

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÇEŞİTLİ TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN ENTOMOPATOJEN NEMATODLARIN  
İZOLASYONU, TANIMLANMASI VE PATOJENİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Cihan GÖKÇE**

**HAZİRAN 2011**

**TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÇEŞİTLİ TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN ENTOMOPATOJEN NEMATODLARIN  
İZOLASYONU, TANIMLANMASI VE PATOJENİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Cihan GÖKÇE**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nce  
“YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)”  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 13.05.2011  
Tezin Savunma Tarihi : 06.06.2011**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ**

**Trabzon 2011**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Biyoloji Anabilim Dalında**

**Cihan GÖKÇE tarafından hazırlanan**

**ÇEŞİTLİ TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN ENTOMOPATOJEN NEMATODLARIN  
İZOLASYONU, TANIMLANMASI VE PATOJENİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 17 / 05 / 2011 gün ve 1405 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından 06 / 06 / 2011 tarihinde yapılan sınavda**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Prof. Dr. Mahmut EROĞLU .....**

**Üye : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ .....**

**Üye : Doç. Dr. İsmail DEMİR .....**

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

“Çeşitli Toprak Örneklerinden Entomopatojen Nematodların İzolasyonu, Tanımlanması ve Patojenitelerinin Araştırılması” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen hocam sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, çalışmam boyunca değerli fikirlerini ve yardımlarını benden esirgemeyen ve imkânları doğrultusunda her konuda yanımda olan hocam sayın Doç. Dr. İsmail DEMİR’e, gerek laboratuvar, gerek nematod konusunda hiçbir bilgisini ve yardımını esirgemeyen sayın Arş. Gör. Hüseyin YILMAZ’a ve tez jüri üyeliğini üstlenen sayın Prof. Dr. Mahmut EROĞLU hocama teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşım sayın Zeynep ERBAŞ’a ve tez süresi boyunca laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığı’na teşekkürlerimi sunuyorum.

Bana her zaman inanan ve varlıklarıyla her zaman güç veren, benden hiçbir imkanlarını esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Cihan GÖKÇE

Trabzon 2011

## TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Çeşitli Toprak Örneklerinden Entomopatojen Nematodların İzolasyonu, Tanımlanması ve Patojenitelerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ'ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 25/07/2011

Cihan GÖKÇE

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VIII
SUMMARY .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	XIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Entomopatojen Nematodlar .....	3
1.2.1. Entomopatojen Nematodların Sistematiği ve Morfolojisi.....	5
1.2.1.1. Steinernematidae .....	7
1.2.1.1.1. <i>Steinernema</i> Cinsinin Morfolojik Özellikleri .....	9
1.2.1.2. Heterorhabditidae .....	12
1.2.1.2.1. <i>Heterorhabditis</i> Cinsinin Morfolojik Özellikleri .....	13
1.2.2. Entomopatojen Nematodların Biyolojisi ve Hayat Döngüsü .....	15
1.2.3. Entomopatojen Nematodların Coğrafik Yayılışı.....	19
1.2.4. Entomopatojen Nematodların Ekolojisi .....	19
1.2.4.1. Entomopatojen Nematodları Etkiyen Abiyotik ve Biyotik Faktörler.....	20
1.2.4.1.1. Abiyotik Faktörler .....	20
1.2.4.1.2. Biyotik Faktörler .....	22
1.3. Entomopatojen Nematodlarla Simbiyotik Olarak Yaşayan Bakteriler.....	24
1.3.1. Entomopatojen Nematodlarla, Simbiyotik Bakterilerin İlişkisi .....	24
1.3.2. Entomopatojen Nematod-Bakteri Kompleksinin Hayat Döngüsü .....	25
1.3.3. Simbiyotik Bakterilerin Sistematiği .....	30
1.4. Entomopatojen Nematodların Moleküler Karakterizasyonu ve Tanımlanması .....	30
1.4.1. ITS: Internal Transcribed Spacer.....	31

