G. bimaculatus* kolonisine verilmiştir.

3.1.2.2.4. Entomopatojenik bakteri *Serratia marcescens* ile enfekte larva deneyleri

Daha önce yapılan çalışmalarda karıncaların entomopatojenik nematodlarla enfekte kadvralar ile nematodların mutualistik ilişki içerisinde oldukları *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* bakterileri tarafından üretilen ADF maddesinden dolayı beslenmedikleri öne sürülmüştür (Zhou vd., 2002). Bu deney ADF'nin sadece bu bakteriler (*Photorhabdus* ve *Xenorhabdus*) tarafından üretilip üretilmediğini test etmek için yapılmıştır. Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarından alınan *S. marcescens* (Toprak izolatu) bakterisinin 24 saatlik sıvı kültürü hazırlanmıştır. Bunun için ilk olarak -20°C'deki stok kültürden Nutrient Agar'a (Fluka) tek koloni ekimi yapılmıştır. Üreyen kolonilerden bazıları Nutrient Broth besiyerine aktarılıp 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu kültürden 10 µl bakteri süspansiyonu insülin iğnesiyle *G. mellonella* larvalarının hemosolüne enjekte edilmiştir. Enjeksiyon larvanın abdomen kısmındaki yalancı bacaklardan yapılmıştır (Zhou vd., 2002). Bu işlem 5 gün tekrarlanarak 1-5 günlük *S. marcescens* ile enfekte kadvra serisi elde edilmiştir. Aynı şekilde *P. luminescens* ile enfekte 1-5 günlük kadvra serisi de hazırlanmıştır. İki farklı kadvra grubu karton zemine 0,10 numara böcek iğneleriyle sabitlenip 24 saat aç bırakılmış *G. bimaculatus* kolonisine verilmiştir.

3.1.2.2.5. Çürümekte olan larva deneyleri

Bu çalışma doğal yollarla ölen ve kokuşan larvalar içerisinde üreyen istilacı mikroorganizmaların ADF veya buna benzer bir madde üretilip üretilmediğini veya kokuşma nedeniyle yağmacıların kadavrayı tüketip tüketmediklerini test etmek amacıyla yapılmıştır. Dondurulmuş larva denemesinde her gün 5 adet *G. mellonella* larvası -20°C’de 24 saat boyunca dondurulup daha sonra oda sıcaklığında (23-24°C) bekletilmiştir. Bu işlem 10 gün boyunca tekrarlanmıştır. Kadavraların kurumasını önlemek için petripler plastik poşetlerde muhafaza edilmiştir. Hazırlanmış olan 1-10 günlük kadavra serisi 24 saat aç bırakılmış *G. bimaculatus* kolonisine besin olarak verilmiştir.

3.1.2.3. Yabanarıları (Fam: Vespidae) (wasp) ile yapılan deneyler

Yabanarısı deneyleri 2008 yılının Ağustos ayında Aydın ilinin Germencik ilçesine bağlı Habibler köyünde bulunan 150-200 bireylik yabanarısı kolonileri ile yapılmıştır. Deney alanına gelen yabanarısı türünün *Paravespula* sp. türüne ait olduğu belirlenmiştir. Deneyler 14:00 ile 17:00 saatleri arasında yapılmış ve hava sıcaklığı ortalama 35°C olarak ölçülmüştür. Kullanılan kadavralar karınca ve çekirge deneylerindeki aynı yöntemle hazırlanmıştır (Baur vd., 1998; Zhou vd., 2002). *H. bacteriophora* ile enfekte 1-6 günlük kadavralar karton zemine iğne ile sabitlenip, yabanarısı kolonisinin yakınına bırakılmıştır. Koloniyi çekmek için deneyin başında kartonun üstüne bir parça kuzu karaciğeri bırakılmıştır. Yabanarıları kadavraları farkettikten sonra ciğer parçası uzaklaştırılmıştır. Kontrol grubu olarak yine -20°C’de 2 saat dondurulmuş *G. mellonella* larvaları kullanılmıştır.

3.1.3. Bakteri Deneyleri

3.1.3.1. Bakteri kültürlerindeki ADF aktivitesinin karıncalarda test edilmesi

Kadavra deneylerinin ardından aynı karınca kolonisi ile bakteri deneylerine devam edilmiştir. Deneylerde 24 gözenekli hücre kültür kapları (Nest Biotechnology Co., Ltd. veya Corning® Inc.) kullanılmıştır. Stok kültürden alınan *P. luminescens* bakterileri deneylerden önce NBTA agarda üretilip koloni morfolojisi ve

mikroskopik incelemelerle kontrol edilmiştir. Daha sonra bu koloniler TSB ortamına aktarılıp 24 saat boyunca 28°C’de ve çalkalamalı inkübatörde 100 rpm’de inkübe edilmiştir. Bu başlangıç kültüründen 24 saat sonra yeni bir TSB (50 ml) ortamına 100 µl bakteri süspansiyonu aktarılmıştır. Aynı işlem her 24 saatlik kültür ile 16 gün boyunca tekrarlanmıştır. Bu şekilde 24-384 saatlik bakteri kültür serisi elde edilmiştir. Bu kültürlerden 24 gözenekli hücre kültür kaplarının kuyucuklarına 1’er ml konmuştur. Kuyucuklardaki ortamlara karıncaları çekmek için bakteri kültürlerinin toplam hacminin %5’i olacak şekilde %100 lük Sükroz çözeltisinden 0,05 ml ilave edilmiştir (Zhou vd., 2002). Tesadüfi dağıtılarak hazırlanan deney düzenekleri karınca yuvalarının girişine veya kullandıkları yollara bırakılmıştır. Üç saat sonunda kuyucuklarda kalan sıvı miktarları tartılarak tüketim oranları hesaplanmıştır. Deneyin başlangıcından bir saat sonra kuyucuklarda beslenen karıncalar sayılarak kaydedilmiştir. Kontrol grubu olarak %5’lik sükroz çözeltisi kullanılmıştır. Bununla beraber sıvılardaki buharlaşma oranını da göz önüne almak için deney sahasına başka bir 24 gözenekli hücre kültür kabı içerisinde ve karıncaların ulaşamadığı bir yerde aynı miktarda (1 ml) distile su bırakılmıştır. Deneyler 3 defa tekrarlanmıştır (Zhou vd., 2002).

3.1.3.2. Bakteri kültürlerindeki ADF aktivitesinin yabancarıları (wasp) ile test edilmesi

Yabancarılarının ADF’ye verdiği tepkiler *P. luminescens* ve *E. coli* kültürlerinin süpernatantları kullanılarak test edilmiştir. *P. luminescens*’in 8 günlük kültürü ve kontrol grubu olarak da 24 saatlik *E. coli* kültürü hazırlanmıştır. Bakteri kültürleri 20000xG’de +4°C de 15 dakika santrifüjlenerek süpernatantları elde edilmiştir. *P. luminescens* süpernatantı 2 farklı şekilde denenmiştir. İlk olarak süpernatant hiçbir işlem uygulanmadan doğrudan kullanılmıştır. Yabancarı kolonisine *P. luminescens* ve *E. coli* süpernatantları içerisinde 1 saat bekletilmiş kuzu karaciğeri parçaları verilmiştir. İkinci denemede ise süpernatant önce -80°C’de 24 saat dondurulmuştur. Ardından -52°C’de liyofilize edilmiştir. Toz haline getirilen süpernatant 1/1 oranında sulandırılmış ve içerisine karaciğer ve et parçaları atılarak 1 saat bekletilmiştir. Bir başka kontrol grubu olarak ise sadece su içerisinde bekletilmiş karaciğer ve et parçaları kullanılmıştır. Bu çalışma iki farklı bölgede gerçekleştirilmiştir. Birinci seçilen bölge Aydın iline bağlı Germencik ilçesinin Habibler köyü olup, burada karaciğer parçaları kullanılmıştır. İkinci

seçilen bölge ise Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Kampüs alanı olup, burada ise et parçaları kullanılmıştır. Her iki deneme de alana gelen *Vespa orientalis* ve *Paravespula* sp. türlerine ait yabancılarının beslenme davranışları 3 saat boyunca gözlenmiştir.

3.1.3.3. Bakteri kültürlerindeki ADF aktivitesinin leş sinekleri (Calliphoridae) üzerinde test edilmesi

Aydın iline bağlı Germencik ilçesinin Habipler köyünden elde edilen leş sineği (Diptera: Calliphoridae) yumurtaları ile laboratuvar kolonisi kurulmuştur. Koloniler yaklaşık 200 bireyden oluşan gruplar halinde 30x30x45 cm ebatlarındaki kafeslerde 25°C ve % 20-40 nem değerlerinde tutulmuştur. Yumurtadan çıkan sinek larvaları et parçaları ile beslenmiştir. Erginlere şeker süttozu karışımı ve doğurganlıklarını sağlamak için et parçaları verilmiştir. Çiftleşen dişilerin yumurtlamaları için plastik kaplar içerisinde et parçaları bırakılmıştır (Wolff ve Hansson, 2005).

Bu çalışmada leş sineklerinin erginlerinin ADF maddesine duyarlılıkları yumurtlama davranışları takip edilerek test edilmiştir. Bunun için yabancıları deneylerindeki yöntemle hazırlanmış olan süpernatantların içerisinde bekletilen et parçaları kullanılmıştır. Deneyden 48 saat önce dişilerin yumurtlamaları için önceden bırakılan et parçaları kafeslerden uzaklaştırılmıştır. Böylece dişilerin yumurtlamaya hazır hale gelmeleri sağlanmıştır. Ardından 10 cm'lik petripler içerisinde *P. luminescens* bakterilerinin süpernatantında 1 saat bekletilmiş et parçaları konmuştur. Kontrol grubu olarak ise suda bekletilmiş et parçaları kullanılmıştır. Etler kafeslere bırakıldıktan sonra 24 saat boyunca sineklerin davranışları gözlenmiştir.

3.1.3.4. Yüksek sıcaklığın bakterilerin ürettiği ADF maddesi üzerine etkisinin araştırılması

Yüksek sıcaklığın ADF'ye etkisini gözlemlemek için *P. luminescens* bakterisinin 24-192 saatlik sıvı kültürleri hazırlanmıştır. Hazırlanan kültürlerin her birinden 25'er ml alınıp 121°C de 20 dk otoklavlanmıştır. Her iki gruba (Otoklavlanmış ve otoklavlanmamış) ait bakteri kültürlerinden 24 gözenekli hücre kültür kaplarının kuyucuklarına 1'er ml konmuştur. Kuyucuklardaki kültürlere karıncaları çekmek

için aynı şekilde %100'lük sükröz çözeltisinden 0,05 ml ilave edilmiştir. Böylece deney gruplarıyla kontrol grubunun sükröz oranları eşitlenmiştir. Deney düzenekleri yine aynı *L. frauenfeldi* kolonisinin yuva girişine bırakılmıştır. Karıncaların davranışları 3 saat boyunca gözlenmiştir. Deney sonunda her kuyucukta kalan sıvı miktarları tartılarak hesaplanmıştır.

Aynı çalışma 144 saatlik *P. luminescens* bakteri kültürünün süpernatant ve peleti ile tekrarlanmıştır. Hazırlanan bakteri kültürü 20000xG +4°C'de 15 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi SIGMA 3K 30 model soğutmalı santrifüj cihazı ile yapılmıştır. Elde edilen süpernatantın bir kısmı 121°C'de 20 dk. otoklavlanmıştır. Peletin bir kısmı %0,9'luk NaCl çözeltisi ile yıkanmıştır. Bu sayede bakteri hücrelerinin yüzeyleri temizlenmiştir. Yıkama işleminde pelet önce %0,9'luk NaCl'de çözülmüş ve ardından 20000xG'de +4°C'de 15 dk. santrifüjlenmiştir. Üstteki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra bu işlem 2 defa daha tekrarlanmıştır. Böylece sonuçta 144 saatlik *P. luminescens* süpernatantı, peleti, otoklavlanmış süpernatantı ve yıkanmış peleti olmak üzere 4 farklı deney grubu hazırlanmıştır. Deneyde 2 farklı kontrol grubu kullanılmıştır. Bunlardan birisi %5'lik sükröz çözeltisi, diğeri Nütrient Broth (Merck) besiyerinde üretilmiş 24 saatlik *Escherichia coli* ATCC 25922 kültürünün aynı şekilde santrifüjlenerek elde edilmiş olan süpernatant ve peletidir. Deney sırasında kuyucuklardan beslenen karınca sayıları ve son olarak kuyucuklarda kalan sıvı miktarları kaydedilmiştir. Deneyler 3 saat süresince devam etmiştir.

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Caso Agar (Fluka)

Kazein pepton	15 g/l
Soy peptone	5 g/l
Sodyum klorid	5 g/l
Agar	15 g/l

Hazırlanışı: 40 g toz halindeki besiyeri 1000 ml distile suda çözülmüş ve 121°C'de 15 dk. otoklavlanmıştır.

NBTA Agar (Nutrient agar + bromothymol blue + tetrazolium chloride)

Nütrient agar (Fluka)	28 g/l
Trifeniltetrazolium klorid (Merck)	0,04 g
Bromotimol mavisi (Merck)	0,025 g

Hazırlanışı: Nütrient agar içerisine bromotimol mavisi eklenerek 121°C'de 15 dk. otoklavlanmıştır. Trifeniltetrazolium klorid 2-3 ml distile suda çözülmüştür. Daha sonra 0,2 µm'lik milipor filtreden süzülerek steril hale getirilmiştir. Otoklavlanmış Nutrient agar ve bromothymol blue içerisine eklenmiştir.

Nütrient Agar (Fluka)

Et özütü	1 g/l
Maya özütü	2 g/l
Peptone	5 g/l
Sodyum Klorid	5 g/l
Agar	15 g/l

Hazırlanışı: 28 g toz halindeki besiyeri 1000 ml distile suda çözülmüş ve 121°C'de 15 dk. otoklavlanmıştır.

Nütrient Broth (Merck)

Pepton	5 g/l
Et özütü	3 g/l

Hazırlanışı: 8 g toz halindeki besiyeri 1000 ml distile suda çözülmüştür. 121°C'de 15 dk. otoklavlanmıştır.

Nutrient Lipid Agar (Woust Agar)

Bacto [®] Nutrient Broth (Merck)	16 g/l
---	--------

Bacto® Agar (Fluka) 12 g/l

Mısırözü yağı veya ayçiçeği yağı 5 g/l

Hazırlanışı: Kimyasallar 1000ml distile suda çözülmüş ve 121°C'de 15 dk. otoklavlanmıştır.

Skimmilk (Fluka)

Skimmed milk 20 g

Distile su 100 ml

Hazırlanışı: Distile suda çözüldükten sonra 118°C'de 10 dk otoklavlanarak hazırlanmıştır. İzolatların -20 ve -80°C'de muhafaza edilmesinde kullanılmıştır.

Tryptic Soy Broth (Fluka)

Kazein pepton (Pankreatik) 17 g/l

Soya pepton (Papainle muamele edilmiş) 3 g/l

Sodyum Klorid 5 g/l

Dipotasyum hidrojen fosfat 2,5 g/l

Glukoz 2,5 g/l

Hazırlanışı: 30 g toz halindeki besiyeri 1000 ml distile suda çözülmüş ve 121°C'de 15 dk. otoklavlanmıştır.

Yeast Salts veya YS Broth (YSA)

Yeast extract (Mas Diagnostics) 5 g/l

NaCl (Riedelt-de haën) 5 g/l

NH₄H₂PO₄ 0,5 g/l

K₂HPO₄ 0,5 g/l

MgSO₄*7H₂O (Merck) 0,2g/l

Hazırlanışı: Kimyasallar 1000ml distile suda çözülmüş ve 121°C’de 15 dk. otoklavlanmıştır.

Yüzey sterilizasyon sıvısı

Sodyumhipoklorit (%12)	0,5 ml
4 mol NaOH (160g/1L distile su)	1,5 ml
Distile su	10 ml

Hazırlanışı: Belirtilen değerlerde hazırlanan kimyasallar erlenmayer içerisinde karıştırılmıştır.

3.1.5. İstatistiksel Analizler

Çalışmada kadavra deneylerinin sonuçlarını değerlendirirken hiçbir istatistik analiz yöntemi kullanılmamıştır. Bakteri deneylerinde farklı üreme zamanına sahip (24-384 saatlik) *P. luminecens* kültürleriyle yapılan denemelerde kuyucuklarda kalan sıvı miktarları ve beslenen birey sayıları ile ilgili elde edilen veriler tek yönlü varyans analiz (SPSS, 2004) yöntemi ile değerlendirilmiştir. Yüksek sıcaklığın ADF maddesi üzerine etkisini belirlemek için yapılan denemelerde de sonuçları değerlendirirken tek yönlü varyans analiz yöntemi (SPSS, 2004) kullanılmıştır.

3.2. Entomopatojenik Nematodların Çizgili Pamuk Yaprak Kurdu *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae)'ya Karşı Biyolojik Mücadelede Kullanılmasına Yönelik Araştırmalar

3.2.1. Kullanılan Organizmalar

Spodoptera exigua (Lepidoptera: Noctuidae) larvalarına karşı biyolojik mücadelede *Steinernema carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. weiseri* ve *S. glaseri* olmak üzere toplam 4 *Steinernema* türü ile *Heterorhabditis* cinsine ait iki tür *Heterorhabditis bacteriophora* ve *Heterorhabditis* sp.'nin etkinlikleri test edilmiştir. Kullanılan nematodlardan *S. feltiae* ve *H. bacteriophora* Aydın ilindeki tarım alanlarından elde edilmiştir. Diğer *Steinernema* izolatlarından *S. carpocapsae* Rize ilindeki otluk bir alandan ve *S. weiseri* izolatu ise Ankara Beytepe'deki çam ormanından izole edilmiştir (Ünlü vd., 2007). *Heterorhabditis* sp. ise Muğla ilinin Ortaca ilçesine bağlı Sarıgerme beldesinde *S. exigua*'nın zarar yaptığı çim alanlarda bulunan enfekte *S. exigua* kadavralarından elde edilmiştir.

Deneylerden önce tüm nematod kültürleri *G. mellonella* larvaları kullanılarak yeniden üretilmiştir. Yeni çıkış yapmış infektif juveniller deney gününe kadar 1000 IJ/ml'lik süspansiyonlar halinde 15°C'de saklanmıştır. Bütün çalışma boyunca en fazla 15 günlük ve sağlıklı infektif juveniller kullanılmıştır (Kaya ve Stock 1997).

Denemelerde kullanılan *S. exigua* larvaları Muğla iline bağlı Sarıgerme beldesinde bulunan Joy Pegasos Tropical&Palace Otelin çim alanlarından toplanmıştır. Larvalar gece çimlerin yaprakları ile beslenip gündüz saatlerinde bitki örtüsünün hemen altında saklanmakta olduğundan çim alana bol miktarda su verilip dışarı çıkan larvalar toplanmış, kültür kavanozlarında taze çimen ve yonca yaprakları ile 1-3 gün beslenmiştir.

3.2.2. *Spodoptera exigua* Larvalarına Karşı Nematodların Etkinliğinin Test Edilmesi

Denemeler 60 ml hacimli, yüzey alanı 7 cm² olan kapaklı plastik kaplar içerisinde yapılmıştır. Kapların her birine Joy Pegasos Tropical&Palace Otelin çim alanından getirilen ve steril edilen 3 g kumlu-tınlı toprak (%65 kum, %11 kil, %24 silt)

konmuştur. Topraklar distile su eklenerek %7 oranında nemlendirilmiştir. Kaplardaki her cm²'ye 25 infektif juvenil olacak şekilde nematod süspansiyonları uygulanmıştır. Nematod süspansiyonunun eklenmesiyle en son nem oranı %10'a eşitlenmiştir. Her nematod türü için 20 kap hazırlanmıştır. Kontrol grubu olarak aynı düzenek hazırlanmış ancak kaplara nematod ilave edilmemiştir. Kontrol grubunda da 20 kap kullanılmıştır. Hazırlanan düzenekler oda sıcaklığında (23 ±1°C) inkübe edilmiştir ve deneylerin kontrolleri nematod uygulamasından 48 saat sonra yapılmıştır. Ölen larvalar tek tek White Trap sistemine alınmış ve nematod çıkışları takip edilmiştir. Denemeler 3 defa tekrar edilmiştir.

3.2.3. Çim Alan Denemeleri

Plastik kaplarda yapılan denemelerden elde edilen sonuçlara göre *S. carpocapsae* ve *Heterorhabditis* sp. türleri ile laboratuvarında küçük çaplı bir alan denemesi yapılmıştır. Denemeler için özel bir firmadan hazır çim getirilmiştir. Hazır çimler yaklaşık 5 cm'lik ince bir toprak tabakasının üzerinde 1'er m²'lik parçalar halinde alınmıştır. Kullanılan hazır çimler *Agropyrum repens* (Ayrık otu) türüne aittir. *S. exigua*'nın zarar yaptığı Sarıgerme'de bulunan otelin yeşil alanlarında da aynı çim türü kullanılmıştır. Deneyden önce getirilen çimlerin toprak kısımlarından örnekler alınıp doğal entomopatojenik nematod popülasyonlarının varlığı kontrol edilmiştir. Bunun için alınan toprak örnekleri plastik kavanozlara konulup içlerine 5'er adet *G. mellonella* larvası eklenmiştir. 10 gün boyunca belli aralıklarla yapılan kontroller ile larva ölümlerine bakılmıştır. Ölü larvalar White Trap'lere alınıp nematod çıkışı olup olmadığı takip edilmiştir.

Alan denemeleri için çimler 30x30 cm ebatlarında parçalar halinde kesilmiştir. Her nematod izolatu için 5 parça hazırlanmıştır. Nematod uygulamasından 24 saat önce her bir alana otel bahçesinden getirilen 30 adet 3. dönem *S. exigua* larvası bırakılmıştır. Çimlerin üzeri 20x40x40 cm ebatlarında tel kafeslerle kapatılmıştır. Larvaların kaçmasını engellemek için kafesle zemin arası bantlanmıştır. 24 saat sonra çim parçalarının her birine önce 20 ml distile su püskürtülmüş daha sonra cm²'ye 25 IJ olacak şekilde nematod uygulanmıştır. Nematodlar 100 ml'lik süspansiyonlar halinde küçük el pulverizatörü ile çim alanın her tarafına eşit şekilde verilmiştir. Daha sonra tekrar kafesler kapatılmış ve aynı şekilde bantlanmıştır (Şekil 3.1, 3.2). Uygulama sırasında nematodların etkilenmemesi için laboratuvarın ışıkları kapatılmıştır. Kontrol grubunda ise aynı düzenek

hazırlanmış ancak nematod yerine aynı oranda sadece distile su püskürtülmüştür. Kontrol grubu için yine 5 çim alan kullanılmıştır. Hazırlanan düzenekler oda sıcaklığında (23 ± 1 °C) inkübe edilmiştir. Uygulama yapıldıktan 5 gün sonra çim alandaki larvalar kontrol edilmiştir. Kafes açıldıktan sonra çim alanın tamamı parçalanarak ölü-canlı larvalar ve pupalar toplanıp kaydedilmiştir. Bulunan ölü larvalar ile pupalar tek tek White Trap'lere alınmış, nematod ya da ergin çıkışları takip edilmiştir. Denemeler 3 defa tekrar edilmiştir.



Şekil 3.1. Nematodların çim alanlara uygulanması



Şekil 3.2. Laboratuvarında kurulan çim alan denemeleri

3.2.4. İstatistiksel Analizler

Çalışmada nematodların etkinliğinin *S. exigua* larvalarına karşı test edilmesinde ve çim alan denemelerin de elde edilen yüzde (%) ölüm oranlarına arcsine transformasyonu uygulandıktan sonra Tek Yönlü Varyans analizi ile değerlendirilmiş ve gruplar arasındaki farklılıklar Tukey çoklu testine göre belirlenmiştir (SPSS, 2004).

3.3. Entomopatojenik Nematod Kùltürlerinin Muhafaza Edilmesinde Kullanılan Hücre Kùltür Kaplarına Alternatif Yeni Bir Saklama Kabı

3.3.1. Materyal ve Yöntem

Hücre kùltür kaplarına alternatif olarak meyve suyu kutularının test edilmesi çalışmasında *Heterorhabditis bacteriophora* (izolat 09-48) türü entomopatojenik nematodlar kullanılmıştır. Nematodlar Kaya ve Stock (1997) tarafından tanımlanan yöntem ile büyük mum güvesi *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvaları kullanılarak üretilmişlerdir. Kadavralardan çıkış yapan infektif juveniller (IJ) distile su içerisinde 3 kez yıkanmıştır. Elde edilen infektif juvenillerden 2000 IJ/ml'lik nematod süspansiyonu hazırlanmıştır. Test edilen ticari hücre kùltür kapları NUNC® firması tarafından üretilmiştir. Bu kaplar filtresiz kapaklı ve polistiren malzemeden imal edilmiştir. Çalışmada firmanın 175 cm² yüzey alanına ve 500 ml hacime sahip kapları kullanılmıştır. Deneyden önce kaplar çeşme suyu ile ardından sıcak suyla (70-80°C) birkaç defa çalkalanıp tamamen kurutulduktan sonra kullanılmıştır. Tetra pak malzemeden yapılmış kutular için ise aynı adı taşıyan Tetra pak (İsveç) firmasının ürettiği 7x6.5x23 cm ebatlarındaki Tetra Prisma Aseptic modeli kullanılmıştır. Kutuların yüzey alanı 161cm², hacmi ise 1000 ml'dir. Test edilen Tetra pak kutular marketten %100 doğal meyve suyu (elma, portakal) ile doluyken satın alınmıştır. Kutular içlerindeki meyve suyu kalıntılarını uzaklaştırmak için önce çeşme suyu ve ardından sıcak su (70-80°C) ile birkaç defa çalkalanarak yıkanmıştır. Yıkama sırasında hiçbir kimyasal deterjan kullanılmamıştır. Kutular içleri tamamen kuruyana kadar kapakları açık vaziyette oda sıcaklığında birkaç gün bekletilmiştir. Deneyde kullanılan kutular arasındaki hacim farklılığı göz önüne alınarak, hücre kùltür kaplarına 100 ml, Tetra pak kutulara ise 200 ml nematod süspansiyonu konmuştur. Süspansiyonları eklenen kutular iki farklı sıcaklık derecesinde (10°C ve 15°C) muhafaza edilmiştir.

Kutulardaki infektif juvenil evre nematodların canlılık ve öldürdükleri larva oranları ile her bir kadavra içine giren nematod sayıları 11 ay boyunca düzenli olarak takip edilmiştir. Bu amaçla her ay kutulardan 0,5'er ml nematod süspansiyonu alınmıştır. Bu süspansiyonlardan mikroskop altında rastgele bir seçimle 100 adet infektif juvenil doğrudan sayılmıştır. Sayım sonunda ölü ve canlı

sayıları kaydedilmiştir. Ölü olduğu düşünülen hareketsiz bireyler ince uçlu bir cisim yardımıyla dokunularak kontrol edilmiştir (Kaya ve Stock, 1997).

Farklı kaplar içerisinde tutulan nematodların infektivitelerini test etmek için 24 gözenekli hücre kültür kaplarının (Corning, Corning, NY, USA) kuyucuklarına 0,5g steril kum ve ardından her kuyucuğa 60 µl distile su içerisinde 50 IJ eklenmiştir (Güngör vd., 2006). Nematodlar Kaya ve Stock (1997) yöntemine göre mikroskop altında mikroenjektör (Drummond 10 µl) kullanılarak tek tek sayılıp alınmıştır. Daha sonra her kuyucuğa 1 adet son dönem *G. mellonella* larvası bırakılmıştır. Her grup için 10 adet kuyucuk kullanılmıştır. Nem kaybını önlemek için plastik poşetler içerisine alınan kaplar 72 saat oda sıcaklığında (23-24°C) bekletilmiştir. Yapılan kontroller sonucu ölü larvaların her biri petri ler içerisine alınıp pepsin solusyonu içerisinde parçalanmıştır (Mauleon vd., 1993). 10 cm'lik petri kapları içerisinde parçalanmış larva dokuları çalkalamalı inkübatörde 55 rpm ve 37°C'de 2,5-3 saat inkübe edilmiştir. Böylece böcek dokusu sindirilerek, içerisindeki nematodlar daha kolay görülebilir hale gelmiştir. Mikroskop altında (40x büyütmede) doğrudan sayım yöntemiyle içeri giren nematod sayıları belirlenmiştir. Bu işlem her deney grubu için ayda bir kez tekrarlanmıştır.

3.3.2. İstatistiksel analizler

Çalışmada iki farklı yapıdaki saklama kabını kıyaslamak için 2 ayrı sıcaklık derecesinde 3 farklı veri toplanmıştır. Bunlar sırasıyla infektif juvenillerin canlı-ölü oranları, ölen larva sayıları ve larva içerisine giren nematod miktarlarıdır. İnfektif juvenillerin canlılık oranları ve enfekte olan larva sayılarıyla ilgili veriler yüzde (%) olarak hesaplanmıştır. Yüzde (%) oranları içeren bütün veriler analiz edilmeden önce arcsine transformasyonu uygulanmıştır. İnfektif juvenillerin ölü-canlı oranları, ölen larva sayıları ve içeri giren nematod sayıları ile ilgili sonuçlar kutular, sıcaklıklar ve aylar bazında Genel Doğrusal Model (GLM) analizi ile değerlendirilmiştir ve gruplar arasındaki farklılıklar Tukey çoklu testine göre belirlenmiştir (SPSS, 2004). Aylık kontrollerde ise her 3 veri grubu için (infektif juvenillerin canlı-ölü oranları, ölen larva sayıları ve larva içerisine giren nematod miktarı) Tek Yönlü Varyans analizi ile değerlendirilmiş ve gruplar arasındaki farklılıklar Tukey çoklu testine göre belirlenmiştir (SPSS, 2004).

4. BULGULAR

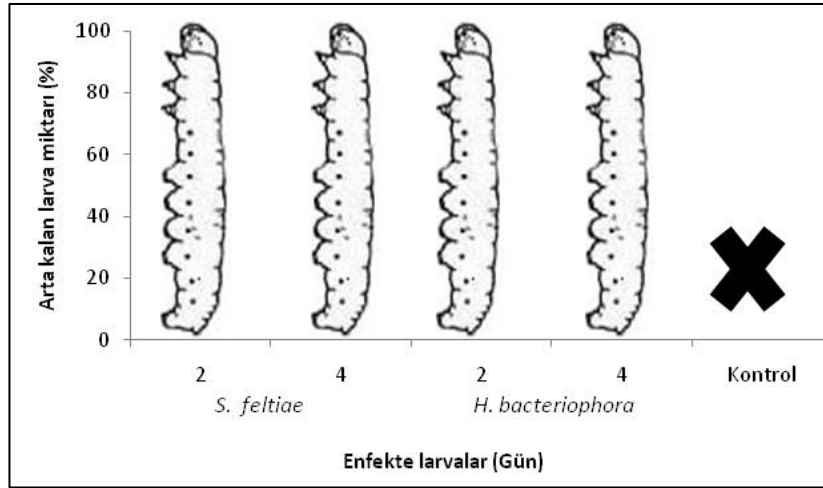
4.1. ADF (Ant Deterrent Factor-Karıncı Uzaklaştırıcı Faktör) Maddesinin Farklı Gruplardan Yağmacı Böceklerle Karşı Etkisinin Tespiti ve Maddenin Yapısını Aydınlatmaya Yönelik Çalışmalar

4.1.1. Kadavra Deneyleri

4.1.1.1. Karıncalar ile yapılan deneyler

Birçok farklı karınca türünün entomopatojenik nematodlarla enfekte edilmiş kadvralara olan duyarlılıkları test edilmiştir. Ancak bazı karınca türleri beslenme davranışlarından ötürü ölü böcek dokularıyla hiç ilgilenmemişlerdir. Çünkü birçok karınca türünün sadece bitkisel kökenli maddelerle beslendikleri bilinmektedir (Schultz, 2000). Yapılan ön denemeler sonucu Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Kampüs alanı ve Serçeköy'de bulunan *Lepisiota frauenfeldi* türüne ait kolonilerin ADF maddesine duyarlı oldukları belirlenmiştir.

Deneylerde işçi karıncalar *Heterorhabditis bacteriophora* ve *Steinernema feltiae* ile 2 ve 4 günlük enfekte *Galleria mellonella* larvalarının hiçbirisiyle beslenmemiştir. Bununla beraber bazı denemelerde yuva girişine bırakılan nematodla enfekte kadvralar, karıncalar tarafından deney sahasından uzaklaştırılmış veya üzerleri taş, kum ve ot parçacıklarıyla kapatılmıştır. Mikroskop altında yapılan incelemeler sonucunda bazı karıncaların sadece *S. feltiae* ile 2 günlük enfekte kadvraları ısırıldıkları ancak bunları yemedikleri gözlenmiştir. *H. bacteriophora* ile enfekte 2 ve 4 günlük, *S. feltiae* ile enfekte 4 günlük kadvraların hiçbirinde ısırık izine rastlanmamıştır. Kontrol grubunda yeralan kadvraların ise ortalama olarak yaklaşık %95'lik kısmı tüketilmiştir (Şekil 4.1). Kontrol grubu kadvralar tüketildikten sonra karıncalar deney sahasını terk etmiştir.



Şekil 4.1. Enfekte *Galleria mellonella* larvalarının karıncalar tarafından tüketilme miktarları (%) (X= Tamamen tüketilmiş)

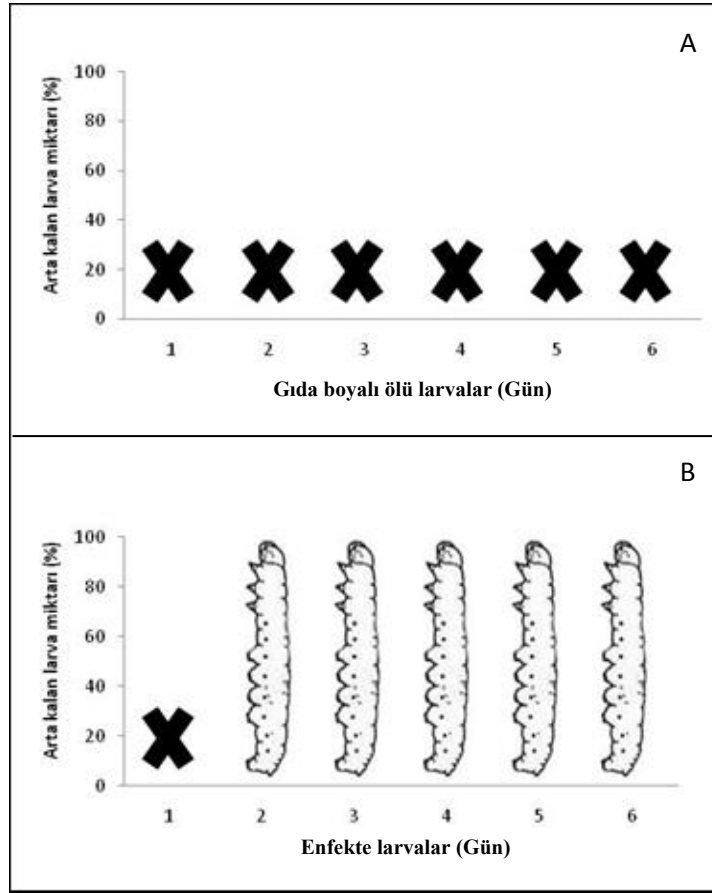
Gıda boyası ile boyanan kadvralar ile yapılan çalışmada ise karıncalar buzlukta dondurularak öldürölüp daha sonra gıda boyası ile kırmızıya boyanmış kadvralar ve 24 saatlik nematodlu kadvraları tamamen tüketmiştir. Ancak 48-144 saat arasındaki nematodlu kadvralardan herhangi birisiyle hiç beslenmemişlerdir (Şekil 4.2, 4.3, 4.4).



Şekil 4.2. Gıda boyası ile boyanan ve *Heterorhabditis bacteriophora* ile enfekte edilen kadavraların karşılaştırılması deneyinin 15.dakika görüntüsü



Şekil 4.3. Gıda boyası ile boyanan ve *Heterorhabditis bacteriophora* ile enfekte edilen kadavraların karşılaştırılması deneyinin 1 saat sonraki görüntüsü



Şekil 4.4. Gıda boyalı ve *Heterorhabditis bacteriophora* ile enfekte kadavraların karıncalar tarafından tüketilme miktarları. A- Gıda boyalı kadavralar B- *Heterorhabditis bacteriophora* ile enfekte kadavralar (X=Tamamen tüketilmiş)

4.1.1.2. Çekirge deneyleri

4.1.1.2.1. Monoksenik entomopatojenik nematod kültürü ile enfekte kadavra deneyleri

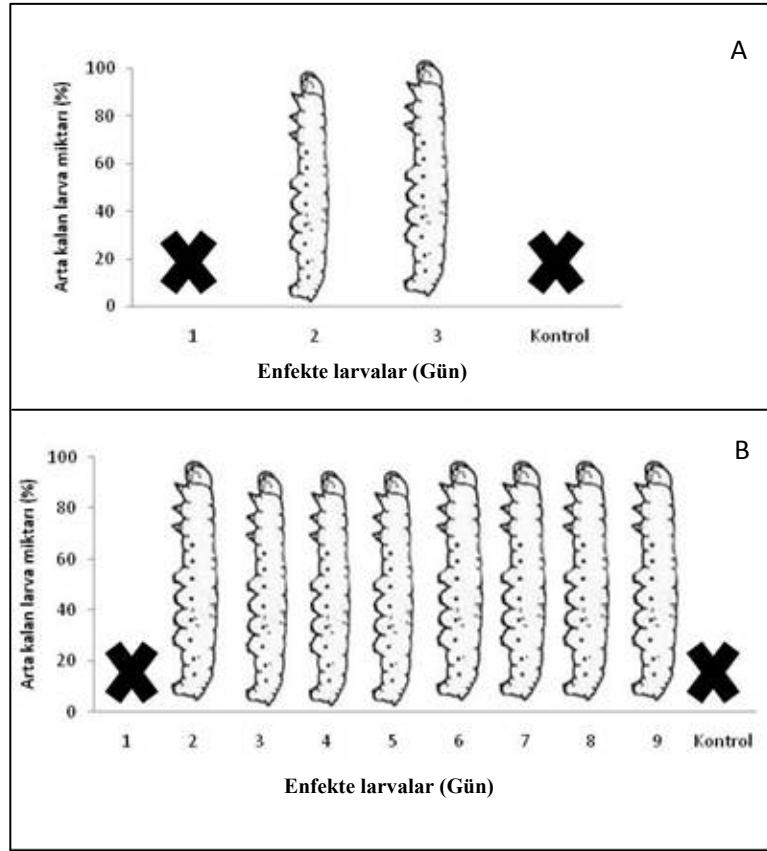
Deneylerde *G. bimaculatus* ergin ve nimfleri, kontrol grubundaki dondurulmuş larvaları ve 1 günlük nematodla enfekte kadavraları besin olarak kullanıp tamamen tüketmişlerdir. Karınca deneylerinde olduğu gibi çekirgeler bütün kadavraları inceledikten sonra besin olarak sadece kontrol grubundaki ve 1 günlük enfekte kadavraları yemeyi tercih etmiştir (Şekil 4.5, 4.6, 4.7). Kadavraların 10 gün süreyle insektaryumda aç tutulması sürecinde *G. bimaculatus* kolonisinde kannibalizm başlamasına rağmen çekirgeler sadece kontrol grubundaki ve 1 günlük enfekte kadavrayı tüketmişlerdir.



Şekil 4.5. Monoksenik *Heterorhabditis bacteriophora* ve *Steinernema feltiae* ile enfekte kadavraların insektaryuma yerleştirildiği andaki görüntüsü



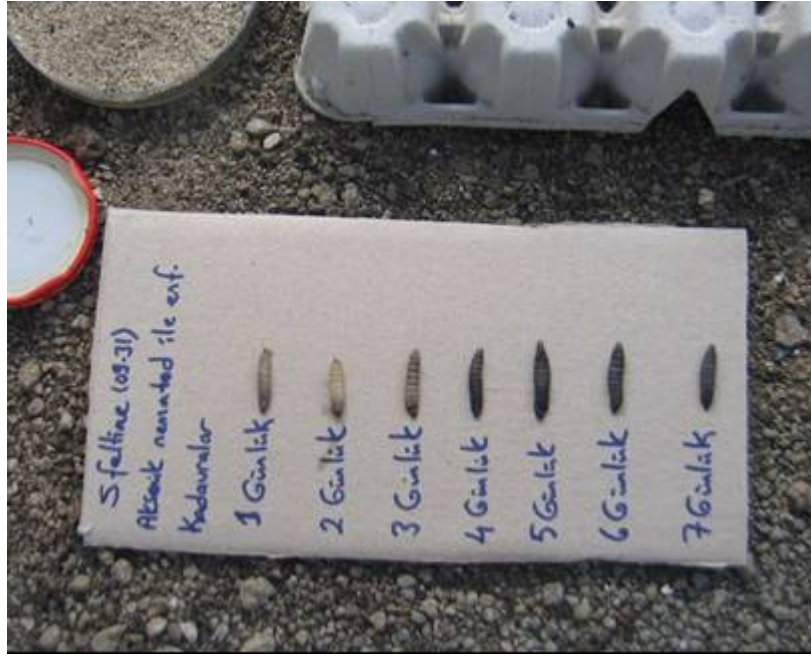
Şekil 4.6. Monoksenik *Heterorhabditis bacteriophora* ve *Steinernema feltiae* ile enfekte kadavruların 48 saat sonraki durumu



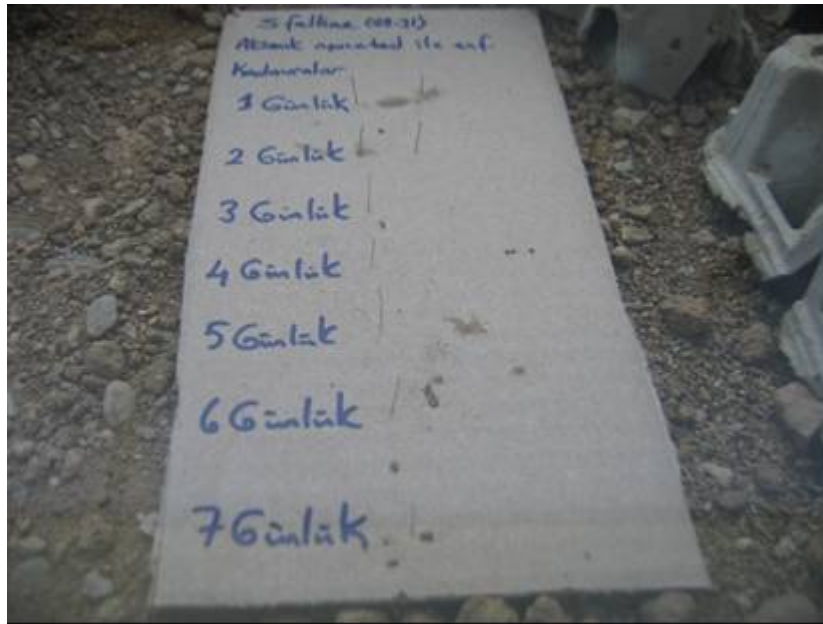
Şekil 4.7. *Gryllus bimaculatus*'lar tarafından monoksenik entomopatojenik nematod kültürü ile enfekte larvaların tüketilme miktarları (%). A- *Steinernema feltiae* ile enfekte larvalar, B- *Heterorhabditis bacteriophora* ile enfekte larvalar (X=Tamamen tüketilmiş)

4.1.1.2.2. Aksenik entomopatojenik nematod kültürü ile enfekte kadavra deneyleri

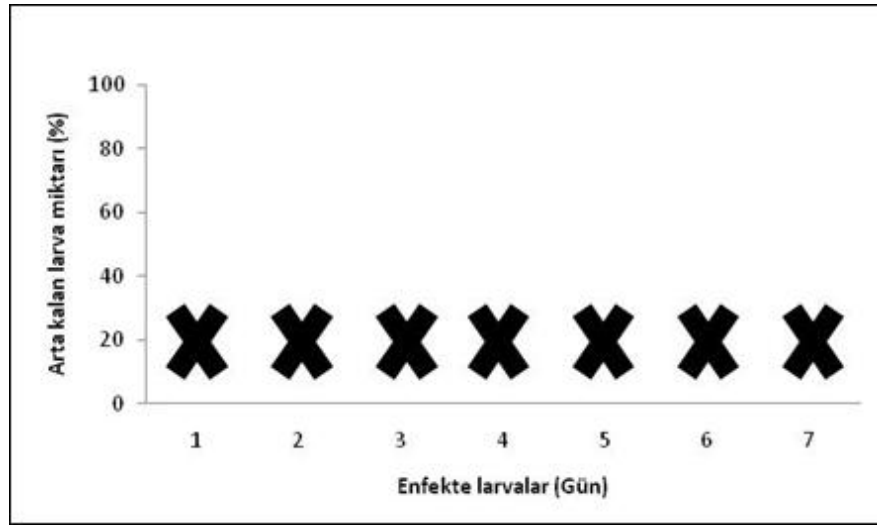
Aksenik nematod kültürleri kullanılarak hazırlanan 1-7 günlük kadvraların tamamı çekirgeler tarafından tüketilmiştir (Şekil 4.8, 4.9, 4.10).



Şekil 4.8. Aksenik nematodla enfekte kadavraların deney alanına yerleştirildiği andaki görüntüsü



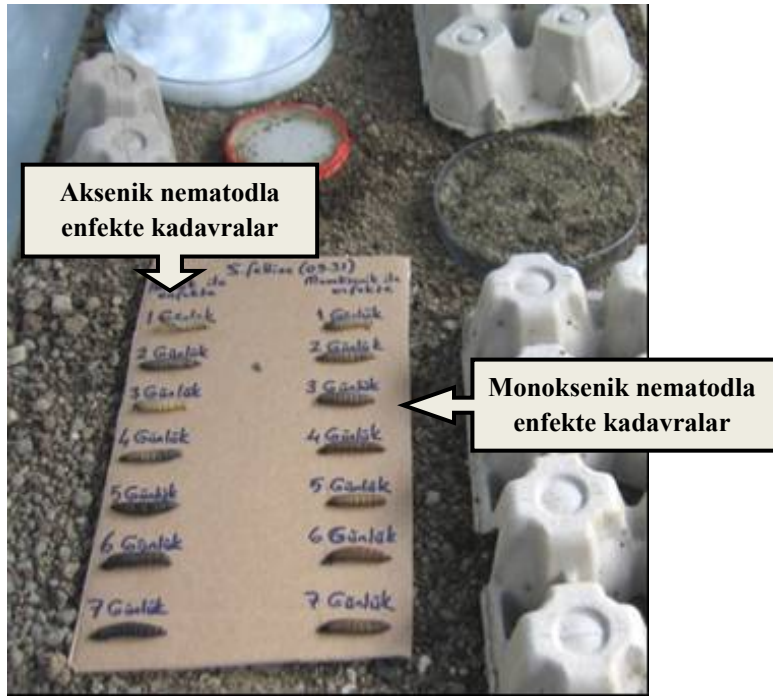
Şekil 4.9. Aksenik nematodla enfekte kadavraların deney sonundaki görüntüsü



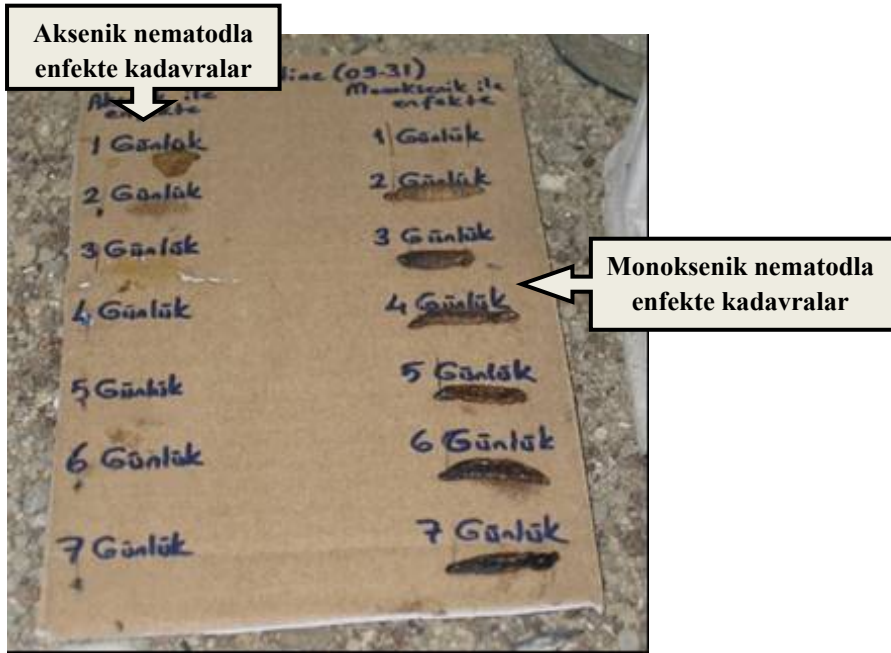
Şekil 4.10. Aksenik entomopatojenik nematod kültürü ile enfekte kadavraların tüketilme miktarları (%) (X= Tamamen tüketilmiş)

4.1.1.2.3. Monoksenik ve aksenik entomopatojenik nematodlarla enfekte kadavraların karşılaştırılması

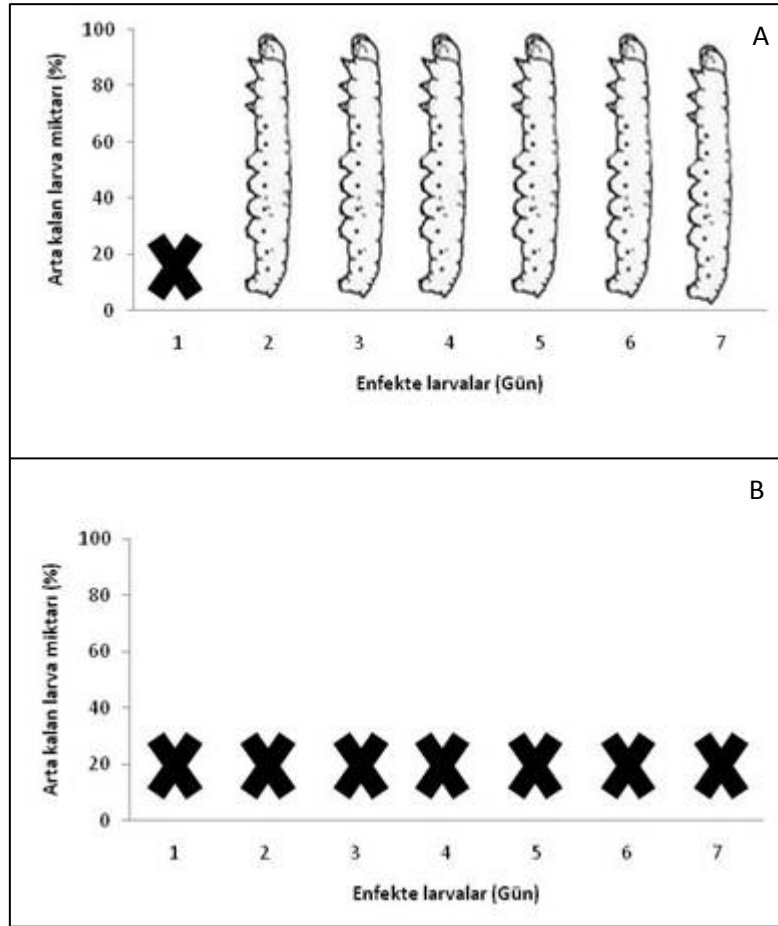
Aksenik ve monoksenik nematod kültürleri kullanılarak enfekte edilen larvaların bir arada test edildiği çalışmada, çekirgeler aksenik nematodlarla enfekte kadavraların hepsini tüketmişlerdir. Ancak monoksenik nematodlarla enfekte edilmiş kadavralardan yalnızca 1 günlük olanını yemişlerdir (Şekil 4.11, 4.12, 4.13).



Şekil 4.11. *Steinernema feltiae*'nin monoksenik ve aksenik kültürleri ile enfekte kavruların deney alanına yerleştirildiği andaki görüntüsü



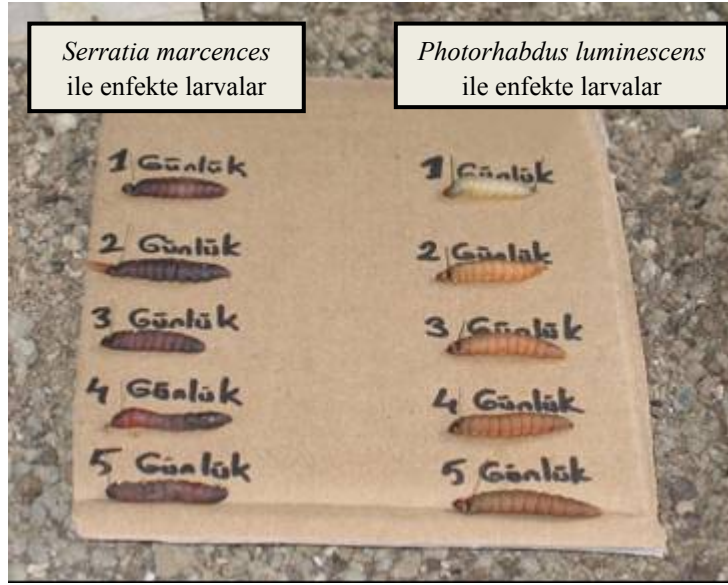
Şekil 4.12. *Steinernema feltiae*'nin monoksenik ve aksenik kültürleri ile enfekte olan kavruların *Gryllus bimaculatus* kolonisinin bulunduğu insektaryumda 48 saat sonraki durumu



Şekil 4.13. *Steinernema feltiae*'nin monoksenik (A) ve aksenik (B) kültürleri ile enfekte kadavraların *Gryllus bimaculatus*'lar tarafından tüketilme miktarları (%) (X= Tamamen tüketilmiş)

4.1.1.2.4. Entomopatojenik bakteri *Serratia marcescens* ile enfekte larva deneyleri

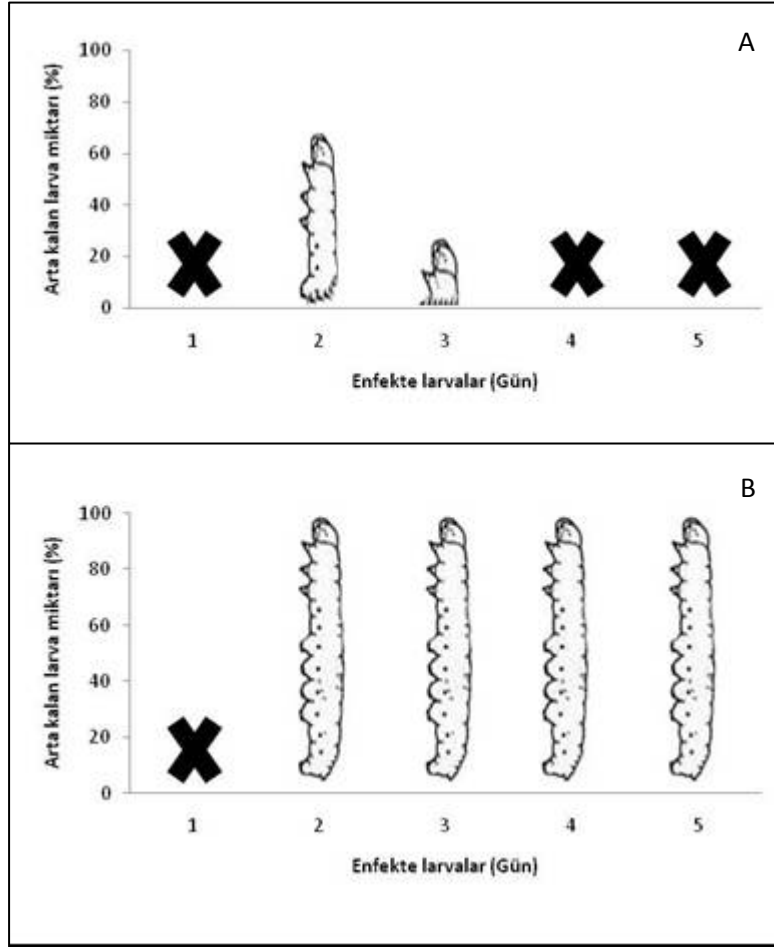
Deneylerde çekirgeler *S. marcescens* ile enfekte kadavralardan 1, 4, 5 günlük olanların tamamını tüketirken, 2 günlük kadavranın %20 kadarlık bir bölümünü ve 3 günlük enfekte kadavranın ise %50'den fazlasını bitirmişlerdir. *P. luminescens* ile enfekte edilmiş kadavralardan ise sadece 24 saatlik enfekte olanları tüketmişlerdir (Şekil 4.14, 4.15, 4.16).



Şekil 4.14. *Serratia marcescens* ve *Photorhabdus luminescens* ile enfekte larvaların deney alanına yerleştirildiği andaki görüntüsü



Şekil 4.15. *Serratia marcescens* ve *Photorhabdus luminescens* ile enfekte larvaların 48 saat sonra *Gryllus bimaculatus* insektaryumundaki durumu



Şekil 4.16. *Serratia marcescens* ve *Photorhabdus luminescens* ile enfekte larvaların tüketilme miktarları (%). A- *Serratia marcescens* ile enfekte larvalar, B- *Photorhabdus luminescens* ile enfekte larvalar (X= Tamamen tüketilmiş)

4.1.1.2.5. Çürümekte olan larva deneyleri

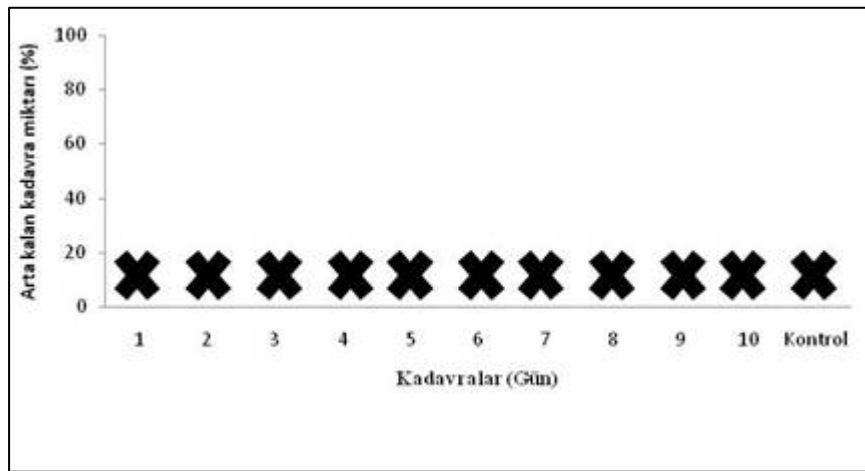
Deneylede *G. bimaculatus* ergin ve nimfleri çürüyüp kokuşmuş kadvraların hepsini tüketmişlerdir (Şekil 4.17, 4.18, 4.19).



Şekil 4.17. Çürümekte olan larvaların deney alanına yerleştirildiği andaki görüntüsü



Şekil 4.18. Çürümekte olan larva deneyinde 48 saat sonraki durum



Şekil 4.19. Çürümekte olan larvaların tüketilme miktarları (%) (X= Tamamen tüketilmiş)

4.1.1.3. Yabanarıları (wasp) ile yapılan deneyler

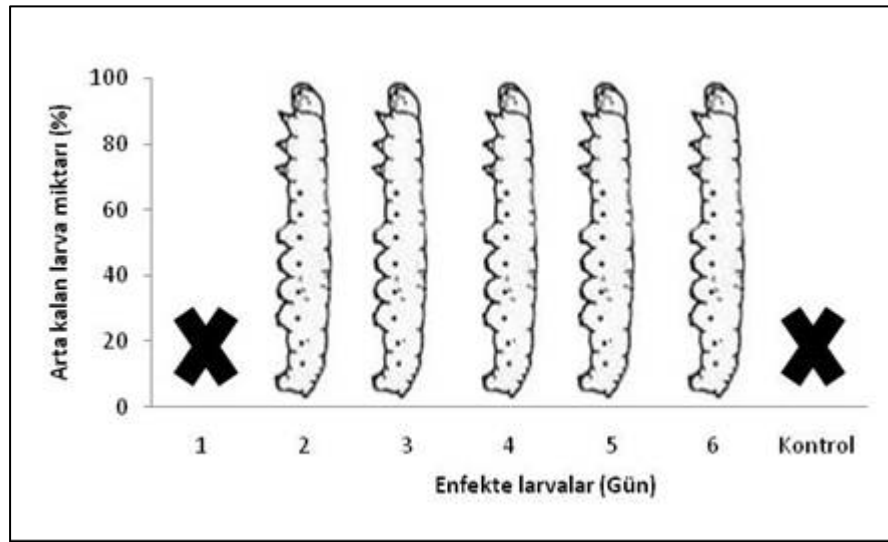
Aydın ilinin Germencik ilçesine bağlı Habipler köyünde yapılan enfekte kadavra deneylerinde yabanarıları karınca ve çekirgelerde olduğu gibi ilk olarak bütün kadvraları kontrol etmişler, daha sonra sadece kontrol grubunda yer alan larva ile 1 günlük enfekte larvaları parçalayıp yuvalarına götürmüşlerdir. Deney sırasında kontrol grubunun kadvraları bittikçe yenisi karton zemin üzerinde farklı bir yere yerleştirilmiştir. Ancak her seferinde wasplar kontrol grubu kadvraları kolaylıkla bulmuş ve yuvalarına taşımışlardır (Şekil 4.20, 4.21, 4.22).



Şekil 4.20. Yabanarıları ile yapılan enfekte kadavra deneyi



Şekil 4.21. Deney sonunda kadavraların durumu

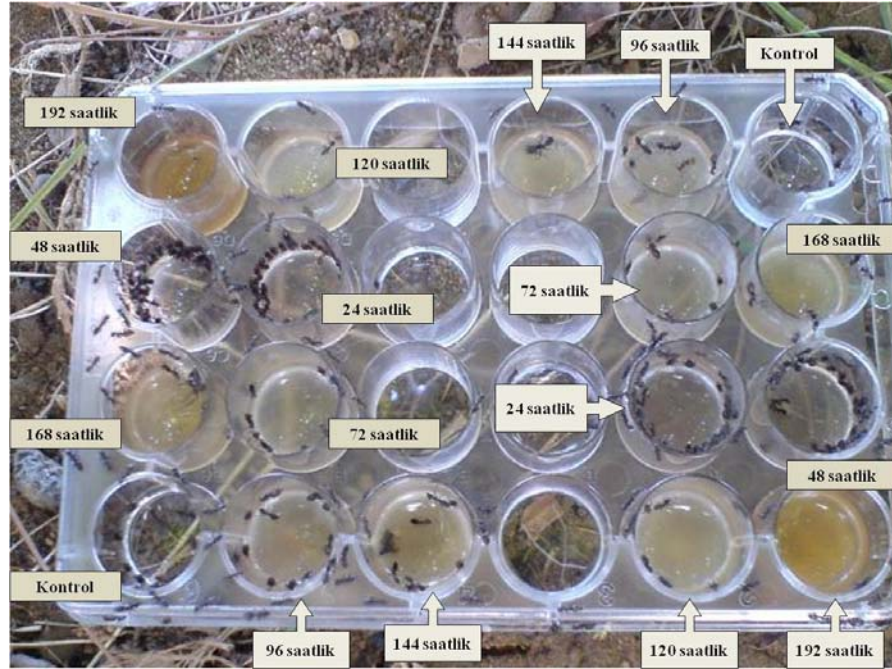


Şekil 4.22. Enfekte larvaların yabancarıları tarafından tüketilme miktarları (%) (X= Tamamen tüketilmiş)

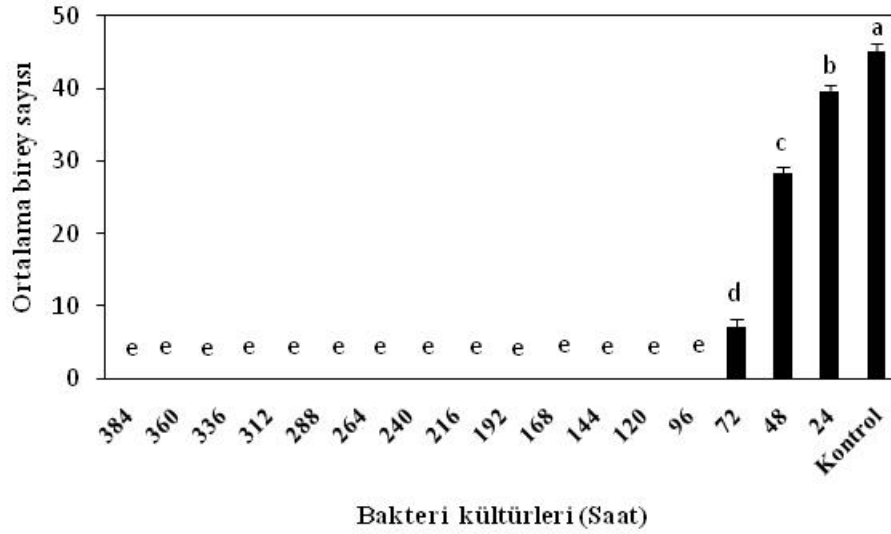
4.1.2. Bakteri Deneyleri

4.1.2.1. Bakteri kültürlerindeki ADF aktivitesinin karıncalar üzerinde test edilmesi

Çalışmalar kadavra deneylerinde olduğu gibi yine *L. frauenfeldi* kolonisiyle gerçekleştirilmiştir. Bir saat sonunda 24 gözenekli doku kültür kabının kuyucuklarında beslenen birey sayıları kaydedilmiştir. Karıncaların genel olarak kontrol grubu, 24, 48 ve 72 saatlik kültürlerin olduğu kuyucuklarda kalıp beslendikleri, diğer kuyucukları ise kontrol ettikten sonra hemen terk ettikleri görülmüştür (Şekil 4.23). Yapılan sayım sonuçlarına göre en fazla karıncanın kontrol grubuna, daha sonra sırasıyla 24, 48 ve 72 saatlik bakteri kültürlerine geldikleri belirlenmiştir. İstatistiki analiz sonuçlarına göre tüm gruplar arasında önemli fark olduğu belirlenmiştir ($F=906.72$; $df=16,34$; $P<0,001$) (Şekil 4.24).



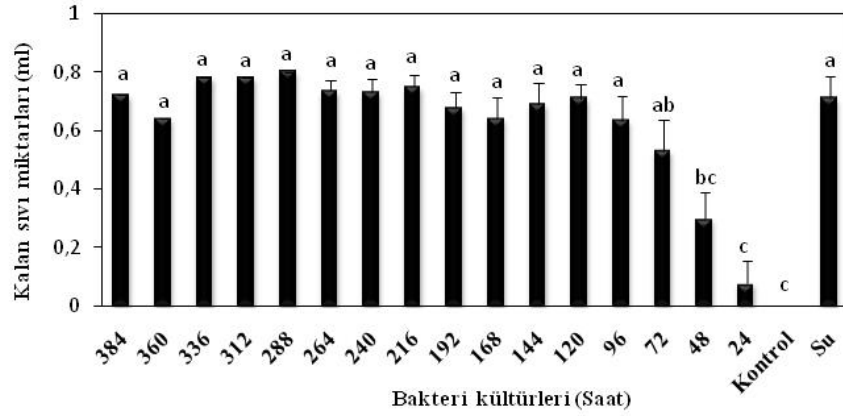
Şekil 4.23. Farklı sürelerde üretilmiş bakteri kültürlerinin bulunduğu kuyucuklara gelen karıncalar



Şekil 4.24. Bir saat sonunda 24-384 saatlik *Photorhabdus luminecens* kültürlerinin olduğu kuyucuklardan beslenen ortalama birey sayıları

Deneylerin yürütüldüğü 3 saat sonunda kuyucuklarda kalan madde miktarları ölçüldüğünde karıncaların kontrol grubunda yer alan %5'lik sükröz çözeltisini tamamen tükettikleri gözlenmiştir. Diğer kuyucuklardan ise 24 saatlik bakteri kültürünün %93'lük kısmını, 48 saatlik olan kuyucukların ise %71'lik bölümünü tükettikleri belirlenmiştir. Beslenme amacıyla karıncaların uzun süre kaldıkları son kuyucuk olan 72 saatlik kültürlerin ise ancak %47'si karıncalar tarafından tüketilmiştir. Doksanaltı ile 384 saat arasında yer alan kültürlerin bulunduğu kuyucuklarda ise tüketim oranları %36 ile %20 arasında değişmiştir. Hava sıcaklığına bağlı olarak buharlaşma sonucu kuyucuklardaki azalan sıvı miktarını belirlemek amacıyla kullanılan su dolu kuyucuklar içerisinde meydana gelen buharlaşan sıvı miktar ise %29 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.25). Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre içerisinde su bulunan kuyucuk ve 72 ile 384 saat arasındaki bakteri kültürlerinin bulunduğu kuyucuklarda meydana gelen tüketim oranları arasında herhangi bir istatistiki fark tespit edilememiştir ($P>0,05$). 24 ve 48 saatlik bakteri kültürleri ile içerisinde %5'lik sükröz bulunan kuyucuklardaki tüketim oranları arasında da önemli fark bulunmamıştır ($P>0,05$). Ancak su, 72-384 saatlik kültürlerin bulunduğu birinci grup ile %5'lik sükröz, 24 ve 48 saatlik kültürlerin bulunduğu ikinci grup arasında istatistiki açıdan önemli fark olduğu belirlenmiştir ($F=17,13$; $df=17,36$; $P<0,001$). Bazı denemelerde

karıncalar kenar kısımlarda bulunan ve 72 saatten daha uzun inkübe edilmiş bakteri kültürlerinin olduğu kuyucukların içerisini ot ve kum parçacıklarıyla doldurmuşlardır.



Şekil 4.25. 24-384 saatlik *Photorhabdus luminecens* kültürlerinin bulunduğu kuyucuklarda kalan madde miktarları (ml)

4.1.2.2. Bakteri kültürlerindeki ADF aktivitesinin yabancarıları (wasp) ile test edilmesi

Habipler köyünde gerçekleştirilen çalışmada bakteri süpernatantları ve suda bekletilmiş ciğer parçalarının bulunduğu deney ortamına iki farklı yabancı türü gelmiştir. Bunlardan birisinin *Vespa orientalis* diğeri ise *Paravespula* sp. türüne ait oldukları belirlenmiştir. Gelen yabancıları bütün ciğer gruplarını kontrol ettikten sonra *Photorhabdus* süpernatantlı ciğer parçalarına hiç ilgi göstermemiştir. Ancak hazırlanan *E. coli* süpernatantı ve suda bekletilmiş ciğer parçalarını seçip bunlarla beslenmişlerdir (Şekil 4.26). Bu beslenme işlemini ciğerlerden küçük parçalar koparıp yuvalarına taşımak suretiyle yapmışlardır.



Şekil 4.26. *Photorhabdus luminescens* ve *Escherichia coli* süpernatantları ile suda bekletilmiş ciğer parçalarına yabancılarının gösterdiği tepki

Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Kampüs alanındaki denemelerde de Habipler köyündekilere benzer sonuçlar elde edilmiştir. Alana gelen 2 farklı wasp türü *Vespa orientalis* ve *Paravespula* sp., *E.coli* supernatantı ve su ile yıkanmış kontrol grubundaki etlerin hepsini parçalar halinde koparıp taşımak suretiyle tüketmişlerdir. *P.luminescens* süpernatantı ile yıkanmış olan et parçalarını ise *E. coli* supernatantlı ve kontrol grubundaki parçalar bitene kadar hiç tercih etmemişlerdir. Ancak diğerleri tükendikten sonra geldikleri *P. luminescens* supernatantlı et parçalarının sadece iç kısımlarını kopararak taşımışlardır (Şekil 4.27).

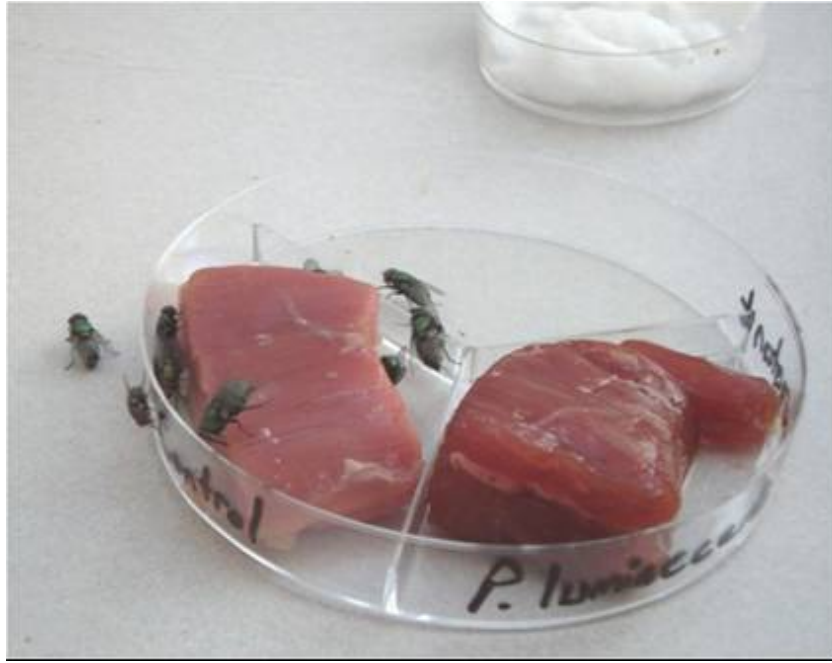
Deneylerde kullanılan *P. luminescens*'in hem doğrudan hem de liyofilize edildikten sonra kullanılan supernatantları aynı sonuçları vermiştir.



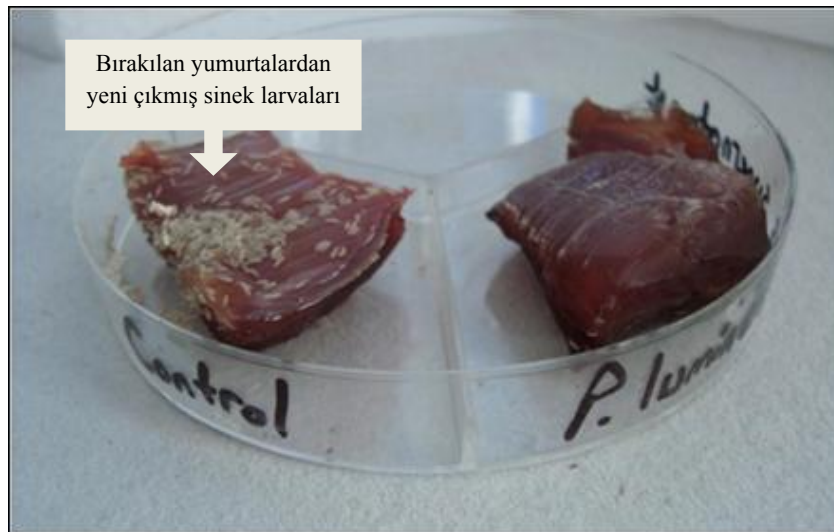
Şekil 4.27. Yabanarıları *Vespa orientalis* ve *Paravespula* sp.'nin *Photobacterium luminescens*, *Escherichia coli* süpernatantları ve suda bekletilmiş et parçacıkları üzerindeki beslenme davranışları

4.1.2.3. Bakteri kültürlerindeki ADF aktivitesinin leş sinekleri ile test edilmesi

Deneylerde leş sineği (Diptera: Calliphoridae) dişileri öncelikle hem *P. luminescens* süpernatantı ile muamele edilmiş hem de kontrol grubundaki et parçalarını ziyaret ettikten sonra yumurtalarını sadece kontrol grubundaki etlerin üzerine bırakmışlardır (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. *Photorhabdus luminescens* ve suyla muamele edilmiş et parçacıkları üzerine leş sineklerinin yumurta bırakma davranışları



Şekil 4.29. Leş sinekleri tarafından ziyaret edilen et parçacıklarındaki sinek yumurtaları ve larvaları

4.1.2.4. Yüksek sıcaklığın bakterilerin ürettiği ADF maddesi üzerine etkisinin araştırılması

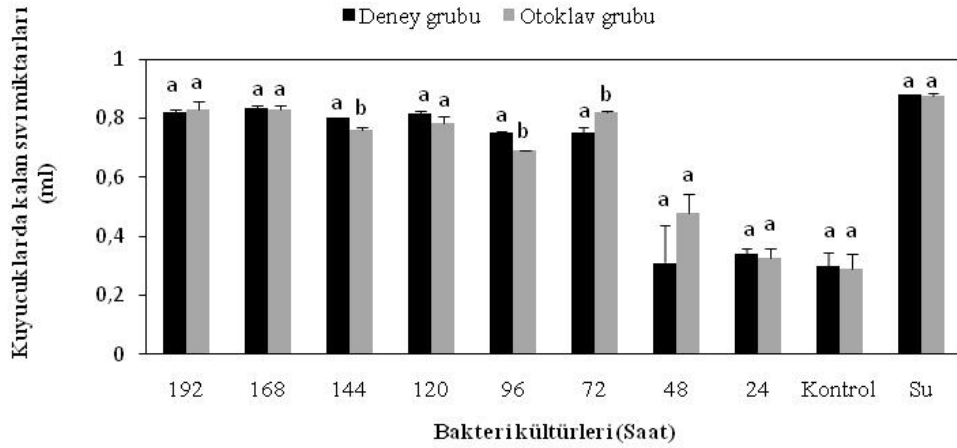
Otoklavlanmış bakteri kültürlerinin bulunduğu 24 gözenekli kabın üzerine tırmanan *L. frauenfeldi* işçileri bütün deney gruplarını dolaştıktan sonra beslenmek için sadece kontrol grubu (%5'lik sükröz) ile 24 ve 48 saatlik deney gruplarını besin olarak kullanmışlardır (Şekil 4.30). Geriye kalan 72-192 saat arasındaki kültürlerin bulunduğu kuyucuklar ise karıncalar tarafından tercih edilmemiştir. Bu kuyucuklarda geriye kalan madde miktarlarının %70 ile %83 arasında olduğu belirlenmiştir. İçerisinde %5'lik şeker bulunan kontrol kuyucuklarında kalan madde miktarı %29, 24 saatlik kültürde %33 ve 48 saatlik kültürde ise %48 olarak ölçülmüştür. Buharlaşma miktarını ölçmek için kullanılan içi su dolu kuyucuktaki sıvı kaybı ise % 22 olarak kaydedilmiştir.

Tüm veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, 72, 96, 144 saatlik bakteri kültürlerinin deney ve otoklav grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur ($P < 0.05$; Şekil 4.30; Çizelge 4.1). Kontrol, 24, 48, 96, 120, 168 ve 192 saatlik deney ve otoklav grupları arasındaki fark ise istatistiksel olarak önemli değildir ($P > 0.05$). Tüm bakteri kültürleri bir arada değerlendirildiğinde deney ve otoklav grupları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($F = 0.101$; $df = 1,58$; $P > 0.05$; Şekil 4.30; Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Otoklavlanmış ve normal 24-192 saatlik *Photorhabdus luminescens* kültürlerinin deney sonunda kuyucuklarda kalan miktarları (ml)

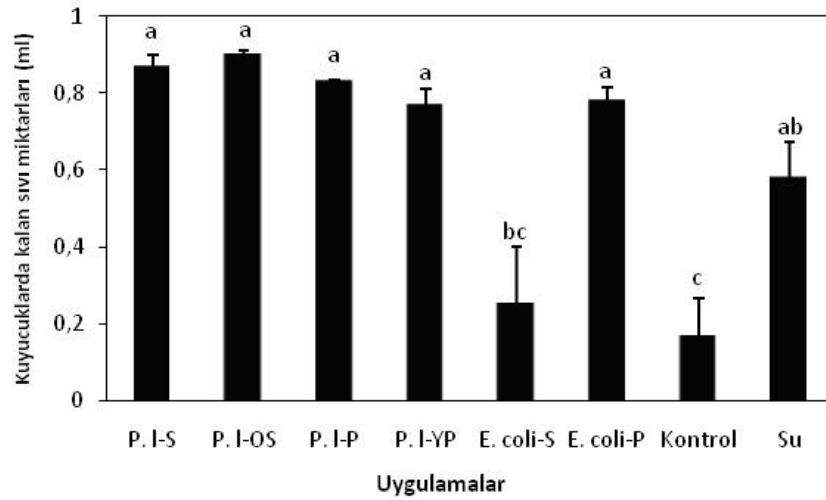
Bakteri kültürleri (s)	Deney grubu	Otoklav grubu	Serbestlik derecesi (df)	F	Anlamlılık düzeyi (P)
192	0,82 a*	0,83 a	1,4	0.103	0.764
168	0,84 a	0,83 a	1,4	0.211	0.670
144	0,80 a	0,76 b	1,4	12.000	0.026
120	0,82 a	0,79 a	1,4	1.941	0.246
96	0,75 a	0,69 b	1,4	108.000	0.000
72	0,75 a	0,82 b	1,4	14.700	0.019
48	0,31 a	0,48 a	1,4	1.433	0.297
24	0,34 a	0,33 a	1,4	0.136	0.731
Sükroz (%5)	0,30 a	0,29 a	1,4	0.876	0.402
Su	0,88 a	0,88 a	1,4	0.143	0.725

*Satırlar soldan sağa doğru incelendiğinde, aynı harfi içeren ortalamalar arasında istatistiksel olarak önemli fark yoktur $P>0,05$ (Tukey testi).



Şekil 4.30. Otoklavlanmış 24-192 saatlik *Photorhabdus luminescens* kültürlerinin deney sonunda kuyucuklarda kalan miktarları (ml)

144 saatlik kültürün süpernatant ve pelet denemelerinde ise karıncalar sadece %5'lik sükröz ve *E. coli* süpernatantı bulunan kuyucuklardan beslenmişlerdir. *E. coli* peleti ve içerisinde *P. luminescens* bulunan hiçbir kuyucukla ilgilenmemişlerdir. Yapılan analizler *P. luminescens*'in 4 farklı kombinasyonu ile *E. coli* peletinin bulunduğu ilk grupta tüketilen madde miktarları açısından istatistiki bir fark olmadığını göstermiştir. Ancak bu grup ile %5'lik şeker ve *E.coli* süpernatantı bulunan kuyucuklardaki kalan madde miktarları arasında önemli farkın olduğu tespit edilmiştir ($F=14.80$; $df=7,16$; $P<0.001$) (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. *Photorhabdus luminescens*, *Escherichia coli* Süpernatant-Pelet deneyinde kuyucuklarda kalan sıvı miktarları (ml). (P.I-S : *Photorhabdus luminescens* süpernatantı; P.I-OS: *Photorhabdus luminescens* otoklavlanmış süpernatantı; P.I-P: *Photorhabdus luminescens* peleti; P.I-YP: *Photorhabdus luminescens* yıkanmış peleti; E.coli-S: *Escherichia coli* süpernatantı; E.coli-P: *Escherichia coli* peleti)

4.2. Entomopatojenik Nematodların Çizgili Pamuk Yaprak Kurdu *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae)'ya Karşı Biyolojik Mücadelede Kullanılmasına Yönelik Araştırmalar

4.2.1. *Spodoptera exigua* Larvalarına Karşı Entomopatojenik Nematodların Etkinliğinin Test Edilmesi

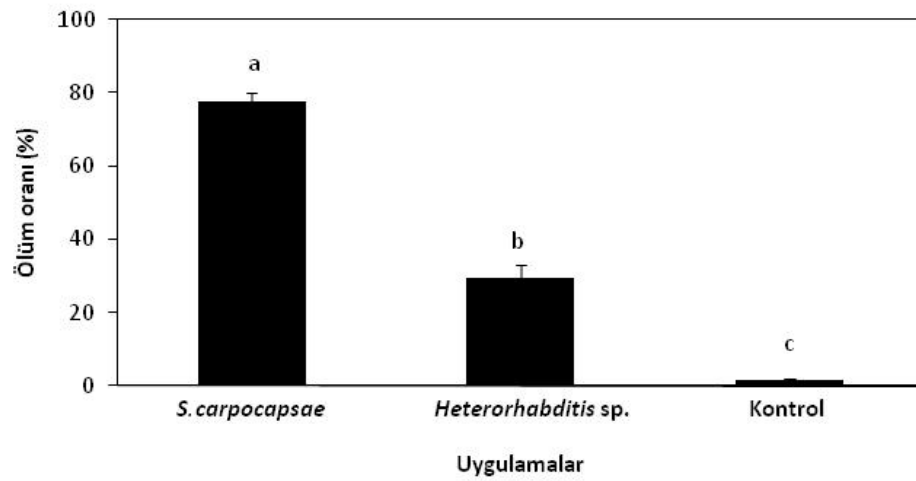
Test edilen nematod türlerinin hepsi *S. exigua* larvalarının tamamını (%100) 3 gün içerisinde öldürmüştür. Kontrol grubunda yeralan larvalarda ise ölüm oranı % 2 olarak tespit edilmiştir. Test edilen nematod türleri arasında ölüm oranları bakımından istatistiki bir fark olmamasına rağmen ($F=0.6$; $df=5,12$; $P>0.05$), laboratuvaradaki çim alan denemeleri için *Steinernema* cinsi içerisinde *S. carpocapsae* türü seçilmiştir. Heterorhabditlerden *Heterorhabditis* sp. kullanılmıştır.

4.2.2. Çim Alan Denemeleri

Her çim alana 30 larva ilave edilmiş ve kafeslerin etrafı bantlarla kapatılmış olmasına rağmen, kontrollerin yapılması esnasında genelde kullanılan 30 larvanın tamamına ulaşılammıştır. Buna rağmen larvaların yaklaşık %80'lik kısmı çim ortamından tekrar toplanabilmiştir (Şekil 4.32). *S. carpocapsae* ile yapılan denemelerde *S. exigua* larvalarının ölüm oranı %77, *Heterorhabditis* sp. ile yapılanlarda %29, kontrol grubunda ise %1,6 olarak tespit edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda *S. carpocapsae* istatistiki olarak önemli ölçüde en fazla ölüm oranı göstermiştir. Tüm gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli ölçüde fark olduğu belirlenmiştir ($F=213.94$; $df=2,42$; $P<0.05$) (Şekil 4.33).



Şekil 4.32. Deney grubundaki larvaların 5 gün sonunda kontrol edilmesi



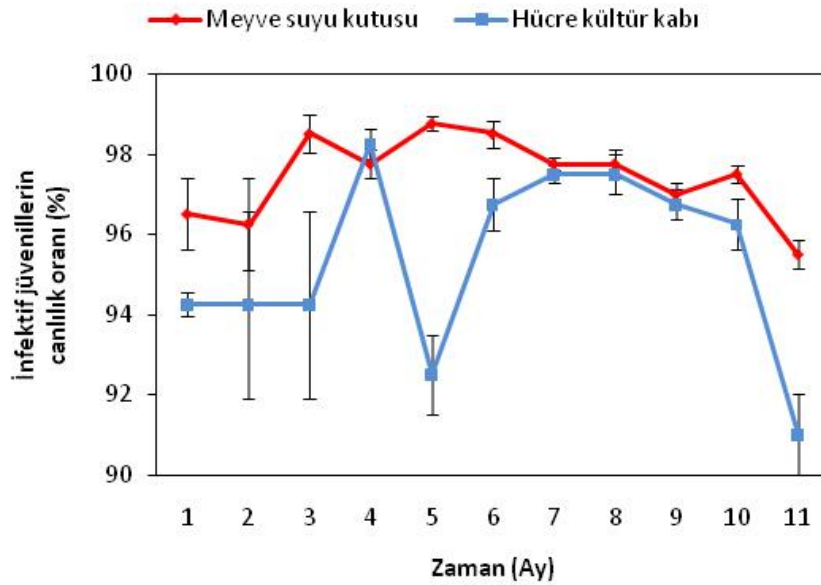
Şekil 4.33. Laboratuvarda yapılan çim alan denemelerindeki *Spodoptera exigua* larvalarının ölüm oranları (%)

4.3. Entomopatojenik nematod kültürlerinin muhafaza edilmesinde kullanılan hücre kültür kaplarına alternatif yeni bir saklama kabı

Çalışmada entomopatojenik nematod kültürlerinin saklanmasında standart olarak kullanılan hücre kültür kaplarına alternatif olarak tetra pak yapılı meyve suyu kutularının kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu amaçla her iki kutuda saklanan nematod kültürleri, infektif juvenillerin canlı-ölü oranları, larvaları öldürme oranları ve larva içerisine girebilen nematod sayıları açıdan karşılaştırılmıştır.

4.3.1. İnfektif juvenillerin canlı-ölü oranları

10°C'de 11 ay boyunca yürütülen deneyler sonucunda IJ'lerin canlılık oranları meyve suyu kutusunda ortalama % 97 (95,5-98,8), hücre kültür kabında ise ortalama % 95 (91,0-98,3) olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.34). İki kutudaki infektif juvenillerin canlılık oranları her ay için ayrı ayrı karşılaştırıldığında, 1, 5, 6 ve 11. aylarda istatistiksel olarak aralarında önemli fark olduğu bulunmuştur ($P<0.05$, Çizelge 4.2).



Şekil 4.34. 10°C'de tutulan kutulardaki infektif juvenillerin canlılık oranları (%)

Çizelge 4.2. 10°C’de kutulara göre infektif juvenillerin canlılık oranları (%)

Aylar	Meyve suyu kutusu	Hücre kültür kabı	Serbestlik derecesi (df)	F	Anlamlılık düzeyi (P)
1	96,5 a*	94,3 b	1,10	5.24	0,045
2	96,3 a	94,3 a	1,10	0.58	0,464
3	98,5 a	94,3 a	1,10	3.58	0,088
4	97,8 a	98,3 a	1,10	0.91	0,360
5	98,8 a	92,5 b	1,10	37.81	0,000
6	98,5 a	96,8 b	1,10	5.10	0,047
7	97,8 a	97,5 a	1,10	1.42	0,260
8	97,8 a	97,5 a	1,10	0.06	0,799
9	97,0 a	96,8 a	1,10	0.43	0,525
10	97,5 a	96,3 a	1,10	2.75	0,128
11	95,5 a	91,0 b	1,10	16.40	0,002
Ortalama	97,4	95,4	-	-	-
Serbestlik derecesi	10,55	10,55	-	-	-
F	3.80	5.83	-	-	-
Anlamlılık düzeyi (P)	0.001	0.000	-	-	-

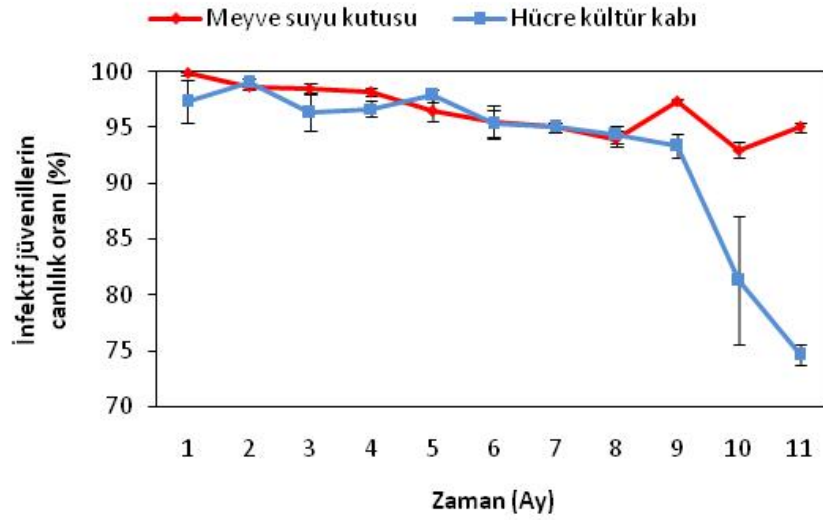
*Satırlar soldan sağa doğru incelendiğinde, aynı harfi içeren ortalamalar arasında istatistiksel olarak önemli fark yoktur (Tukey testi).

Genel doğrusal modele göre 10°C’de infektif juvenillerin yüzde (%) canlılık oranları karşılaştırıldığında, kutular, aylar, kutular x aylar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$, Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. 10°C’de kutulara göre infektif juvenillerin canlılık oranlarının Genel Doğrusal Model analizi ile değerlendirilmesi (%)

Faktör	Serbestlik derecesi (df)	F	Anlamlılık düzeyi (P)
Kutular	1,110	25.96	0.000
Aylar	10,110	5.82	0.000
Kutular x Aylar	10,110	2.80	0.004

Çalışmanın 15°C’de yürütülen kısmına baktığımızda meyve suyu kutularındaki ortalama canlılık oranı %96,5 (93,0- 99,8) iken, hücre kültür kabı grubunda %92,8 (74,7-99,0)’dir (Çizelge 4.4, Şekil 4.35). İnfektif juvenillerin canlılık oranları her ay için ayrı ayrı değerlendirildiğinde sadece 9 ve 11. aylarda kutular arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur ($P < 0.05$, Çizelge 4.4).



Şekil 4.35. 15°C’de tutulan kutulardaki infektif juvenillerin canlılık oranları (%)

Çizelge 4.4. 15°C’de kutulara göre infektif juvenillerin canlılık oranları (%)

Aylar	Meyve suyu kutusu	Hücre kültür kabı	Serbestlik derecesi (df)	F	Anlamlılık düzeyi (P)
1	99,8 a*	97,3 a	1,10	1.67	0,225
2	98,7 a	99,0 a	1,10	0.45	0,515
3	98,5 a	96,3 a	1,10	1.70	0,221
4	98,2 a	96,7 a	1,10	3.71	0,083
5	96,5 a	97,8 a	1,10	1.32	0,277
6	95,5 a	95,3 a	1,10	0.01	0,932
7	95,0 a	95,0 a	1,10	0	1
8	94,0 a	94,3 a	1,10	0.1	0,758
9	97,3 a	93,3 b	1,10	13.84	0,004
10	93,0 a	81,3 a	1,10	3.98	0,074
11	95,0 a	74,7 b	1,10	422.84	0,000
Ortalama	96,5	92,8	-	-	-
Serbestlik derecesi (df)	10,55	10,55	-	-	-
F	10.48	14.30	-	-	-
Anlamlılık düzeyi (P)	0.00	0.00	-	-	-

*Satırlar soldan sağa doğru incelendiğinde, aynı harfi içeren ortalamalar arasında istatistiksel olarak önemli fark yoktur (Tukey testi).

İnfektif juvenillerin yüzde (%) canlılık oranları genel doğrusal modele göre kutular, aylar, kutular x aylar bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan aralarında önemli bir fark olduğu görülmüştür ($P < 0,001$) (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. 15°C’de kutulara göre infektif juvenillerin canlılık oranlarının Genel Doğrusal Model analizi ile değerlendirilmesi (%)

Faktör	Serbestlik derecesi (df)	F	Anlamlılık düzeyi (P)
Kutular	1,110	23.91	0.000
Aylar	10,110	22.36	0.000
Kutular x Aylar	10,110	5.80	0.000

Her iki sıcaklık derecesinin verileri birlikte değerlendirildiğinde sıcaklıklar yani 10 ve 15 °C’de yürütülen deneylerdeki canlılık oranları arasında istatistiki açıdan önemli bir fark olduğu görülmüştür (F=12.24; df=1,220; P<0,001). Test edilen iki farklı saklama kutusu arasında da nematodların canlılığı açısından önemli oranda fark olduğu belirlenmiştir (F=48.60; df=1,220; P<0,001). Aylara göre nematodlardaki canlılık oranlarının karşılaştırılması yapıldığında aylar arasında da istatistiki açıdan fark olduğu tespit edilmiştir (F=19.38; df=10,220; P<0,001). Sıcaklıklar ile kullanılan kutular bir arada değerlendirildiğinde (sıcaklık x kutu) aralarında istatistiki açıdan önemli bir fark bulunmamıştır (F=0.07; df=1,220; P=0.0403). Sıcaklıklar ile aylar (sıcaklık x ay) (F=13.36; df=10,220; P<0,001) ve aylar ile kutular (aylar x kutu) (F=4.83; df=10,220; P<0,001) bir arada değerlendirildiğinde ise önemli fark olduğu tespit edilmiştir. Üç farklı kriter bir arada değerlendirilmeye alındığında (sıcaklık x ay x kutu) (F=4.60; df=10,220; P<0,001) infektif juvenillerin canlılık oranları bakımından da istatistiksel olarak önemli derecede fark olduğu görülmüştür (Çizelge 4.6).

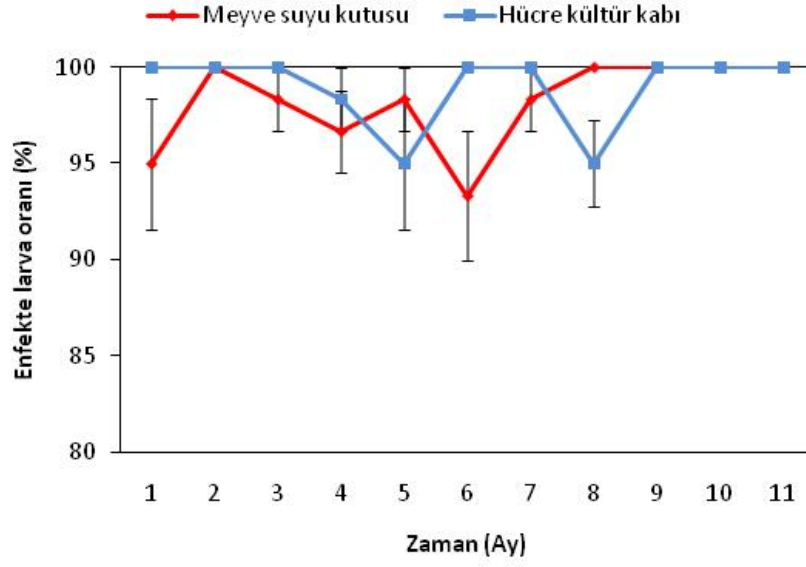
Çizelge 4.6. 10 ve 15°C’de kutulara göre infektif juvenillerin canlılık oranlarının Genel Doğrusal Model analizi ile değerlendirilmesi (%)

Faktör	Serbestlik derecesi (df)	F	Anlamlılık düzeyi (P)
Sıcaklıklar	1,220	12.24	0.001
Kutular	1,220	48.60	0.000
Aylar	10,220	19.38	0.000
Sıcaklıklar x Kutular	1,220	0.70	0.403
Sıcaklıklar x Aylar	10,220	13.36	0.000
Aylar x Kutular	10,220	4.83	0.000
Sıcaklıklar x Aylar x Kutular	10,220	4.60	0.000

4.3.2. İnfektif juvenillerin larvaları öldürme oranı

10°C’de infektif juvenillerin *G. mellonella* larvalarını öldürme oranları incelendiğinde, meyve suyu kutusu grubunda ortalama değer % 98,2 (93,3-100,0), hücre kültür kabında ise % 98,9 (95,0-100,0)’dur (Çizelge 4.7, Şekil 4.36). Kutulardaki infektif juvenillerin larvaları öldürme oranları aylara göre ayrı ayrı

değerlendirildiğinde ise yalnızca 8. ayda kutular arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($P < 0,05$, Çizelge 4.7).



Şekil 4.36. 10°C’de tutulan kutulardaki infektif juvenillerin *Galleria mellonella* larvalarını enfekte etme oranı (%)

Çizelge 4.7. 10°C’de bekletilen kutulardaki infektif juvenillerin *Galleria mellonella* larvalarını enfekte etme oranları (%)

Aylar	Meyve suyu kutusu	Hücre kültür kabı	Serbestlik derecesi (df)	F	Anlamlılık düzeyi (P)
1	95,0 a*	100,0 a	1,10	2.38	0.153
2	100,0	100,0	1,10	-	-
3	98,3 a	100,0 a	1,10	1.00	0.341
4	96,7 a	98,3 a	1,10	0.38	0.549
5	98,3 a	95,0 a	1,10	0.58	0.461
6	93,3 a	100,0 a	1,10	4.70	0.055
7	98,3 a	100,0 a	1,10	1.00	0.341
8	100,0 a	95,0 b	1,10	5.00	0.049
9	100,0	100,0	1,10	-	-
10	100,0	100,0	1,10	-	-
11	100,0	100,0	1,10	-	-
Ortalama	98,2	98,9	-	-	-
Serbestlik derecesi (df)	10,55	10,55	-	-	-
F	1.60	2.53	-	-	-
Anlamlılık düzeyi (P)	0.130	0.014	-	-	-

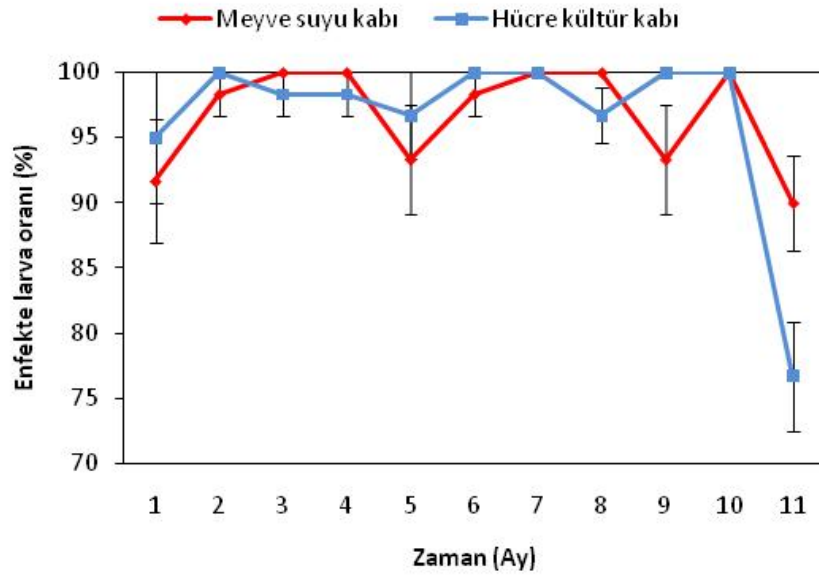
*Satırlar soldan sağa doğru incelendiğinde, aynı harfi içeren ortalamalar arasında istatistiksel olarak önemli fark yoktur (Tukey testi).

10°C’lik sıcaklıkta yürütülen denemelerde elde edilen veriler genel doğrusal model analizi yapılarak değerlendirildiğinde kutular ve aylar açısından istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$). Ancak bulgular kutu x ay olarak değerlendirildiğinde istatistiki açıdan önemli bir farkın olduğu görülmüştür ($P<0,05$, Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. 10°C’de bekletilen kutulardaki infektif juvenillerin *Galleria mellonella* larvalarını enfekte etme oranlarının Genel Doğrusal Model analizi ile değerlendirilmesi (%)

Faktör	Serbestlik derecesi (df)	F	Anamlılık düzeyi (p)
Kutular	1,110	1.32	0.253
Aylar	10,110	1.64	0.102
Kutular x Aylar	10,110	2.21	0.022

15°C’de meyve suyu kutusunda tutulan infektif juvenillerin *G. mellonella* larvalarını öldürme oranı ortalama %96,8 (90-100)’dir. Hücre kültür kabı grubunda ise bu değer ortalama %96,5 (76,7-100,0) olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.9, Şekil 4.37). İki saklama kabı grubu her ay için birbiriyle kıyaslandığında sadece 11. ayda kutular arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0,05$, Çizelge 4.9).



Şekil 4.37. 15°C’de tutulan kutulardaki infektif juvenillerin *Galleria mellonella* larvalarını enfekte etme oranı (%)

Çizelge 4.9. 15°C’de bekletilen kutulardaki infektif juvenillerin *Galleria mellonella* larvalarını enfekte etme oranları (%)

Aylar	Meyve suyu kutusu	Hücre kültür kabı	Serbestlik derecesi (df)	F	Anlamlılık düzeyi (P)
1	91,7 a*	95,0 a	1,10	0.62	0.448
2	98,3 a	100,0 a	1,10	1	0.341
3	100,0 a	98,3 a	1,10	1	0.341
4	100,0 a	98,3 a	1,10	1	0.341
5	93,3 a	96,7 a	1,10	0.38	0.549
6	98,3 a	100,0 a	1,10	0.38	0.549
7	100,0	100,0	1,10	0	1
8	100,0 a	96,7 a	1,10	2.50	0.145
9	93,3 a	100,0a	1,10	2.50	0.145
10	100,0	100,0	1,10	0	1
11	90,0 a	76,7 b	1,10	5.03	0.049
Ortalama	96,8	96,5	-	-	-
Serbestlik derecesi (df)	10,55	10,55	-	-	-
F	2.43	7.85	-	-	-
Anlamlılık düzeyi (P)	0.018	0.00	-	-	-

*Satırlar soldan sağa doğru incelendiğinde, aynı harfi içeren ortalamalar arasında istatistiksel olarak önemli fark yoktur (Tukey testi).

Genel doğrusal model analizi kullanılarak 15°C’de elde edilen veriler değerlendirildiğinde kutu ve kutu x ay açısından larvaları öldürme oranlarında istatistiksel olarak farklar önemsiz bulunmuştur ($P>0,05$, Çizelge 4.9). Sadece aylar açısından ise larva öldürme oranlarında istatistiki olarak önemli derecede fark olduğu tespit edilmiştir ($P<0,001$, Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. 15°C’de bekletilen kutulardaki infektif juvenillerin *Galleria mellonella* larvalarını enfekte etme oranlarının Genel Doğrusal Model analizi ile değerlendirilmesi (%)

Faktör	Serbestlik derecesi (df)	F	Anlamlılık düzeyi (P)
Kutular	1,110	0	0.987
Aylar	10,110	7.40	0.000
Kutular x Aylar	10,110	1.82	0.065

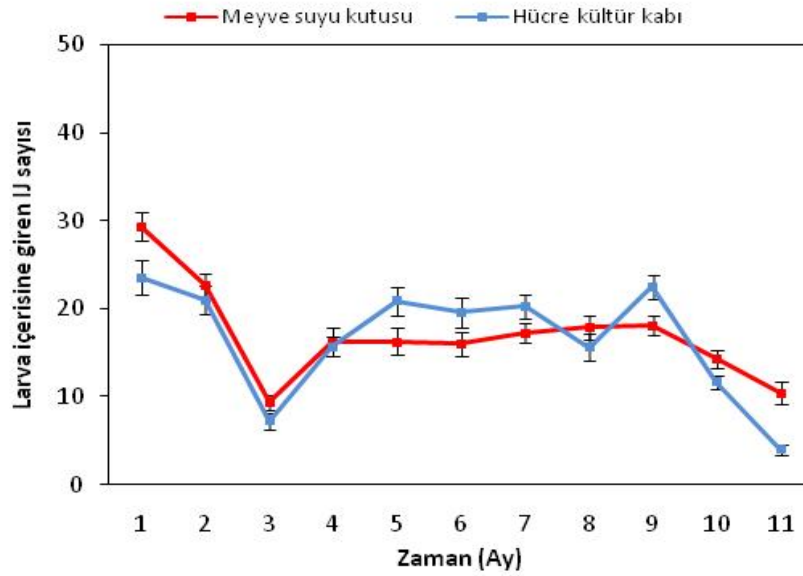
10 ve 15°C’lik sıcaklıklardan elde edilen veriler birarada değerlendirildiğinde ise sıcaklıklar ve aylar tek başına ele alındığında her ikisinde de istatistiki açıdan önemli farklar olduğu belirlenmiştir ($P < 0,001$). Ancak kullanılan kutular arasında fark bulunamamıştır ($P > 0,05$). Faktörler ikili olarak ele alındığında ise sıcaklık x kutu arasındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir ($P > 0,05$). Oysa sıcaklık x aylar ve aylar x kutu verileri değerlendirildiğinde aradaki farkların önemli olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,001$). Deneylerdeki tüm değişken faktörler sıcaklık x ay x kutu birlikte değerlendirildiğinde ise elde edilen farkın istatistiki açıdan önemli olmadığı görülmüştür ($P > 0,05$) (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. 10 ve 15°C’de bekletilen kutulardaki infektif juvenillerin *Galleria mellonella* larvalarını enfekte etme oranlarının Genel Doğrusal Model analizi ile değerlendirilmesi (%)

Faktör	Serbestlik derecesi (df)	F	Anlamlılık düzeyi (p)
Sıcaklıklar	1,220	6.01	0.015
Kutular	1,220	0.52	0.471
Aylar	10,220	4.66	0.000
Sıcaklıklar x Kutular	1,220	0.48	0.486
Sıcaklıklar x Aylar	10,220	5.75	0.000
Aylar x Kutular	10,220	2.54	0.006
Sıcaklıklar x Aylar x Kutular	10,220	1.39	0.184

4.3.3. Larva içerisine girebilen nematod sayıları

Larva başına içeri giren nematod sayılarına bakıldığında 10°C’de tutulan meyve suyu kutuları için elde edilen ortalama değer 17,8 (9,7-29,7), hücre kültür kaplarında ise 16,8 (4,2-23,8) olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.12; Şekil 4.38). İki saklama kabındaki infektif juvenillerin larva içerisine girme oranları her ay için birbiriyle kıyaslandığında 1, 4, 9, 10 ve 11. aylarda aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($P < 0,05$, Çizelge 4.12). Elde edilen veriler genel doğrusal model kullanılarak değerlendirildiğinde larva içerisine giren nematod sayıları bakımından kutular arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı görülmüştür ($P > 0,05$). Bununla beraber ay ve kutu x ay olarak bakıldığında larva içerisine giren infektif juvenil sayıları bakımından farkın önemli olduğu görülmüştür ($P < 0,05$, Çizelge 4.13).



Şekil 4.38. 10°C’de tutulan kutulardaki infektif juvenillerin her bir larva içerisine giren ortalama birey sayıları

Çizelge 4.12. 10°C’de bekletilen kutulardaki larva içerisine giren infektif juvenil sayıları

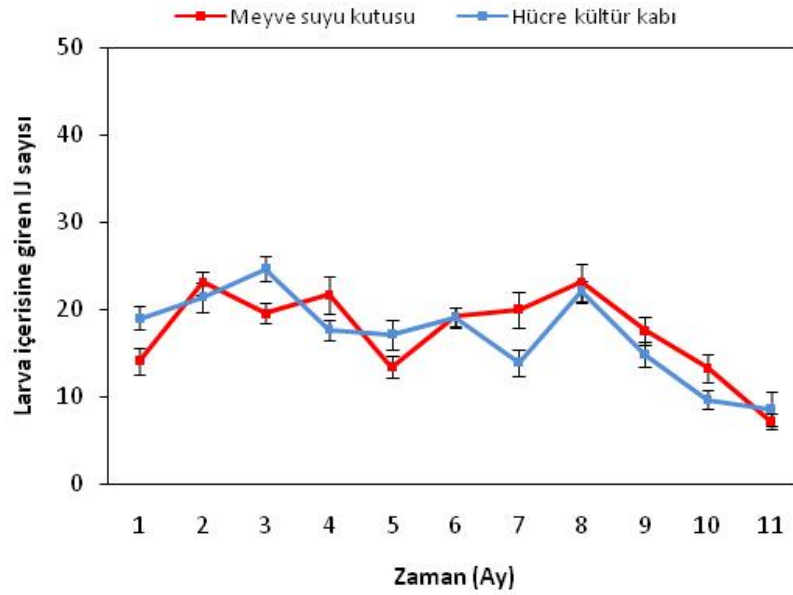
Aylar	Meyve suyu kutusu	Hücre kültür kabı	Serbestlik derecesi (df)	F	Anlamlılık düzeyi (p)
1	29,7 a*	23,8 b	1,38	5.26	0.027
2	22,9 a	21,3 a	1,38	0.57	0,454
3	9,7 a	7,5 a	1,38	3.05	0,088
4	21,5 a	16,0 b	1,37	7.59	0,009
5	16,6 a	21,0 a	1,38	4.10	0,05
6	16,4 a	19,9 a	1,38	2.55	0,118
7	17,4 a	20,4 a	1,38	2.67	0,11
8	18,3 a	15,9 a	1,37	1.37	0,248
9	18,4 a	22,9 b	1,38	6.30	0,016
10	14,5 a	11,9 b	1,38	4.17	0,048
11	10,7 a	4,2 b	1,38	21.90	0,000
Ortalama	17,8	16,8	-	-	-
Serbestlik derecesi (df)	10,208	10,208	-	-	-
F	10.06	21.44	-	-	-
Anlamlılık düzeyi (p)	0.00	0.00	-	-	-

*Satırlar soldan sağa doğru incelendiğinde, aynı harfi içeren ortalamalar arasında istatistiksel olarak önemli fark yoktur (Tukey testi).

Çizelge 4.13. 10°C’de bekletilen kutulardaki larva içerisine giren infektif juvenil sayılarının Genel Doğrusal Model analizi ile değerlendirilmesi

Faktör	Serbestlik derecesi (df)	F	Anlamlılık düzeyi (p)
Kutular	1,416	3.08	0.080
Aylar	10,416	34.94	0.000
Kutular x Aylar	10,416	4.78	0.000

Çalışmanın 15°C’de yürütülen kısmında meyve suyu kutusunda muhafaza edilen infektif juvenillerin larva içerisine girme oranları ortalama 17,6 (7,2-23,4) olarak tespit edilmiştir. Hücre kültür kaplarında ise bu değer ortalama 17,3 (9,8-25,1) olmuştur (Çizelge 4.14, Şekil 4.39). Her ay yapılan kontrollerde elde edilen verilere göre iki saklama kabındaki nematodların larva içerisine girme oranlarına bakıldığında 1, 3 ve 7. aylarda değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($P<0.05$, Çizelge 4.14).



Şekil 4.39. 15°C’de tutulan kutulardaki infektif juvenillerin her bir larva içerisine giren ortalama birey sayıları

Çizelge 4.14. 15°C’de bekletilen kutulardaki larva içerisine giren infektif juvenil sayıları

Aylar	Meyve suyu kutusu	Hücre kültür kabı	Serbestlik derecesi (df)	F	Anlamlılık düzeyi (p)
1	14,3 a*	19,3 b	1,38	5.75	0,021
2	23,4 a	21,7 a	1,38	0.63	0,43
3	19,8 a	25,1 b	1,38	7.44	0,01
4	21,9 a	17,9 a	1,38	2.67	0,11
5	13,6 a	17,4 a	1,38	3.13	0,085
6	19,4 a	19,3 a	1,37	0.00	0,966
7	20,0 a	14,1 b	1,38	5.46	0,025
8	23,1 a	22,3 a	1,38	0.12	0,727
9	17,6 a	15,0 a	1,36	1.36	0,251
10	13,3 a	9,8 a	1,38	3.14	0,084
11	7,2 a	8,7 a	1,31	0.51	0,479
Ortalama	17,6	17,3	-	-	-
Serbestlik derecesi (df)	10,203	10,205	-	-	-
F	9.14	12.01	-	-	-
Anlamlılık düzeyi (p)	0.00	0.00	-	-	-

*Satırlar soldan sağa doğru incelendiğinde, aynı harfi içeren ortalamalar arasında istatistiksel olarak önemli fark yoktur (Tukey testi)

Genel doğrusal model analizine göre larva içerisine giren nematod sayıları değerlendirildiğinde kutular arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadığı görülmüştür ($P>0.05$). Ancak aylar ve ay x kutu olarak yapılan değerlendirmelerde aralarındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($P<0.05$, Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15. 15°C’de bekletilen kutulardaki larva içerisine giren infektif juvenil sayılarının Genel Doğrusal Model analizi ile değerlendirilmesi

Faktör	Serbestlik derecesi (df)	F	Anlamlılık düzeyi (p)
Kutular	1,408	0.20	0.650
Aylar	10,408	17.70	0.000
Kutular x Aylar	10,408	3.07	0.001

Her iki sıcaklık grubundan elde edilen veriler birlikte değerlendirildiğinde sıcaklık dereceleri ve iki farklı saklama kabı arasında istatistiki açıdan bir fark olmadığı belirlenmiştir ($P>0.05$). Ancak aylar arasında önemli fark olduğu görülmüştür ($P<0.001$). Deneylerde kullanılan değişkenler ikili olarak ele alındığında sıcaklık x kutu arasındaki farkın önemsiz olduğu belirlenmiştir ($P>0.05$). Oysa sıcaklık x ay ve ay x kutu verilerinde farkların önemli olduğu tespit edilmiştir ($P<0.01$). Deneylerdeki tüm faktörler sıcaklık x ay x kutu birlikte ele alındığında elde edilen farkın istatistiki açıdan önemli olduğu anlaşılmıştır ($P>0.001$) (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16. 10 ve 15°C’de bekletilen kutulardaki larva içerisine giren infektif juvenil sayılarının Genel Doğrusal Model analizi ile değerlendirilmesi

Faktör	Serbestlik derecesi (df)	F	Anlamlılık düzeyi (p)
Sıcaklıklar	1,824	4.49	0.741
Kutular	1,824	2.27	0.132
Aylar	10,824	33.14	0.000
Sıcaklıklar x Kutular	1,824	0.68	0.409
Sıcaklıklar x Aylar	10,824	17.43	0.000
Aylar x Kutular	10,824	3.09	0.001
Sıcaklıklar x Aylar x Kutular	10,824	4.49	0.000

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. ADF (Ant Deterrent Factor-Karınca Uzaklaştırıcı Faktör) Maddesinin Farklı Gruplardan Yağmacı Böceklere Karşı Etkisinin Tespiti ve Maddenin Yapısını Aydınlatmaya Yönelik Çalışmalar

Bu çalışma kapsamında yürütülen deneylerden elde edilen sonuçlar entomopatojenik nematodlarla 48 saat ve üzerinde enfekte olan kadvraların yağmacı böceklerin istilasından uzak tutulduğunu göstermiştir. Daha önce ADF aktivitesi olarak tanımlanan bu özelliğin entomopatojenik nematodlarla mutualistik yaşayan bakteriler tarafından üretildiği bu çalışma ile kesin olarak saptanmıştır. *Heterorhabditis* cinsine ait nematodlarla birlikte yaşayan *Photorhabdus* bakterilerinin ürettiği ADF maddesinin, *Steinernema* cinsine ait nematodlarla ilişkili olan *Xenorhabdus* cinsi bakterilere oranla daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Kaya vd. (1998) 4 ve 10 günlük *Steinernema* cinsi nematodlarla enfekte ettikleri kadvraları toprak yüzeyine bıraktıklarında Arjantin karıncalarının, *Linepithema humile*, bu kadvraları sırasıyla %80 ve %70 oranında tükettiklerini, oysa heterorhabditlerle enfekte kadvralarda bu oranın %35 ve %5 olduğunu rapor etmişlerdir. Bu veriler doğrultusunda araştırmacılar steinernematidlerle ilişkili *Xenorhabdus* cinsi bakterilerin ADF üretmediklerini, bu maddenin sadece *Photorhabdus* bakterilerince üretildiğini öne sürmüşlerdir. Ancak bu çalışmadaki karıncalarla yapılan kadvra denemelerinde *L. frauenfeldi* kolonisine ait karıncaların nematodla 2 ve 4 günlük enfekte kadvraların hiçbirisini besin olarak tüketmedikleri ve kadvraları kontrol ettikten sonra uzaklaştıkları belirlenmiştir. *L. frauenfeldi* türüne ait karıncaların sergiledikleri bu davranış, Zhou vd. (2002) tarafından test edilen Arjantin karıncalarına, *L. humile*, benzerlik göstermiştir. Bu araştırmacılar *Xenorhabdus* bakterilerinin de ADF maddesini ürettiklerini tespit etmişlerdir. Baur vd. (1998) steinernematid ve heterorhabditid ile enfekte edilmiş 2 ve 8 günlük *G. mellonella* larvalarını toprağın yüzeyine ve 2 cm altına bıraktıklarında *L. humile* türüne ait karınca kolonisindeki bireylerin 24 saat sonunda heterorhabditler tarafından enfekte edilen kadvraları % 10-20; steinernematidler ile enfekte olanları ise %60-80 oranında tercih ettiğini saptamışlardır. Yapılan istatistiki analiz sonuçlarına göre toprağın yüzeyine

bırakılan kadvralar ile 2 cm altına gömülenler arasında yağmalanma bakımından önemli bir fark bulamamışlardır. Çalışmamızda 2 ve 4 günlük enfekte hiçbir kadvra karıncalar tarafından yenmez iken, *S. feltiae* ile enfekte 2 günlük kadvralar üzerinde ısırıklar olduğu görülmüştür. Bu durum daha önce çalışma yapan bilim adamları tarafından da gözlenmiştir. Baur vd. (1998) ve Zhou vd. (2002) *Steinernema* cinsine ait nematodlarla enfekte olan kadvralarda karıncaların ısırıklarına rastlamış ve bu kadvraları “non-intact” yani “bütünlüğü bozulmuş” olarak nitelendirmişlerdir. *Heterorhabditis*'lerle enfekte olan kadvralarda ise bu çalışmada olduğu gibi hiçbir ısırık izine rastlamamışlardır. Baur vd. (1998) bu durumu açıklamak için öne sürdüğü hipotezlerden birinde *Heterorhabditis* enfeksiyonlarında ortaya çıkan kırmızı rengin karıncaları uzaklaştırıcı bir etkiye sahip olabileceği ve kadvrada oluşan bu kırmızı rengin karıncaları uzaklaştırmada önemli bir role sahip olabileceğini öne sürmüştür. Ancak araştırmacılar bu hipotezlerini test etmeye yönelik bir çalışma gerçekleştirmemişlerdir. Bir grup *G. mellonella* larvasını -20°C de öldürdükten sonra gıda boyası kullanılarak kırmızıya boyandığı bu çalışma sonucunda, karıncaların gıda boyasıyla boyanmış tüm larvaları tükettikleri, ancak aynı alanda bulunan heterorhabditlerle enfekte kadvralardan sadece 1 günlük enfekte olanı yedikleri belirlenmiştir. Bu veriler, Baur vd. (1998) tarafından öne sürülen “kırmızı renk” hipotezinin doğru olmadığını ortaya koymuştur. Elde edilen tüm veriler entomopatojenik nematodlarla 2 gün ve üzerindeki sürelerde enfekte olan kadvraların hepsinin karınca uzaklaştırıcı (ADF) özelliğe sahip olduklarını ve heterorhabditlerle enfekte olan kadvralarda bu etkinin steinernematidlere oranla daha fazla olduğunu göstermiştir.

ADF aktivitesinin belirlenmesine yönelik daha önceki çalışmaların hemen hepsi karıncalarla gerçekleştirilmiştir (Baur vd., 1998; Zhou vd., 2002). Karıncalar dışında çalışma yapan Foltan ve Puza (2009) predatör/yağmacı bir böcek olan *Pterostichus melanarius* (Coleoptera: Carabidae) türünün *Phasmarhabditis hermaphrodita* ile enfekte *Deroceras reticulatum* (Gastropoda: Agriolimacidae) türü sümüklüböcekler ve *Steinernema affine* ile enfekte *G. mellonella* larvalarını besin olarak tercih edip etmediklerine bakmışlardır. Sonuçta yağmacı böcek, *P. melanarius*'un nematodlar tarafından enfekte olan kadvraları tüketmediklerini sadece dondurularak öldürülen kontrol grubundaki kadvraları yediklerini belirlemişlerdir. Bu veriler sonucunda araştırmacılar ileri sürdükleri hipotezde *P.*

hermaphrodita türüne ait nematodların böcekleri enfekte edemedikleri için ortaya çıkan bu uzaklaştırıcı etkinin, böceklerin potansiyel enfekte kadavraları tanıyıp uzak durmasından çok, nematod/bakteri kompleksinin evrimsel bir adaptasyonu olduğunu öne sürmüşlerdir. ADF maddesinin çekirgeler, yabanarıları ve leş sinekleri üzerindeki etkilerini araştırmaya yönelik olarak gerçekleştirilen bu çalışma dünyada ilk defa yapılmıştır. *G. bimaculatus* kolonisiyle yürütülen çalışmada monoksenik, aksenik nematod kültürleriyle birlikte entomopatojen bir bakteri türü olan *Serratia marcescens* ve *Heterorhabditis* 'lerin mutualistik bakterisi *Photorhabdus luminescens* ile enfekte edilmiş kadavralar kullanılmıştır. Elde edilen veriler mutualistik bakterileri taşımayan nematodlarla (aksenik) enfekte edilen 1-7 günlük kadavra serisinin tamamının çekirgeler tarafından tüketildiğini; oysa mutualistik bakteriyi taşıyan nematodlarla (monoksenik) enfekte olan kadavraların ise sadece 24 saatlik enfekte olanının çekirgeler tarafından tüketildiğini göstermiştir. *S. marcescens* ve *P. luminescens* ile enfekte edilen 1-5 günlük kadavra serisinden, sadece 1 günlük *Photorhabdus* ile enfekte olan kadavralar tüketilirken *Serratia* ile enfekte kadavralardan 1, 4 ve 5 günlüklerin tamamı 2 ile 3 günlüklerin ise büyük bölümü çekirgeler tarafından tüketilmiştir. Kontrol grubu olarak kullanılan dondurularak öldürülmüş larva serilerinin tamamı da yenmiştir. Foltan ve Puza (2009) yaptıkları çalışma sonucunda yağmacı böceği nematodla enfekte kadavralardan uzak tutan etkinin kaynağının entomopatojenik nematod mu yoksa mutualistik bakteriler mi olduğunu belirleyememiştir. Zhou vd. (2002) karıncalar üzerinde yaptıkları çalışmalar sonucunda karınca uzaklaştırıcı faktörün (ADF) nematodların birlikte yaşadıkları mutualistik bakteri tarafından üretildiğini ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada elde edilen veriler şüpheye yer bırakmaksızın bu etkinin kaynağının entomopatojenik nematodlarla mutualistik yaşayan *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* bakterileri olduğunu ortaya koymuştur. Aksi takdirde aksenik nematodlarla enfekte edilmiş olan larvaların da tüketilmeden kalması gerekirdi.

Bir başka yağmacı arthropod olan yabanarıları ile yapılan çalışmalar sonucunda da 1-6 günlük nematodla enfekte olan kadavralardan sadece 1 günlük enfekte olanları ve kontrol grubundaki dondurularak öldürülmüş larvalar tüketilmiştir. Deney grubundaki larvaların pozisyonları değiştirilse dahi yabanarılarının her defasında 1 günlük enfekte kadavra ile kontrol grubundaki larvayı bulup yedikleri görülmüştür. Bu durumda karıncalar dışında çekirgelerden sonra waspların da

bakteriler tarafından üretilen ADF maddesine karşı tepki verdikleri belirlenmiştir. Konukçuyu enfekte eden bir nematod için en önemli adımlardan birisi o konukçu içerisinde başarılı şekilde üremesini tamamlayarak dışarı çıkabilmesidir. Nematodların hayat döngülerini tamamlayabilmeleri için enfekte olan konukçu vücudunun parçalanmadan kalması hayati önem taşımaktadır. Ölen konukçu böcekler savunmasız kaldıklarından çevrede bulunan yağmacılar için son derece değerli besin kaynaklarıdır. Omurgasız bir yağmacı için böcek kadavrasının tüketilmesi saatler hatta dakikalar içinde tamamlanan hızlı bir olaydır. Oysa entomopatojenik nematodlar hayat döngülerini tamamlayabilmek için günlere ihtiyaç duyarlar. Bu durumda türün devamlılığını sağlamak için nematod/bakteri birlikteliğinin yağmacıları kadavradan uzak tutacak bazı maddeler ürettiği yönünde kanıtlar mevcuttur (Baur vd., 1998; Zhou vd., 2002; Foltan ve Puza, 2009).

Entomopatojenik nematodlar tarafından enfekte edilmiş kadavrayla beslenen yağmacı böcekler teorik olarak enfeksiyon tehditi altındadırlar. Ancak omurgasız kadavraları üzerinden beslenen zorunlu böcek yağmacılarının varlığına dair hiçbir delil mevcut değildir. İnfektif juvenil içermeyen yeni öldürülmüş kadavraların tercih edilmesi ve genelde enfekte böcek kadavralarının nadir bulunması nedeniyle yağmacı böceklerin bu enfekte kadavralarla karşılaşma şansları minimuma indirgenmiştir. Bu yüzden de fakültatif yağmacıların üzerinde enfekte kadavraları tanımaya yönelik evrimsel bir baskının çok fazla olmadığı ileri sürülmüştür. Diğer yandan kadavra içerisinde bulunan nematodlar, konukçularıyla birlikte kendilerini de tüketebilecek olan predatör ve yağmacı böceklerin tehditi altındadır. Bu yüzden enfekte olan konukçudan yağmacı ve predatörleri uzak tutmayı sağlayan yönde çok kuvvetli bir seçilim baskısı mevcuttur (Foltan ve Puza, 2009).

Bu çalışma kapsamında kadavra deneylerinden elde edilen sonuçlar ADF olarak tanımlanmış olan maddenin üretiminden mutualistik bakterilerin sorumlu olduğunu göstermiştir. Bu nedenle ikinci aşamada entomopatojenik nematodlardan izole edilen *Photorhabdus* bakterileri kullanılarak bunların farklı canlı gruplarına karşı sergiledikleri ADF aktiviteleri araştırılmıştır. *Heterorhabditis bacteriophora* türü nematodlardan izole edilerek sıvı besi ortamında üretilen *Photorhabdus luminescens* bakterileri kadavra denemelerinde kullanılan aynı karınca kolonisi üzerinde test edilmiştir. ADF etkisinin hangi üreme süresinde etkili veya etkisiz olduğunu belirlemek için bakteri kültürü 24-384 saatlik bir seri halinde

hazırlanmıştır. 24 gözenekli doku kültür kaplarındaki kuyucuklar içerisine %5'lik sükröz çözeltisiyle karıştırıldıktan sonra eklenen kültürler karınca kolonisinin yuva yakınına veya yolları üzerine bırakılmıştır. Bir saat sonra kuyucuklardan beslenen birey sayıları ve 3 saat sonrasında ise her bir kuyucukta kalan madde miktarları ölçülmüştür. Kuyucuklarda beslenmek amaçlı toplanan karınca ortalama birey sayılarına bakıldığında karıncaların en fazla (45 birey) kontrol grubundaki yani sadece %5'lik sükröz bulunan kuyucukta toplandıkları bunu sırasıyla 24, 48 ve 72 saatlik bakteri kültürlerinin bulunduğu kuyucukların izlediği belirlenmiştir. 72 saatten sonraki bakteri kültürlerinde karınca tespit edilememiştir. Zhou vd. (2002), yaptığı çalışmada *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterilerini karıncalara karşı test etmiş ve bu bakterilerin her ikisinin de ADF aktivitesi gösteren madde veya maddeleri ürettiklerini bildirmiştir.

Photorhabdus ve *Xenorhabdus* türleri aynı ekolojik nişleri (böcek hemosölü ve nematodların sindirim sistemindeki simbiyontlar olarak bulunmaları) paylaşıyor olmasına rağmen, *Heterorhabditis-Photorhabdus* ve *Steinernema-Xenorhabdus* nematod-bakteri birliktelikleri farklıdır ve bu organizmalar farklı kökenlere sahiptirler (Blaxter vd., 1998). Aslında *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* cinslerine ait türlerin genomik DNA'ları arasında %20'den az bir benzerlik bulunmaktadır. Poinar (1993), infektivite, hayat döngüsü ve bakteriyal simbiyontlar ile olan ilişkilerdeki bu benzerliklerin daralan evrimin bir sonucu olduğunu ileri sürmüştür. Bu hipotezin ışığı altında, Zhou vd. (2002) *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterilerince meydana getirilen ADF aktivitesinin farklı bileşiklerden oluşması ve ADF üretiminin de daralan evrim sürecinde zamanla şekillenmiş olmasının mümkün olabileceğini belirtmiştir.

Üç saat sonunda her bir kuyucukta arta kalan madde miktarları hesaplandığında karıncaların kontrol grubundaki sükrözün tamamını tükettiği, 24 saatlik bakteri kültürününün %93 ve 48 saatlik olanın ise %71'lik kısmının tüketildiği belirlenmiştir. Yapılan analizler 72 saatlik kültürlerde de bir miktar tüketimin olduğunu ancak 72 saat ve sonrasındaki kültürler arasında tüketim miktarları yönünden önemli bir fark olmadığını göstermiştir. Bakteri kültürlerinin üreme sürelerinin artmasıyla ADF konsantrasyonunun da arttığı Zhou vd. (2002) tarafından belirtilmiştir. Kaya vd. (1998) yaptıkları çalışmada yağmacı bir böcek olan *Pheidole megacephala* (Hymenoptera: Formicidae)'nın nematodla enfekte olup, ölümünün üzerinden 4 günden daha az süre geçmiş olan kadavraları

yağmaladığını belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar nematodlarla enfekte olan kadavraların kulağakaçanlar, hamamböcekleri ve sümüklüböcekler tarafından tüketildiğini dolayısıyla kadavra içindeki infektif juvenil üretiminin durduğunu bildirmişlerdir. Bu durumun enfeksiyonun erken dönemlerinde bakteriler tarafından üretilen ADF miktarının düşük olmasından kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir. Foltan ve Puza (2009), ise laboratuvarında yaptıkları çalışmada konukçuları enfekte etmede fazla miktarda nematod kullandıklarını ve bunun nematod/bakteri kompleksi tarafından oluşturulan yağmacıları uzaklaştırıcı etkiyi artırmış olabileceğini, oysa bu etkinin doğal ortamlarda daha zayıf olabileceği ve dolayısıyla nematodların yağmacılar tarafından sıklıkla tüketileceğini ileri sürmüşlerdir. Elde edilen tüm veriler ADF maddesinin nematodlar değil mutualistik bakteriler tarafından üretildiğini ve bu etkinin görülebilmesi için belirli bir süre geçmesi gerektiğini göstermektedir. Bu maddenin sentezinin diğer sekonder metabolitlerin sentezinde olduğu gibi bakterilerin durgunluk fazında sentezleniyor olması muhtemeldir. İşte bu nedenle üremenin erken dönemlerinde kuvvetli bir ADF aktivitesi ortaya çıkmıyor olabilir. Ancak burada sorulması gereken başka bir soru vardır: Neden enfekte kadavralarda bu etki 48 saatten itibaren görülmeye başlanıyor iken, bakteri kültüründe bu süre daha geç (72-96 saat) olmaktadır? Kadavra içerisindeyken bakterilerin bu maddeyi daha kısa süre içerisinde sentezlemesine yönelik bir baskı mı oluşmaktadır? veya bu madde konukçu böceğin immün sistemini alt etmek için bakteriler tarafından salınan toksinlerle birlikte salınan bir madde olduğundan konukçu içerisindeki salınım hızı daha mı çabuk olmaktadır?

ADF maddesinin farklı arthropod grupları üzerindeki etkilerini araştırmak üzere yabancıları ve leş sinekleriyle de çalışmalar yürütülmüştür. Bakteri süpernatantları emdirilen ciğer parçalarını hiçbir şekilde tercih etmeyen arılar, *E. coli* bakteri kültürünün süpernatantı emdirilmiş olan ciğer parçalarının ve suda bekletilmiş ciğerlerin tamamını tüketmişlerdir. Diğer deney düzeneğinde ise leş sineklerinin et parçaları üzerine yumurta koyma davranışları incelenmiştir. *Photorhabdus* süpernatantı emdirilmiş olan et parçalarına hiç bir sinek yumurta bırakmazken kontrol grubunda yer alan et parçasının alt kısımlarına çok sayıda yumurta bırakmışlardır. Yapılan gözlemlerde hem yabancıları hem de leş sineklerinin ciğer ve et parçalarının üzerinde gezindikleri ve daha sonra

Photorhabdus süpernatantı olmayan parçaları belirleyerek o parçalardan uzak durdukları görülmüştür.

ADF maddesinin yüksek sıcaklığa ve basınca dayanıklılığının test edildiği otoklavlanmış kültürlerle yapılan karınca denemelerinde otoklavlanmadan önceki sonuçlarla aynı olan veriler elde edilmesi bu maddenin yapısının sıcaklık ve basınçla bozulmadığını göstermiştir.

Tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde ADF maddesinin entomopatojenik nematodların mutualistik bakterileri tarafından üretildiği, bu maddenin hücre dışına salındığı (süpernatantta etkisi çok yüksek), otoklavlandığında dahi yapısının bozulmadığı ve bakteri kültürü eskidikçe (en azından 16 güne kadar) bu maddenin etkinliğinin arttığı anlaşılmıştır. Entomopatojenik nematodların hayat döngüleri göz önüne alındığında konukçuya ve sıcaklığa (Stuart vd., 2006) bağlı olarak değişmekle birlikte oda sıcaklığında steinernematidlerin ortalama 7-9 günde, heterorhabditlerin ise 12-14 günde döngülerini tamamlayarak yeni nesil infektif juvenillerin çıkış yaptıkları bilinmektedir (Kaya ve Stock, 1997). Bu nedenle bakteriler tarafından üretilen ve kadavrayı yağmacıların istilasından koruyacak olan ADF gibi bir maddenin etkinliğini çok kısa süre içerisinde göstermeye başlaması ve nematod gelişimlerinin tamamlanıp yeni nesil infektif juvenillerin çıkışına kadar da bu etkinin devam etmesi mantıklı görülmektedir. Zhou vd. (2002)'de karıncalarla yaptıkları benzer çalışmalar sonucunda ADF maddesinin 0.45µm por çaplı milipor filtreden geçirilmiş bakteri süpernatantında varlığını sürdürmesinden dolayı hücre dışı bir madde olabileceğini, otoklavlandığında dahi aktivitesini kaybetmediği için ise protein tabiatında bir madde olamayacağını ileri sürmüşlerdir. *Photorhabdus* bakterileriyle yapılan detaylı çalışmalar sonucunda bu bakterilerin çok sayıda düşük molekül ağırlıklı ikincil metabolitler ürettiği belirlenmiştir. Bunlar arasında özellikle stilbenler ve anthraquinon'ların (AQ) oldukça basit yapıli bileşikler olmasına rağmen kompleks ekolojik roller üstlendikleri ve alışılmışın dışında bir biyosentez ürünü oldukları rapor edilmiştir (Bode, 2009). Bu iki bileşikten AQ'lar $C_{14}H_8O_2$ ile formüle edilen aromatik bir organik bileşiktir ve 9,10-anthraquinon tohumlar üzerine kuşları uzaklaştırmak amacıyla verilmektedir (<http://en.wikipedia.org/wiki/Anthraquinone>). AQ'lar bitkiler, funguslar ve bakterilerin genel metabolitleridir. *Photorhabdus* bakterilerince üretilen bu bileşiğin karınca ve kuşlar gibi potansiyel predatörleri enfekte kadavradan uzak tutan madde olarak önemli bir role sahip olduğu ve

Gram-negatif bakterilerde bulunan tip II PKS genleri tarafından sentezlendiği bildirilmiştir. Ancak *Xenorhabdus* bakterileriyle yapılan çalışmalarda çok sayıda ikincil metabolit tanımlanmış olmasına rağmen AQ'ların varlığına rastlanmamıştır (Bode, 2009). Bu durumda ya *Xenorhabdus*'larda AQ'ların varlığı tespit edilememiş ya da bu bakterilerde ADF etkisini gösteren başka bir molekül bulunmaktadır.

ADF üretimi mutualistik bakterilerin ürettiği antibiyotikler ve toksinler gibi diğer bileşikler listesine eklenmelidir. Bunlara ilaveten liyofilize ederek test ettiğimiz bakteri kültürlerinin de ADF aktivitesi göstermeleri gelecekte farklı uygulama alanlarının doğmasına yol açabilecek bir bulgudur.

Bu çalışmalar sonucunda karınca uzaklaştırıcı faktör (ADF) yerine yağmacı uzaklaştırıcı faktör (Scavenger Deterrent Factor -SDF) teriminin kullanılması belki daha doğru olacaktır.

5.2. Entomopatojenik Nematodların Çizgili Pamuk Yaprak Kurdu *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae)'ya Karşı Biyolojik Mücadelede Kullanılmasına Yönelik Araştırmalar

Çim alanlarda önemli zarara neden olan *S.exigua* larvalarına karşı yürütülen çalışmalarda kullanılan 4 farklı *Steinernema* (*S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. weiseri* ve *S. glaseri*) ve 2 *Heterorhabditis* türünün (*H.bacteriophora* ve *Heterorhabditis* sp.) hepsi oldukça yüksek bir virulans göstermiştir. Kapaklı plastik kaplarda yürütülen çalışmalarda test edilen tüm nematod türlerinin ilk 72 saat içerisinde *S. exigua* larvalarının tamamını (% 100) öldürdükleri tespit edilmiştir. Lepidopter larvalarının entomopatojenik nematod enfeksiyonlarına son derece duyarlı canlılar oldukları bilinmektedir (Grewal vd., 2005). Bu nedenle dünyanın pek çok yerinde bu familyadaki zararlı türlere karşı entomopatojenik nematodlar başarıyla kullanılmaktadır. Capinera vd. (1988) farklı steinernematid ve heterorhabdit izolatlarını yine bir noctuid olan *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae)'a karşı laboratuvarında ve alanda test etmiştir. Yapılan çalışmada *S. feltiae* Meksika ve *S. feltiae* Kapow izolatları ile *S. bibionis* (bu tür *S. feltiae*'nin sinonimi kabul edilmiştir.) ve *H. heliothitidis* (bu tür daha sonra *H. bacteriophora* olarak tanımlanmıştır) türleri kullanılmıştır. Araştırmacıların laboratuvar denemelerinde nematodlar petripler içerisinde filtre kağıdı ve toprak bulunan 2 farklı ortama bir miktar su ile uygulanmıştır. *S. feltiae* türü 48 saat içerisinde en yüksek larva ölümüne sebep olmuştur. *S. feltiae* Kapow izolatının filtre kağıdı grubunda larvaların %70'ini, içerisinde toprak bulunan petriplerde ise %90'ını öldürerek test edilen nematodlar arasında en etkili izolat olduğu rapor edilmiştir. Bir başka çalışmada ise Rosa ve Simoes (2004) Azor Takımadalarından izole ettikleri 28 *H. bacteriophora* izolatı ile *S. carpocapsae* ve *S. glaseri* türlerini bu adaların mera ve çayırlarının en önemli zararlısı *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae)'ya karşı laboratuvarında test etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda seçtikleri *H. bacteriophora*'nın 2 farklı izolatı ile *S. carpocapsae*'yi alandaki saksı denemelerinde kullanmışlardır. Laboratuvar denemeleri sonucunda test edilen nematodların *P. unipuncta* larvalarını ilk 48 saat sonunda %0 ile %92,5, 96 saat sonunda ise %32,5-100 arasındaki oranlarda öldürdüğünü belirlemişlerdir. Ancak saksı denemelerinde gözlemledikleri larva ölüm oranları *H. bacteriophora* izolatları için %45 ve %20, *S. carpocapsae* türü için %30'dur. Wetchayunt vd. (2009) Tayland'dan elde edilen yeni tür *Steinernema siamkayaii* ile *S.*

carpocapsae ve *S. riobrave*'yi *Spodoptera litura*'ya karşı laboratuvarda test etmiştir. *S. siamkayaii*'nin diğer iki türe göre daha virulent (%100) olduğunu bildirmişlerdir. Kısa sürede görülen yüksek ölüm oranlarının zaten nematodlara duyarlı olan konukçu *S. exigua*'nın dar alanda infektif juvenillerden kaçamaması ve laboratuvar koşullarının (sıcaklık, nem vb.) nematodlar için optimum olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Laboratuvar koşulları altında gözlemlenen yüksek virulansın sıklıkla alan denemelerine yansımadağı bilinmektedir (Georgis vd., 2006).

Doku kültür kaplarında test edilen tüm nematod türleri *S. exigua* larvalarını %100 oranında öldürmüş olmasına rağmen, laboratuvarda yürütülen alan denemeleri için *S. carpocapsae* ve *Heterorhabditis* sp. (otel izolatu) kullanılmıştır. Çünkü *S. carpocapsae* türünün larva öldürme süresinin diğer türlere göre daha kısa bulunmuştur. Aynı zamanda lepidopter larvalarına karşı oldukça yüksek virulans gösteren bir tür olarak bilinmektedir (Georgis vd., 2006). *Heterorhabditis* sp. ise *S. exigua* larvalarının yoğun olarak bulunduğu otel bahçesinden elde edilen doğal izolatu olduğu için seçilmiştir. Laboratuvarda 30x30 cm'lik çim alanlar üzerinde yapılan denemeler sonucunda *S. carpocapsae* türü *S. exigua* larvalarının %77'sini çim alan içerisinde bulup enfekte etmiş, bu oran *Heterorhabditis* sp.' de ise %29 oranında kalmıştır. *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae) türüne karşı şimdiye kadar yapılan çalışmalarda da en etkili iki türün *H. bacteriophora* ve *S. carpocapsae* olduğu ancak *H. bacteriophora*'nın bu zararlı ile mücadelede çok tatmin edici sonuçlar (%62) vermediği fakat *S. carpocapsae*'nin (%95) oldukça başarılı olduğu bildirilmiştir (Georgis vd., 2006; Shapiro-Ilan vd., 2002). Benzer şekilde Buhler ve Gibb (1994) çim bitkisi ekili alanlarda *A. ipsilon* larvalarına karşı mücadelede *S. carpocapsae* ve *S. glaseri* türleriyle uygulama yapmıştır. Çalışmalarında nematodları sulu süspansiyon halinde uygulamışlardır. Sonuç olarak bir ambusher olan *S. carpocapsae*'nin (>%90) hızlı ve etkili bir kontrol sağladığını, ancak bir cruiser olan *S. glaseri*'nin (%70) ise o düzeyde etkili olmadığını bildirmişlerdir. Nematodların konukçu bulma stratejilerinde farklı yollar kullanmaları bu durumun olası nedenlerinden birisi olabilir. *S. carpocapsae* türü aktif olarak hareket eden konukçuları enfekte etmeye uygun otur-bekle "ambusher" tipinde bir avlanma stratejisine sahiptir (Koppenhöfer ve Kaya, 1996). Bu tür kuyruğu üzerinde kalkıp etrafını algılama (nictation) ve sıçrama yeteneğine de sahip olduğundan çevredeki hareketli konukçulara kolayca ulaşabilmektedir

(Campbell vd., 2003; Georgis vd., 2006; Griffin vd., 2005). *S. carpocapsae*'nin virulansındaki yüksekliğin bir başka nedeni ise bu türün toprak profili içerisinde yüzeye yakın bölgede yerleşmesi ve burada bulunan konukçuları enfekte etmesi olabilir (Campbell vd., 1996). Çünkü *S. exigua* larvaları spor sahalarında, golf alanlarında, parklarda vb. yerlerde yüzey örtüsü olarak kullanılan otsu bitki ve çimlerin hemen altında bulunmaktadır. Gündüzleri burada saklanan larvalar gece havanın kararmasıyla birlikte yüzeye çıkıp yeşil aksamla beslenmektedir (Capinera, 2008). Sarıgermede'ki otel bahçesinden izole edilen *Heterorhabditis* sp.'nin çim alan denemelerinde *S. exigua* larvalarını %29 gibi düşük oranda öldürmesi bu türün "cruiser" olarak adlandırılan konukçu arama davranışıyla ilişkili olabilir. Çünkü *Heterorhabditis* türleri toprağın iç kısımlarına yerleşen ve fazla hareketli olmayan larvaları bulmaya adapte olmuşlardır (Georgis vd., 2006). Bu nedenle kullanılan *Heterorhabditis* sp. toprağın yüzey kısmında yerleşen *S. exigua* larvalarını *S. carpocapsae* kadar etkin şekilde bulup enfekte edememiş olabilir. *Heterorhabditis* sp.'nin otel bahçesindeki alanda doğal olarak bulunmasına rağmen, yukarıda saydığımız nedenlerden dolayı *S. exigua* larvalarını baskı altına alamadığı ve bölgedeki zararlı popülasyonunun bu yüzden çok fazla olduğunu düşünmek oldukça mantıklı görünmektedir.

Entomopatojenik nematodlar (*Steinernema* spp. ve *Heterorhabditis* spp.) geniş bir konukçu dağılımları olan ve bilinen püskürtme yöntemleriyle kolayca uygulanabilen organizmalardır. Bu nedenle çayırılık alanlarda ve meralardaki zararlıların mücadelesinde oldukça uygundur (Klein vd., 2007). *S. exigua* ile aynı familyadan olan *A. ipsilon* tüm dünyada golf sahalarında ve yeşil alanlarda sürekli problem olan bir türdür. Amerika Birleşik Devletlerinde pek çok organik fosforlar ve sentetik piretroidler, carbaryl ve biyolojik pestisit Halofenozid ve Spinosad bu zararlının kontrolünde kullanılmaktadır. Diğer ülkelerde ise bu zararlıya karşı kullanılan kimyasallar ülkelere göre değişiklik göstermektedir (Georgis vd., 2006). Bununla beraber halk sağlığı, böceklerin direnç geliştirmesi, hedef olmayan canlılar üzerine olumsuz etkiler ve pestisitlerin biyolojik bozulmayı artırması kimyasal kullanımından alternatif mücadele yöntemlerine geçilmesi yönündeki baskıyı artırmıştır (Buhler ve Gibb, 1994). Çalışma sonucunda elde edilen veriler denemelerde kullandığımız *S. carpocapsae* türünün *S. exigua* larvalarıyla mücadelede önemli bir potansiyel taşıdığını göstermiştir. Büyük ölçekli alan uygulamalarıyla yapılacak testlerin ardından *S. carpocapsae* türü

entomopatojenik nematodlar *S. exigua* larvalarına karşı biyolojik mücadele organizmaları olarak kullanılabilir.

5.3. Entomopatojenik nematod kültürlerinin muhafaza edilmesinde kullanılan hücre kültür kaplarına alternatif yeni bir saklama kabı

Özellikle nematodlarla çalışmaya yeni başlayan ve yeterli donanımı bulunmayan laboratuvarlarda, izole edilen infektif juvenillerin saklanması büyük bir sorundur. Doku kültür kabı bulunmayan yerlerde cam beher veya erlenler içerisinde tutulmaya çalışılan nematodlar ise kısa süre içerisinde canlılıklarını yitirmektedirler. Bazen büyük bir bölge hatta ülke çapında gerçekleştirilen izolasyon çalışmalarında elde edilen çok sayıda nematod izolatlarının ayrı ayrı saklanması için büyük miktarlarda doku kültür kabına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu da bilim insanlarına büyük bir ekonomik yük getirmektedir.

Entomopatojenik nematodlar bilimsel çalışmalarda kullanılmak üzere dünyadaki pek çok laboratuvarında içerisinde steril distile su bulunan farklı boyutlardaki doku kültür kaplarında 5-15 °C arasındaki inkübatörlerde stok kültürler şeklinde saklanmaktadır (Kaya ve Stock, 1997).

Farklı ortamlarda infektif juvenillerin canlılıklarını muhafaza ederek uzun süre saklanmaları üzerine yapılan çalışmalar daha çok kitle üretimi sonucu elde edilen nematodların formülasyonlarına yönelik olmuştur. Bunlar; 1) Nematodları aktif ve hareketli olarak depolayan sünger veya vermikülit yüzeyler. 2) Nematodların aktivitelerini azaltan ancak tamamen hareketsiz bırakmayan aljinat jel ortamlar veya sıvı konsantrasyonlar. 3) IJ'leri kısmen uyku haline sokarak metabolizmalarını yavaşlatan, içerisinde su içermeyen poliakrilamid jeller, pudra, granül ve suda çözünebilir granüller gibi formülasyonlardır (Bedding, 1984; Chen ve Glazer, 2005).

Bu tez çalışması sonunda elde edilen veriler ve yapılan istatistiksel değerlendirmeler Tetra pak yapılı meyve suyu kutularının entomopatojenik nematod kültürlerinin saklanmasında polistiren yapıdaki doku kültür kaplarına iyi bir alternatif olacağını göstermiştir.

Nematod kültürlerinin saklanması doku kültür kapları ile tetra pak yapılı meyve suyu kutularının karşılaştırıldığı bu çalışmada 10 ve 15 °C'lik sıcaklıklarda 11 ay süreyle tutulan infektif juvenillerdeki canlılık oranları her iki saklama kabı grubunda ortalama olarak %90'ın üzerinde bulunmuştur. 10°C'de meyve suyu kutularındaki infektif juvenillerin ortalama canlılık oranları %97, hücre kültür kapları için %95 olarak tespit edilmiştir. Meyve suyu kutusundaki infektif juvenillerin canlılıkları 11 ay boyunca giderek azalan bir eğilim gösterse de %93'ün altına hiç inmemiştir. Çalışmanın 15°C'de yürütülen kısmında da benzer şekilde infektif juvenillerin canlılıkları her iki saklama kabı grubunda birbirine yakın değerlerde ölçülmüştür. Hücre kültür kabındaki infektif juvenillerin canlılıklarında 9. aydan itibaren ani bir düşüş olmuştur. En düşük ortalama değer (%74,66) 11. ayda yapılan son kontrolde elde edilmiştir. Oysa meyve suyu kutularında canlılık oranı 11. ay sonunda %95 oranında bulunmuştur. Her iki sıcaklık derecesinde elde edilen toplam ortalama canlılık oranları birbirine çok yakın olmasına rağmen meyve suyu kutularındaki canlılık oranları hücre kültür kaplarındaki orana kıyasla istatistiksel olarak fazla bulunmuştur.

Hass vd. (2001), 25 ml çeşme suyu içerisinde 16000 infektif juvenil bulunan 9 cm'lik petri kapları içinde nematodların canlılık oranlarını belirlemişlerdir. Bu çalışmada Avrupa kıtasından izole edilmiş üç *Heterorhabditis* türüne (*H. megidis*, *H. downesi*, *H. bacteriophora*) ait 10 izolat 20°C'de 180 gün boyunca izlenmiştir. Kullanılan izolatların 7 tanesi 147 gün sonunda tamamen ölmüştür. Bununla beraber 180 günlük bu zaman diliminde *H. bacteriophora* HI izolatu %18,4, *H. downesi* S29 ve *H. megidis* UK211 izolatları ise %2-3 oranlarında canlılıklarını koruyabilmiştir. Test edilen izolatlar arasında infektif juvenil popülasyonun yarısının canlı olduğu oran (ST₅₀) en yüksek *H. bacteriophora* HI izolatından (98.8 gün) elde edilmiştir. Araştırmacılar infektif juvenillerin ölüm nedenlerinin açlık olduğunu ve bunu nematodların vücutlarındaki yağ rezervlerinin tükenmesi sonucu ortaya çıkan şeffaf görüntüden anladıklarını belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar infektif juvenillerin toprakta canlı kalabildikleri süreleri de incelemiş, en iyi sonucu yine *H. bacteriophora* HI izolatından elde edince, arada bir korelasyon kurmuş ve bir nematodun toprakta canlı kalma potansiyelini anlayıp en iyi olanı seçebilmek için çeşme suyundaki canlılık oranlarının ölçüt olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Çeşme suyu kullanılarak yürütülen bir başka çalışmada ise *H. megidis* türünün 8 izolatının hayatta kalma süreleri ve

aktivitelerindeki değişiklikler izlenmiştir. Deneyler, içerisinde 10 ml çeşme suyu ve 5000 infektif juvenil bulunan 5 cm'lik petri kapları kullanarak yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar 20°C'de 14 hafta boyunca takip edilen izolatların canlılık oranlarının ilk 5 hafta içerisinde % 80'nin, 10. haftada ise % 30'un altına indiğini göstermiştir. Sadece bir izolatın (EU17) canlılık oranının 5. haftada %90, 10. haftada %70 olduğu rapor edilmiştir (Fitters ve Griffin, 2006). Bu araştırmacılar da Hass vd. (2001)'de olduğu gibi zamanla infektif juvenillerin vücudunun transparent hale dönüştüğünü ve bunun yağ rezervlerindeki tükenmeyi gösterdiğini belirtmişlerdir. Burada ilk neden olarak gösterilen açlığın dışında nematodların boy uzunluklarının da hayatta kalmada etkili olabileceği öne sürülmüştür. Farklı boy uzunluğuna sahip olan nematodlar arasında uzun olanların daha fazla yağ depolayabildikleri için kısa olanlara göre daha uzun süre canlı kalabildikleri belirtilmiştir. Soğuk iklim şartlarında canlıların vücutlarına daha fazla yağ depoladıkları bilinmektedir. Hazir vd. (2001) yaptıkları çalışmada düşük sıcaklıkta üretilen *S. feltiae* infektif juvenillerinin yüksek sıcaklıktakilere oranla daha uzun olduklarını belirtmişlerdir. Atkinson (1980), canlıların vücudu büyüdükçe solunum hızlarının düştüğünü rapor etmiştir. Ancak Hass vd. (2001) yaptıkları çalışmada boy uzunluğu kısa olan *H. bacteriophora* (512-671 µm)'nin daha uzun boylu olan *H. megidis* (736-800 µm)'ten (Adams ve Nguyen, 2002) daha uzun süre canlı kaldığını rapor etmiştir. Fitters ve Griffin (2006) nematodların farklı temel metabolizma hızlarına sahip olduklarını ve depoladıkları yağ tüketim hızlarının da türler arasında hatta aynı türün farklı izolatları arasında dahi değişebileceğini öne sürmüşlerdir. Bir popülasyondaki bireyler arasında metabolizma hızının farklı olabileceğini ve bu nedenle bazı bireyler saklama kaplarında diğerlerine göre daha kısa sürede öldüğünü belirtmişlerdir. Sıcaklığın metabolizma hızı üzerinde etkili bir faktör olduğu da bilinmektedir. Hass vd. (2001) ve Fitters ve Griffin (2006)'nin bulguları bu çalışmada elde edilen bulgularla karşılaştırıldığında infektif juvenillerin hayatta kalma süreleri arasında büyük fark olduğu görülmektedir. Bunun olası nedenleri bu araştırmacıların; 1) saklama kabı olarak hücre kültür kapları yerine petri kaplarını kullanmış olması, 2) steril distile su yerine çeşme suyu kullanılmış olması, 3) saklama sıcaklığı olarak yüksek bir sıcaklık olan 20°C 'nin kullanılmış olması 4) kullanılan tür ve/veya izolatların farklı olması sayılabilir (Fitters ve Griffin, 2004, 2006).

Başka bir çalışmada Strauch vd. (2000), 600 ml'lik doku kültür kapları içerisine 20000 infektif juvenil/ ml konsantrasyonlu olacak şekilde toplam 25 ml Ringer's solüsyonu eklemiştir. İki farklı *Heterorhabditis* türünün (*H. bacteriophora* ve *Heterorhabditis indica*) bu ortamdaki canlılıklarını 7 farklı sıcaklık derecesinde (5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 25°C) 150 gün süreyle takip etmiştir. *H. indica*'nın canlılığını en uzun süre (125 gün) 15°C'de muhafaza ettiği, 5°C'de ise kısa sürede (25 günde) öldüğü gözlenmiştir. Yüz yirmisekiz gün sonunda ise tüm *H. indica* infektif juvenilleri ölmüştür. Bu çalışmada kullanılan *H. bacteriophora*'nın 7.5°C'de en yüksek canlılık oranına sahip olduğu ve 125 gün sonra bile bireylerin %80'ninin canlı olduğu gözlenmiştir. Ancak 25°C'deki *H. bacteriophora* kültürü kısa sürede (50 gün) canlılığını kaybetmiştir. 10°C'de *H. bacteriophora* türünün infektif juvenillerinin canlılıkları 125 gün boyunca sürekli bir azalma göstermiştir. Ancak bu süre sonunda %40'ın altına inmemiştir. 15°C'de ise 80. güne kadar %70 civarındaki canlılıkları daha sonra hızla azalmaya başlamıştır. 125 günde canlılık oranı %20'ye düşmüştür. Bu çalışmada kullanılan *H. bacteriophora* türüne ait 10 ve 15°C'lerdeki sonuçları kendi bulgularımızla karşılaştırdığımızda infektif juvenillerin canlılık oranlarının daha düşük olduğu görülmektedir. Çünkü doku kültür kaplarıyla yapılan bu çalışmadaki 125 gün sonucuna göre 10°C'de %98, 15°C'de ise %97 oranında canlılık tespit edilmiştir. İki çalışma arasındaki farkın muhtemel nedenleri bu çalışmada steril distile su kullanılmış olması; Strauch'un ise içerisinde tuz ihtiva eden Ringer's solüsyonu kullanmış olması ve bu çalışmada kullanılan nematod konsantrasyonunun 2000 IJs/ml olmasına rağmen diğer araştırmacıların bunun 10 katı yoğunlukta nematod konsantrasyonu kullanmasından kaynaklanmış olabilir.

Koppenhöfer ve Kaya (1999) 75 ml'lik hücre kültür kaplarında 15 ml 1000 IJs/ml'lik konsantrasyonlar halinde depolanan *Steinernema rarum* infektif juvenillerini 4 farklı sıcaklık derecesinde (5, 10, 15 ve 25°C) 24 hafta boyunca nematodların canlılıkları ve infektivitelerindeki değişimleri izlemişlerdir. Çalışma sonunda sıcaklığın nematodların canlılığı üzerinde ciddi olarak etkisi olduğunu 25°C'de tutulan nematodların 16. haftadan itibaren çok hızlı şekilde ölmeye başladığını ve 24. haftada canlılık oranının %50'nin altına düştüğünü belirtmişlerdir. 5°C'de ise canlılık 2. haftadan itibaren önemli ölçüde azalmaya başlamıştır. *S. rarum* için en uygun saklama derecesinin 15°C olduğu ve 6 aylık süre boyunca nematodların canlılığında hiçbir azalma görülmediği vurgulanmıştır.

Bu sıcaklık derecesinde 18 ay saklanan infektif juvenillerin %95'ten fazlasının canlılığını sürdürdüğü ve infektivitelerinin devam ettirdikleri belirtilmiştir. 10°C'de saklanan nematodların ise 6. haftaya kadar canlılıklarında bir azalma görülmediği ancak bu haftadan itibaren bir düşüşün başladığı belirtilmiştir. Çalışmalarında kullandıkları türün farklı olmasına rağmen bu araştırmacıların ulaştığı sonuçlar bu çalışmada elde edilen sonuçlara benzemektedir. *H. bacteriophora* türü ile yaptığımız çalışmada 6 ay sonucunda elde ettiğimiz bulgular hem 10 hem de 15 °C için nematodların %95'in üzerinde canlılıklarını sürdürdüğü yönündedir.

Boff vd. (2000) hücre kültür kaplarını kullanarak yaptığı çalışmada *H. megidis* türünün 70 gün boyunca canlılık oranlarına, infektivitelerine, üreme kapasitelerine, kadavradan çıkış sürelerine ve yeni nesil infektif juvenillerin boy uzunluklarına bakmıştır. Çeşme suyu içerisinde 4500 IJ/ml konsantrasyona sahip 30ml'lik süspansiyonlar halinde sakladığı infektif juvenilleri dört farklı sıcaklık derecesinde (5, 10, 15, 20°C) 10 hafta takip etmiştir. Zaman geçtikçe düşük (5°C) ve yüksek (20°C) sıcaklıklardaki süspansiyonlarda bulunan canlı nematod sayısının, infektivitenin ve üreme kapasitesinin azaldığı gözlenmiştir. 10 ve 15°C'de 10 hafta sonunda infektif juvenillerin %90'ın üzerinde canlılıklarını koruduğu tespit edilmiştir. Ancak 5 ve 20°C'de birinci haftadan itibaren nematodların canlılıklarında azalma başlamıştır. Sonuç olarak *H. megidis* için en iyi saklama sıcaklığının 10 ve 15°C'ler olduğunu ileri sürmüşlerdir. Selvan vd. (1993), *Heterorhabditis* kültürlerinin saklama sırasında canlılıklarının çabuk kaybetmelerinin metabolizmalarında daha yüksek oranda bulunan doymamış yağ asitlerinden kaynaklandığını ileri sürmüştür. Bununla beraber otur-bekle stratejisini kullanan türlerin (*S. carpocapsae*, *S. rarum* vb.) konukçusunu aktif arayan türlere göre (*H. bacteriophora*) daha uzun canlı kalabildikleri belirtilmiştir. Gaugler ve Campbell (1991) ise *H. bacteriophora* infektif juvenillerinin aktif olarak konukçu araması nedeniyle *S. carpocapsae*'ye göre daha fazla enerji harcadığını belirtmiştir. Yürütülen bu çalışmada nematodların vücutlarının genel görüntüsünün zaman içerisinde şeffaflaştığı fark edilmiştir. Uygun sıcaklık derecesi ve yeterli oksijen içeren su ortamında saklanan nematodların ölüm sebebi enerji rezervlerinin tükenmesinden kaynaklanan açlık olduğu, özellikle vücutlarında depoladıkları yağların tükenmesi sonucu suda bekletilen infektif

juvenillerin ölmeden önce oldukça şeffaf hale geldiği bilinmektedir (Koppenhöfer ve Kaya, 1999).

Fitters ve Griffin (2004) *H. megidis*'in 3 izolatının 20°C'de saklanması esnasında aktiviteledeki, infektiviteledeki, enerji rezervledeki ve canlılıklarındaki değişiklikleri 10 hafta süresince gözlemlemiştir. İkinci haftadan itibaren izolatların infektivitelelerinin kademeli biçimde azaldığını bildirmiştir. Araştırmacılar lipit, karbonhidrat (özellikle glikojen) ve proteinlerin infektif evreye geçmeden vücutta biriktirildiği ve bekleme esnasında enerji kaynağı olarak kullanıldığını belirtmiştir. Özellikle lipitlerin ana enerji kaynağı olup infektif juvenilin vücut ağırlığının %32-49'unu meydana getirdiğini, lipitler tükendiğinde aktivite ve infektivitenin düştüğünü tespit etmiştir.

Bu çalışmada 10 ve 15°C'de tutulan infektif juvenillerin zaman içerisindeki larvaları öldürme oranlarındaki değişimlere bakıldığında, 10°C'de hem meyve suyu kutularında hem de hücre kültür kaplarında bekletilen infektif juveniller için infektivitede belirgin bir azalma gözlenmemiştir. Her ikisi içinde 11 ay sonunda ortalama infektivite oranları %98 olarak tespit edilmiştir. 15°C'de yürütülen çalışmalarda meyve suyu kutusundaki nematodların infektivitelelerinde 11 ay boyunca %90'dan daha aşağı bir infektivite gözlenmezken; hücre kültür kaplarındaki infektif juvenillerin infektiviteleleri 10 ay boyunca %90'ın üzerinde seyretmiş, ancak 11. ayda hızlı bir düşüşle %76'ya gerilemiştir.

Boff vd. (2000) tarafından 10 hafta boyunca yürütülen çalışmada en yüksek infektivite değerleri (%80'den fazla) 5, 10 ve 15°C'de ortaya çıkmıştır. 20 ve 25°C'lerde ise infektivitenin 6. haftadan itibaren hızla düştüğü belirtilmiştir. Benzer bir çalışmayı Griffin (1996) *Tenebrio molitor* larvaları kullanarak Kuzey Batı Avrupa'dan izole edilen *Heterorhabditis* sp. UK211 izolatı ile yapmıştır. İzolatın iki farklı sıcaklık derecesinde patojenitesindeki değişimi takip etmiştir. 20°C'de 5 hafta, 9°C'de 15 hafta boyunca saklanan kültürlerin infektiviteleleri haftalık olarak kontrol edilmiştir. Çalışmanın hemen başında enfekte edilen *T. molitor* larvalarının ölüm oranlarının düşük olduğu ancak 9°C grubunda infektif juvenillerin infektivitelelerine bağlı olarak larva ölümlerinin 15. haftaya kadar kademeli olarak arttığını bildirmiştir. 20°C'de ise ölü larva oranlarının 1-5. haftalar arasında birbirine yakın değerlerde seyrettiği, daha sonra düşüşe geçtiğini bildirmiştir. Bu durum düşük sıcaklıklarda metabolizma hızı yavaşladığından

enerji rezervleri daha fazla olan infektif juvenillerin konukçularını enfekte etmede daha başarılı oldukları yönünde açıklanmaktadır (Wright vd., 1999; Fitters ve Griffin, 2006).

Larva içerisine giren nematod sayılarına bakıldığında bu çalışmada elde edilen sonuçlar düzenli bir yükselme ya da azalma göstermemiş, zamanla değişen dalgalanmalar meydana gelmiştir. Başka *Steinernema* ve *Heterorhabditis* türleriyle çalışma yapan araştırmacılar da benzer şekilde grafikler elde etmişlerdir (Fan ve Hominick, 1991; Griffin, 1996). Koppenhöfer ve Kaya (1999) yaptıkları çalışmada *S. rarum*'un infektivitesinin zaman içerisinde U-eğrisi şeklinde veya dalgalı bir model sergilediğini belirtmişlerdir. Griffin (1996) bu durumu art arda gelen iki süreçle açıklamaya çalışan bir hipotez ileri sürmüştür. Bunlar, belirli bir ısı aralığında meydana gelen olgunlaşma süreci ve soğukun etkisiyle geçici olarak infektivitede azalma ve daha sonra tekrar normale dönme olarak açıklanmıştır. Ancak Koppenhöfer ve Kaya (1999) öne sürülen “olgunlaşma” fikrini desteklememiştir. Çünkü başlangıçtaki infektivite ile en yüksek seviye arasındaki farkın istatistiksel olarak önem taşımadığını belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar Griffin (2006) tarafından öne sürülen hipotezdeki ikinci fikri yani soğukun etkisiyle geçici olarak infektivitede azalma olabileceği yönündeki açıklamayı desteklemişlerdir. Bizim elde ettiğimiz sonuçlar da Koppenhöfer ve Kaya (1999) da olduğu gibi “olgunlaşma“ fikrini desteklememektedir.

Sonuç olarak iki farklı nematod saklama kabı karşılaştırıldığında, meyve suyu kutularında bulunan infektif juvenillerin canlılık oranlarının hücre kültür kaplarına oranla daha fazla olduğu belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre aradaki bu farkın önemli olduğu belirlenmiştir. Bir başka veri olan larva ölüm oranlarına bakıldığında ise her iki saklama kabından elde edilen değerlerin aynı olduğu ve dolayısıyla aralarında istatistiksel bir farkın da olmadığı belirlenmiştir. Son olarak larva içerisine giren nematod sayıları kıyaslandığında, aralarında istatistiksel bir fark olmamasına rağmen, yine meyve suyu kutularında muhafaza edilen infektif juvenillerin oransal olarak daha fazla sayıda larva içerisine giriş yaptığı görülmüştür. Meyve suyu kutularının, hücre kültür kaplarına oranla daha iyi bir saklama kabı özelliği gösterdiği belirlenmiştir. Hemen her ülkede kolayca bulunabilecek bu meyve suyu kutularının nematodların muhafaza edilmesinde araştırmacılara büyük kolaylıklar sağlayacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Adams, B. J., Fodor, A., Koppenhöfer, H. S., Stackebrandt, E., Stock, S. P., Klein, M. G. 2006. Reprint of "Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens" [Biol. Control 37 (2006) 32-49]. **Biological Control**. 38, 4-21.
- Adams, B. J. and Nguyen, K. B. 2002. Taxonomy and systematic. In: Entomopathogenic Nematology (Gaugler, R. eds.), CABI Publishing, pp 1-33. Wallingford, UK.
- Akhurst, R. J. 1982. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. **J. Gen. Microbiol.** 128:3061-3065.
- Akhurst, R. J. ve Smith, K. 2002. Regulation and safety. In: Entomopathogenic Nematology (Gaugler, R. eds.), CABI Publishing, pp. 311-332. Wallingford, UK.
- Alekseev, E., Glazer, I. and Samish, M. 2006 Effect of soil texture and moisture on the activity of entomopathogenic nematodes against female *Boophilus annulatus* ticks. **BioControl**. 51:507-518.
- Anonim, 2008. Zirai Mücadele Teknik Talimatları Cilt I. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü. 273 p. Ankara.
- Atkinson, H. J. 1980. Respiration in nematodes. In: Nematodes as biological models, Vol. 2 (Zucherman B. M. eds.), Academic Press. pp. 101-142. New York.
- Başbülbul, G. 2009. Çeşitli Doğal Kaynaklardan İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Ürettikleri Bakteriyosinlerin Karakterizasyonu ve Saflaştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi. 206s. Aydın.
- Baur, M.E., Kaya, H.K., Strong, D.R., 1998. Foraging ants as scavengers on entomopathogenic nematode-killed insects. **Biological Control** 12: 231-236.
- Bedding, R. A. 1984. Large scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes *Neoplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. **Ann. Appl. Biol.** 104: 117-120.
- Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey J. R., Liu L. X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J. R., Mackey, L. Y., Dorris, M., Frisse, L. M., Vida, J. T., and

- Thomas, W. K. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature**, 392: 71-75.
- Bode, H. B., Brachmann, A. O., Joyce, Jenke-Kodama H., Schwär G. and Clarke D. J. 2007. A Type II polyketide synthase is responsible for anthraquinone biosynthesis in *Photorhabdus luminescens*. **ChemBioChem**. 0000, 00, 1-9.
- Bode H. B. 2009. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. **Current Opinion in Chemical Biology**. 13: 224-230.
- Boemare, N. E., Givaudan, A., Brehélin, M. and Laumond, C. 1997. Symbiosis and pathogenicity of nematode-bacterium complexes. **Symbiosis** 22: 21-45.
- Boemare, N. 2002 Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: Entomopathogenic Nematology, (Gaugler, R. eds.), CABI Publishing, pp. 35-56. Wallingford, UK.
- Boemare, N. and Akhurst, R., 2006. The Genera *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: The Prokaryotes (Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K-H., Stackebrandt E. eds.). Springer Science+Business Media, Inc. 6: 451-494. New York.
- Boff, M. I. C., Wieggers, G. L. and Smith, P. H. 2000. Effect of storage time and temperature on infectivity, reproduction and development of *Heterorhadtis megidis* in *Galleria mellonella*. **Nematology**. 2: 635-644.
- Brown, I. M. and Gaugler, R. 1997. Temperature and humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematodes. **Nematologica**. 43: 363-375.
- Buhler, W. G. and Gibb, T. J. 1994. Persistence of *Steinernema carpocapsae* and *S. glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) as measured by their control of Black Cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in bentgrass. **Journal of Economic Entomology**. 87: 638-642.
- Campbell, J. F., Lewis, E. E., Yoder, F. and Gaugler, R. 1996. Spatial and temporal distribution of entomopathogenic nematodes in turf. **Parasitology**. 113: 473-482.
- Campbell, J. F. and Gaugler, R. 1997. Inter-specific variation in entomopathogenic nematode foraging strategy: Dichotomy or variation along a continuum? **Fundam. Appl. Nematol**. 20: 393-398.
- Campbell, J. F., Lewis, E. E., Stock, S. P., Nadler, S. and Kaya, H. K. 2003. Evolution of host search strategies in entomopathogenic nematodes. **Journal of Nematology**. 35: 142-145.

- Capinera, J. L., Pelissier, Menout, G. S. and Epsky, N. D. 1988. Control of Black Cutworm, *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae) with entomogenous nematodes (Nematoda: Steinernematidae, Heterorhabditidae). **Journal of Invertebrate Pathology**. 52: 427-435.
- Capinera, J. L. 2008. Beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). In: Encyclopedia of Entomology (Capinera, J. L. ed.), 1: 434-437.
- Chen, S. and Glazer, I. 2005. A novel method for long-term storage of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* at room temperature. **Biological Control**. 32: 104-110.
- Ciche, T. A., Darby, C., Ehlers, R-U., Forst, S., Goodrich-Blair, H. 2006. Dangerous liaisons: The symbiosis of entomopathogenic nematodes and bacteria. **Biological Control** 38: 22-46.
- Clarke, D. J., and Eberl, L. 2006. Interactions between bacteria and nematodes. In: Intestinal microorganisms of soil invertebrates, Soil biology (König H., Varma A. eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 6: 55-64. Germany.
- Dowds, B. C. A. and Peters, A. 2002. Virulence mechanisms. In: Entomopathogenic Nematology (Gaugler, R. ed.), CABI Publishing, pp. 79-98. Wallingford, UK.
- Ehlers, R-U., Wulff A. and Peters, A. 1997. Pathogenicity of axenic *Steinernema feltiae*, *Xenorhabdus bovienii* and the bacto-helminthic complex to larvae of *Tipula oleacea* (Diptera) and *Galleria mellonella* (Lepidoptera). **Journal of Invertebrate Pathology**. 69: 212-217.
- Eidt, D. C. and Thurston, G. S. 1995. Physical deterrents to infection by entomopathogenic nematodes in wireworm (Coleoptera: Elateridae) and other soil insects. **The Canadian Entomologist**. 127: 423-429.
- Fan, X. and Hominick, W. R. 1991. Effects of low storage temperature on survival and infectivity of two *Steinernema* species (Nematoda: Steinernematidae). **Rev. Nematol.** 14. 407-412.
- Ffrench-Constant, R. H., Dowling, A. and Waterfield, N. R. 2007. Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture. **Toxicon**. 49: 436-451.
- Fitters, P. F. L. and Griffin, C. T. 2004. Spontaneous and induced activity of *Heterorhabditis megidis* infective juveniles during storage. **Nematology**. 6: 911-917.

- Fitters, P. F. L. and Griffin, C. T. 2006. Survival, starvation, and activity in *Heterorhabditis megidis* (Nematoda: Heterorhabditidae). **Biological Control** 37: 82–88.
- Foltan, P., Puza, V. 2009. To complete their life cycle, pathogenic nematode-bacteria complexes deter scavengers from feeding on their host cadaver. **Behavioural Processes**. 80, 76-79.
- Forst, S, Dowds, B, Boemare, N. E, Stackebrandt, E. 1997 *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. **Annu Rev Microbiol**, 51: 47-72.
- Forst, S., Clarke, D., 2002. Bacteria–nematodes symbiosis. In: Entomopathogenic Nematology (Gaugler, R. eds.), CABI Publishing, pp. 57–77. Wallingford, UK.
- Francino, M. P., Santos, S. R. and Ochman, H. 2006. Phylogenetic Relationships of Bacteria with Special Reference to Endosymbionts and Enteric Species. In: The Prokaryotes (Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K-H., Stackebrandt, E. eds.). Springer Science+Business Media, Inc. 6: 41–59. New York.
- Gaugler, R. and Boush, M.G. 1978. Effects of ultraviolet radiation and sunlight on the Entomogenous Nematode, *Neoplectana carpocapsae*. Journal of invertebrate pathology. 32: 291-296.
- Gaugler, R., and Kaya, H. K. 1990. Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- Gaugler, R., Wang, Y. and Campbell, J. F. 1994. Aggressive and evasive behaviors in *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae: Defenses against entomopathogenic nematode attack. **J. Inverteb. Pathol.** 64: 193-199.
- Gaugler, R., Campbell, J.F., 1991. Selection for enhanced host-Wnding of scarab larvae (Coleoptera: Scarabaeidae) in an entomopathogenic nematode. **Environ. Entomol.** 20:700–706.
- Georgis, R., 1990. Formulation and application technology. In: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control (Gaugler R. and Kaya H. K. eds.), CRC Press, Boca Raton. pp. 173–194.
- 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. Succes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. **Biological Control**. 38: 103-123.

- Gerrard, J., Waterfield N., Vohra, R. and French-Constant R. 2004. Human infection with *Photorhabdus asymbiotica*: an emerging bacterial pathogen. **Microbes and Infection** 6: 229–237.
- Gilmore, S. K. and Potter, D. A. 1993. Potential role of collembola as biotic mortality agents for entomopathogenic nematodes. **Pedobiologia**. 37: 30-38.
- Glazer, I. 2002. Survival biology. In: Entomopathogenic Nematology (Gaugler, R. ed.). CABI Publishing, pp. 169-187. Wallingford, UK.
- Gouge, D. H. 2005. Applications for social insect control. In: Nematodes as Biocontrol Agents: (Grewal P. S., Ehlers R-U. and Shapiro-Ilan D. I. eds.). Pp. 317-329. CABI Publishing. Wallingford. UK.
- Grewal, P.S., Selvan, S. and Gaugler, R. 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment, and reproduction. **J. Therm. Biol.** 19: 245-253.
- Grewal, P. S., Koppenhöfer, A. M. and Choo, H. Y. 2005. Lawn, Turfgrass and Pasture Applications. In: Nematodes as Biocontrol Agents (Grewal P. S., Ehlers R-U., Shapiro-Ian D. I. ed.). CABI International. pp 115-146. Wallingford, UK.
- Griffin, C. T. 1996. Effects of prior storage conditions on the infectivity of *Heterorhabditis* sp. (Nematoda: Heterorhabditidae). **Fundamental and Applied Nematology**. 19: 95-102.
- Griffin, C. T., Boemare, N. E., and Lewis, E. E. 2005. Biology and Behaviour. In: Nematodes as Biocontrol Agents (Grewal P. S., Ehlers R-U., Shapiro-Ian D. I. eds.) CABI International. pp 47-64. Wallingford, UK.
- Güngör, D. Ş., Keskin, N., Hazır, S. 2006. Ecological characterization of *Steinernema anatoliense* (Rhabditidae: Steinernematidae). **Journal of Invertebrate Pathology**. 92: 39-44.
- Hass, B., Downes, M. J. and Griffin, C. T. 2001. Correlation between survival in water and persistence of infectivity in soil of *Heterorhabditis* spp. isolates. **Nematology**. 3: 573-579.
- Hancock, R. E. W. and Diamond, G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. **Trends in Microbiology**. 8: 402-410.
- Hazır, S., Stock, S. P., Kaya, H. K., Koppenhofer, A. M and 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., Kaya, H. K., Stock, S. P., Keskin, N. 2003. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. **Turk J Biol.** 27: 181-202.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Anthraquinone>

<http://tr.wikipedia.org/wiki/Polistiren> [Erişim tarihi:19.01.2010]

http://tr.wikipedia.org/wiki/Tetra_Pak_Paketleme_Sanayi_ve_Ticaret_A.Ş.
[04.01.2010]

<http://www.bd.com/> [Erişim tarihi: 23.01.2010]

<http://www.coleparmer.com> [Erişim tarihi: 19.01.2010]

<http://www.sigmaaldrich.com> [Erişim tarihi: 19.01.2010]

http://www.Tetra_pak.com/tr [Erişim tarihi: 04.01.2010]

Ishibashi, N., Young, F. Z., Nakashima, M., Abiru, C. and Haraguchi, N., 1987. Effects of application of DD-136 on silkworm, *Bombyx mori* predatory insect, *Agriosphodorus dohrni*, parasitoid, *Trichomalus apanteloctenus*, soil mites and other non-target soil arthropods with brief notes on feeding behaviour and predatory pressure of soil mites, tardigrates and predatory nematodes on DD-136 nematodes. In: Ishibashi N. (ed.) Recent Advances in Biological Control of Insect Pests by Entomogenous Nematodes in Japan. Ministry of Education, Japan, Grant No. 59860005, pp. 158-164. (In Japanese, English abstract).

Jack, R. W., Tagg, J. R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. **Microbiological Reviews**, 59: 171–200.

Jaworska, M. 1993. Laboratory infection of slugs (Gastropoda: Pulmonata) with entomopathogenic nematodes (Rhabditidae: Nematoda). **Journal of Invertebrate Pathology**. 61: 223-224.

Kaya, H. K. 1990. Soil Ecology. In: Entomopathogenic nematodes in biological control, (Gaugler R., Kaya H. K. eds.). pp. 93-115. CRC Press, Boca Raton, FL:

Kaya, H.K and Gaugler, R. 1993. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, 38: 181-206.

- Kaya, H. K. and Stock, S. P. 1997. Techniques in insect nematology. In: Manual of Techniques in Insect Pathology (Lacey L. ed.). Academic Press. pp. 281-324. San Diego, CA.
- Kaya, H. K., Koppenhöfer, A. M., and Johnson, M. 1998. Natural enemies of entomopathogenic nematodes. **Japanese Journal of Nematology**. 28: 13-21.
- Kaya, H. K. 2002. Natural enemies and other antagonists. In: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, pp. 189-202. Wallingford, UK.
- Kermarrec, A., Mauleon H., Sirjusingh C. and Baund L. 1991. Etude experimentale de la sensibilite de vertebres heterothermes tropicaux (crapauds, grenouilles, lezards) a diverse souches de nematodes entomoparasites des genres *Heterorhabditis* et *Steinernema*: Recontres Caraibes en Lutte Biologique. Les colloques INRA (Paris). 58: 193-204.
- Klein, M. G. 1990. Efficacy against soil-inhabiting insect pests. In: Entomopathogenic nematodes in biological control, (Gaugler R., Kaya H. K. eds.). CRC Press, Boca Raton, FL: 385 pp.
- Klein, M. G., Grewal, P. S., Jackson, T. A. and Koppenhöfer, A. M. 2007. Lawn, turf and grassland pests. In: Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Lacey, L. A. and Kaya, H. K., eds). Springer, pp 655-675. Germany.
- Koppenhöfer, A. M. and Kaya, H. K. 1996. Coexistence of entomopathogenic nematode species (Steinernematidae and Heterorhabditidae) with different foraging behavior. **Fundam. Appl. Nematol.** 19 (2): 175-183.
- Koppenhöfer, A. M. and 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.). pp. 283-301 Dordrecht, The Netherlands. Kluwer.
- Koppenhöfer, A. M. and Fuzy, E. M. 2003. Ecological characterization of *Steinernema scarabaei*: a natural pathogen of scarab larvae. **J. Invertebr. Pathol.** 83: 139-148.
- Koppenhöfer, A.M., 2007. Nematodes. In: Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Lacey, L. A. and Kaya, H. K., eds). Springer, pp 249-264. Germany.

- Kung, S-P., Gaugler R. and Kaya, H. K. 1990. Influence of soil pH and oxygen on persistence of *Steinernema spp.* **Journal of Nematology**. 22: 440-445.
- Kung, S-P., Gaugler, R. and Kaya, H. K. 1991. Effects of soil temperature, moisture and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. **Journal of Invertebrate Pathology**. 57: 242-249.
- Kuwata, R., Yoshiga, T., Yoshida, M. and Kondo, E. 2008. Mutualistic association of *Photorhabdus asymbiotica* with Japanese Heterorhabditid entomopathogenic nematodes. **Microbes and Infection** 10: 734-741.
- Lee, M-M., Sicard, M., Skeie, M., Stock S. P. 2009. *Steinernema boemarei n. sp.* (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from southern France. **Syst. Parasitol.** 72: 127-141.
- Lewis, E. E. 2002. Behavioural ecology. In: Entomopathogenic Nematology (Gaugler, R. ed.),. CABI Publishing, pp. 205-223. Wallingford, UK.
- Lewis, E. E., Campbell, J., Griffin, C., Kaya, H. K. and Peters, A. 2006. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control** 38: 66-79.
- Mohamed, M.A and Coppel, H.C., 1983. Mass Rearing of the Greater Wax Moth , *Galleria mellonella* (L.) (Lepitoptera:Pyralidae) for Small-Scale Laboratory Studies, **The Great Lakes Entomologist**, 16 (4): 139-142.
- Mauleon, H., Briand, S., Laumond, C., and Bonifassi, E. 1993. Utilisation d'enzyme digestives pour l'e 'tude du parasitisme des Steinernematidae et Heterorhabditidae envers les larves d'insectes. **Fundam. Appl. Nematol.** 16: 185-186.
- Mráček, Z., Becvar, S., Kindlmann, P., 1999. Survey of entomopathogenic nematodes from the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) in the Czech Republic. **Folia Parasitol.** 46: 145-148.
- Mráček, Z., Nguyen, K. B., Tailliez, P., Boemare, N., and Chen, S. 2006. *Steinernema sichuanense n. sp.* (Rhabditida, Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematode from the province of Sichuan, east Tibetan Mts., China. **Journal of Invertebrate Pathology**. 93: 157-169.
- Obendorf, D., Peel, B., Akhurst, R. and Miller, L. 1983. Non-susceptibility of mammals to the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophilus*. **Environmental Entomology**. 12: 368-370.

- Pankewitz, F. and Hilker, M. 2008. Polyketides in insects: ecological role of these widespread chemicals and evolutionary aspects of their biogenesis. **Biol. Rev.** 83: 209–226.
- Parkman, J. P. and Smart, G. C. Jr. 1996. Entomopathogenic nematodes, a case study: introduction of *S. scapterisci* in Florida. **Biocontrol Science and Technology**. 6: 423-429.
- Peters, A. 1996. The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations. **Biocontrol Science and Technology**. 6: 389-402.
- Peters, A., Gouge, D. H., Ehlers, R-U. and Hauge, N. G. M. 1997. Avoidance of encapsulation by *Heterorhabditis* spp. infecting larvae of *Tipula oleracea*. **J. Inverteb. Pathol.** 70: 161-164.
- Poinar, G. O., Jr. 1979. Nematodes for Biological Control of Insects. CRC Press Inc, Boca Raton, FL. 277p.
- Poinar, G. O. Jr., Thomas, G. M., Presser, S. B. and Hardly, J. L. 1982. Inoculation of entomogenous nematode, *Neoplectana* and *Heterorhabditis* and their associated bacteria, *Xenorhabdus* spp. into chicks and mice. **Environ. Entomol.** 11: 137-138.
- Poinar, G. O. 1989. Non-insect hosts for the entomogenous rhabditoid nematodes *Neoplectana* (Steinernematidae) and *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae). **Revue de Nematologie**. 12: 423-428.
- Poinar, G. O., Jr. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control (Gaugler R. and Kaya H. K. eds.). Pp. 23-61. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Poinar, G. O., Jr. 1993. Origins and phylogenetic relationship of the entomopathogenic rhabditids, *Heterorhabditis* and *Steinernema*. **Fundamental and Applied Nematology**. 16: 333-338
- Rosa, J. S. and Simoes, N. 2004. Evaluation of twenty-eight strains of *Heterorhabditis bacteriophora* isolated in Azores for biocontrol of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**. 29: 409-417.
- Schultz, T. R. 2000. In search of ant ancestors. Proceedings of the National Academy of Sciences. 97: 14028-14029.
- Selvan, S., Gaugler, R. and Lewis, E. E. 1993. Biochemical energy reserves of entomopathogenic nematodes. **J. Parasitol.** 79. 510-516.

- Shapiro-Ilan, D. I., Gouge, D. H. and Koppenhöfer, A. M. 2002. Factors affecting commercial success: Case studies in cotton, turf and citrus. In: Entomopathogenic Nematology (Gaugler, R. ed.), CABI Publishing, pp. 333-355. Wallingford, UK.
- Sharma, S., Waterfield, N., Bowen, D., Thomas, R., Holland, L., James, R., French-Constant, R. 2002. The lumicins: novel bacteriocins from *Photorhabdus luminescens* with similarity to the uropathogenic-specific protein (USP) from uropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**. 214: 241-249.
- Simoës, N. and Rosa, J. S. 1996. Pathogenicity and host specificity of entomopathogenic nematodes. **Biocontrol Science and Technology**. 6: 403-411.
- Singleton, P. 1999. Bacteria in the living world. In: Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine (Singleton, P. ed.). John Wiley & Sons Ltd. pp 215-231. England.
- Strauch, O. Niemann, I., Neumann, A., Schmidt, A. J., Peters, A. and Ehlers, R-U. 2000. Storage and formulation of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis indica* and *H. bacteriophora*. **BioControl** 45: 483-500.
- SPSS 2004. SPSS v.13.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA
- Stuart, R. J., Barbercheck, M. E., Grewal, P. S., Taylor, R. A. J. and Casey, W. H. 2006. Population biology of entomopathogenic nematodes: Concepts, issues and models. **Biological Control**. 38: 80-102.
- Stock, S.P., Griffin, C. T., and Chaerani, R. 2004. Morphological and molecular characterisation of *Steinernema hermaphroditum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Indonesia, and its phylogenetic relationships with other members of the genus. **Nematology** 6: 401-412.
- Stock, S. P. and Hunt D. J. 2005. Morphology and systematic of nematodes used in biocontrol. In: Nematodes as Biocontrol Agents. (Grewal P. S., Ehlers R-U., Shapiro-Ian D. I. eds.). CABI Publishing. pp 3-43. Wallingford, UK.
- Stock, S. P., Rivera-Orduño, B., and Flores-Lara, Y. 2009. *Heterorhabditis sonorensis* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae), a natural pathogen of the seasonal cicada *Diceroprocta ornea* (Walker) (Homoptera: Cicadidae) in the Sonoran desert. **Journal of Invertebrate Pathology**. 100: 175-184.
- Tagg, J. R., Dajani, A. S., Wannamaker, L. W. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Bacteriol. Rev.** 40: 722-756.

- Thaler, J-O, Baghdiguian, S. and Boemare, N. 1995. Purification and characterization of Xenorhabdicolin, a phage tail-like bacteriocin, from the lysogenic strain F1 of *Xenorhabdus nematophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 2049-2052.
- Uribe-Lorio, L., Mora, M., and Stock, S. P. 2007. *Steinernema costaricense n. sp.* and *S. puntauvense n. sp.* (Rhabditida: Steinernematidae), two new entomopathogenic nematodes from Costa Rica. **Syst Parasitol.** 68: 167–182.
- 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.
- Wang, Y., Campbell, J. F. and Gaugler, R. 1995. Infection of entomopathogenic nematodes *Steinernema glaseri* and *Heterorhabditis bacteriophora* against *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. **J. Inverteb. Pathol.** 66: 178-184.
- Webster, J. M., Chen, G., Hu, K. and Li, J. 2002. Bacterial metabolites. In: *Entomopathogenic Nematology* (Gaugler, R. ed.), CABI Publishing, pp. 99-114. Wallingford, UK.
- Wetchayunt, W., Rattanapan, A. and Phairiron, S. 2009. Temperature effect on novel entomopathogenic nematodes *Steinernema siamkayaii* Stock, Somsook and Reid (N. SP.) and its efficacy against *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). **61st International Symposium on Crop Protection.** (May 19, 2009) Pp: 203. Gent, Belgium.
- White, G. F., 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from culture. **Science**. 66: 302-303.
- Wolff, H. and Hansson, C. 2005. Rearing Larvae of *Lucilia sericata* for Chronic Ulcer Treatment – an Improved Method. **Acta Derm Venereol.** 85: 126–131.
- Wright, D. J., Patel, M. N., Mason, J. M. 1999. Survival of entomopathogenic nematodes in relation to commercial application. In: Glazer I., Richardson P., Boemare N., Coudert F. (eds.). *Survival of Entomopathogenic Nematodes*. European commission. Brussels. Pp. 43-54.
- Zhang, C., Liu, J., Xu M., Sun, J., Yang, S., An, X., Gao, G., Lin M., Lai R., He, Z., Wub Y., Zhang K. 2008. *Heterorhabditoides chongmingensis* gen. nov., sp. nov. (Rhabditida: Rhabditidae), a novel member of the entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology** 98: 153–168.

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 : Barış GÜLCÜ
Doğum Yeri ve Tarihi : Aydın, 12.06.1981

EĞİTİM DURUMU

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

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI

1) Karagoz, M., Gulcu, B., Cakmak, I., Kaya, H., Hazir, S. **2007** “ Predation of entomopathogenic nematodes by *Sancassania sp.* (Acari: Acaridae)”. **Experimental and Applied Acarology**. 43:85-95.

2) Gulcu B., Hazir S., Giblin Davis R. M., Ye W., Kanzaki N., Mergen H., Keskin N., Thomas K. W. **2008**. “Molecular variability of *Schistonchus caprifici* from *Ficus carica* in Turkey”. **Nematology**. 10 (5). 639-649.

3) Karagoz M., Gulcu B., Hazir C., Kaya H. K. and Hazir S. **2009**. Biological control potential of Turkish entomopathogenic nematodes against the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. **Phytoparasitica** 37: 153-159.

4) Karagoz M., Gulcu B., Hazir S. and Kaya H. K. **2009**. Laboratory evaluation of Turkish entomopathogenic nematodes for suppression of the chestnut pests, *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae) and *Cydia splendana* (Lepidoptera: Tortricidae). **Biocontrol Science and Technology**. 19 (7): 755-768.

-Poster sunumları

1) Mehmet Karagöz, Barış Gülcü ve Selçuk Hazır. “Manas Larvalarının (Coleoptera: Scarabaeidae) Biyolojik Mücadelesinde Entomopatojenik Nematodların Test edilmesi”. Entomopatojenler ve Mikrobiyal Mücadele Sempozyumu. 21-24 Haziran, **2007**. **TRABZON**.

2) Barış Gülcü, Mehmet Karagöz, Derya Aşıcı and Selçuk Hazır. “Biological Control Potential of Three Different Entomopathogenic Nematode Species Against Chestnut Fruit Pests, *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae) and *Cydia splendana* (Lepidoptera: Tortricidae). 2. Entomopatojenler ve Mikrobiyal Mücadele Sempozyumu. 24-27 Eylül, **2009**. Sarıgerme, **MUĞLA**.

b) Bildiriler

-Uluslar arası

1) Mehmet Karagöz, **Barış Gülcü**, Selçuk Hazır. “Evaluation of Entomopathogenic Nematodes for the Control of Chestnut Pests, *Curculio elephas* (Curculionidae: Coleoptera) and *Cydia splendana* (Totricidae: Lepidoptera)”. International Workshop on chestnut Management in Mediterranean Countries: Problems and Prospects. 23-25 Ekim **2007**. **Bursa**.

2) Mehmet Karagoz, Selcuk Hazir, Ibrahim Cakmak, **Baris Gulcu** and Harry Kaya. “Hunter to be hunted: Predator mites and entomopathogenic nematodes”. 41. Annual meeting of the Society for Invertebrate Pathology. 3-7 August, **2008**, **Warwick, UK**.

-Ulusal

1) **Barış Gülcü**, Selçuk Hazır, Nevin Keskin ve Hatice Mergen. “Aydın İli ve Çevresindeki İncir Polinatör Arıları (*Blastophaga psenes*) ile Taşınan Nematodların Araştırılması”. 26-30 Haziran **2006**. 18. Ulusal Biyoloji Kongresi bildiri kitabı Syf: 68, **Kuşadası. AYDIN**

2) Mehmet Karagöz, **Barış Gülcü**, Selçuk Hazır. “Kestane Meyve Zararlıları *Curculio elephas* (Col.: Curculionidae) ve *Cydia splendana* (Lep.: Tortricidae)’nın Mücadelesinde Entomopatojenik Nematodların

Etkinliğinin Belirlenmesi” II. Bitki Koruma Kongresi. 27-30 Ağustos, **2007**. Süleyman Demirel Üniversitesi, **Isparta**.

3) Barış Gülcü, Mehmet Karagöz, İbrahim Çakmak, Selçuk Hazır. “Tarımsal Zararlılarla Mücadelede Yeni Bir Yaklaşım: Entomopatojenik Nematodlar”. II. Proje ve Bilim Şenliği. 26-30 Nisan, **2010**. Adnan Menderes Üniversitesi. **Aydın**.

c) Katıldığı Projeler

1) “Belek, Köyceğiz-Dalyan Özel Çevre Koruma Bölgelerinde Yuvalayan Deniz Kaplumbağalarının İzlenmesi”. Destekleyen Kuruluş: Özel Çevre Koruma Daire Başkanlığı. 2002 Yaz Dönemi. **Belek, ANTALYA**

2) “Çamkoru (Kızılcahamam) Milli Parkının Doğal Kaynak Değerlerinin Tanımlanması ve Ekolojik Koruma Planının Hazırlanması” Destekleyen Kuruluş: Hacettepe Üniversitesi. 2003 Yaz Dönemi. **ANKARA**

3) “Türkiye’deki İncir Arıcıkları ve Bunlarla İlişkili Nematodları Araştırılması” PROJE NO: FEF-6004. Destekleyen Kuruluş: Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi, Araştırmacı. 2006-2007

4) “Biyolojik Mücadele Ajanı Entomopatojenik Nematodların Ege Bölgesindeki Dağılım ve Çeşitliliklerinin Belirlenmesi” Proje No: TBAG-HD/122 (106T008) Destekleyen Kuruluş: TUBİTAK, Araştırmacı, 2006-2007.

5) “Biyolojik Mücadele Ajanı Entomopatojen Nematodların (Fam: Steinernematidae ve Heterorhabditidae) Kitlesel Üretimleri ve Ticari Formülasyonları” Proje No: 106T587 Destekleyen Kuruluş: TUBİTAK, Araştırmacı, 2007-2009.

- 6) “Kestane Meyve Zararlıları *Curculio elephas* (Curculionidae: Coleoptera) ve *Cydia splendana* (Tortricidae: Lepidoptera)’nın Kontrolünde Entomopatojenik Nematodların Etkinliğinin Araştırılması” Proje No: FEF-08003. Destekleyen Kuruluş: Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi. Araştırmacı. 2008-2010.
- 7) “Biyolojik Mücadele Ajanı Entomopatojenik Nematodlar Üzerine Araştırmalar” PROJE NO: FBE-09014. Destekleyen Kuruluş: Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi. 2009-2010.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl :

İLETİŞİM

E-posta Adresi : bgulcu@adu.edu.tr
Tarih : 02.05.2010