1.5.	Tezin Amacı .....	32
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	33
2.1.	<i>Galleria mellonella</i> L. (Lepidoptera, Pyralidae)'nin Laboratuvar Ortamında Beslenmesi .....	33
2.2.	Toprak Örneklerinin Alınması .....	33
2.3.	Topraktan Entomopatojen Nematodların İzolasyonu.....	34
2.4.	Entomopatojen Nematod İzolatlarının White Trap'dan Toplanması ve Yıkılması .....	35
2.5.	Nematodların In vivo Üretimi .....	35
2.6.	Nematodların Depolanması .....	36
2.7.	Entomopatojen Nematodların Tür Teşhislerinin Yapılması.....	36
2.7.1.	Morfometrik Özelliklerin Belirlenmesi .....	36
2.7.2.	Moleküler Özelliklerin Belirlenmesi .....	37
2.7.2.1.	DNA İzolasyonu .....	37
2.7.2.2.	PCR ile rRNA ITS Bölgesinin Çoğaltılması .....	38
2.7.2.3.	PCR ile 28S rRNA D2/D3 Alt Ünitesi'nin Çoğaltılması .....	38
2.7.2.4.	PCR Ürünlerinin Klonlanması ve DNA Analizi .....	39
2.7.2.5.	DNA Dizi Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Filogenetik Analiz .....	39
2.8.	Entomopatojen Nematodlarla Simbiyotik Olarak İlişkili Bakterilerin Tanımlanması.....	39
2.8.1.	Simbiyotik Bakterilerin İzolasyonu.....	39
2.8.2.	Simbiyotik Bakterilerin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi .....	40
2.8.3.	Simbiyotik Bakterilerin Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi .....	41
2.8.3.1.	Simbiyotik Bakterilerden DNA İzolasyonu .....	41
2.8.3.2.	Simbiyotik Bakterilerin 16S rRNA Gen Bölgelerinin Çoğaltılması .....	41
2.9.	Entomopatojen Nematodların Zararlı Böcekler Üzerindeki İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi .....	41
2.9.1.	Entomopatojen Nematodların <i>Agrotis segetum</i> (Denis & Schiff.) (Lepidoptera: Noctuidae) Üzerindeki İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi .....	42
2.9.2.	Entomopatojen Nematodların <i>Grylotalpa grylotalpa</i> (L.) (Orth.: Grylotalpidae) Üzerindeki İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi .....	42
2.9.3.	Entomopatojen Nematodların <i>Agriotes</i> spp., (Col: Elateridae) Üzerindeki İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi.....	43
2.10.	Farklı Sıcaklık Derecelerinin İnfektivite ve Nematod Gelişimi Üzerine Etkilerinin Tespit Edilmesi .....	44
3.	BULGULAR .....	45

3.1.	Toprak Örneklerinin Toplanması ve Entomopatojen Nematodların İzolasyonu.....	45
3.2.	İzole Edilen Entomopatojen Nematodların Tür Teşhisleri.....	47
3.2.1.	Moleküler Özellikler.....	47
3.2.1.1.	Entomopatojen Nematodların ITS Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması.....	47
3.2.1.2.	Entomopatojen Nematodların 28S rRNA D2/D3 Alt Ünite Bölgeleri.....	48
3.2.1.3.	Entomopatojen Nematodların DNA Dizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	49
3.2.2.	Morfometrik Özellikler.....	50
3.3.	Filogenetik Analiz .....	52
3.4.	Entomopatojen Nematodlarla Simbiyotik Olarak İlişkili Bakterilerin Özellikleri.....	53
3.4.1.	Simbiyotik Bakterilerin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi .....	53
3.4.2.	Simbiyotik Bakterilerin Moleküler Özellikleri.....	54
3.5.	Entomopatojen Nematodların Zararlı Böcekler Üzerindeki İnsektisidal Etkileri.....	57
3.5.1.	Entomopatojen Nematodların <i>Agrotis segetum</i> (Denis & Schiff.) (Lepidoptera: Noctuidae) Üzerindeki İnsektisidal Etkileri.....	57
3.5.2.	Entomopatojen Nematodların <i>Gryllotalpa gryllotalpa</i> (L.) (Orth.: Gryllotalpidae) Üzerindeki İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi .....	59
3.5.3.	Entomopatojen Nematodların <i>Agriotes</i> spp., (Col: Elateridae) Üzerindeki İnsektisidal Etkileri .....	59
3.4.	Farklı Sıcaklık Derecelerinin İnfektivite ve Nematod Gelişimi Üzerine Etkileri.....	60
4.	TARTIŞMA.....	61
5.	SONUÇLAR.....	69
6.	ÖNERİLER .....	71
7.	KAYNAKLAR.....	72
8.	EKLER .....	87
ÖZGEÇMİŞ		



Yüksek Lisans

ÖZET

ÇEŞİTLİ TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN ENTOMOPATOJEN NEMATODLARIN  
İZOLASYONU, TANIMLANMASI VE PATOJENİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Cihan GÖKÇE

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilimdalı

Danışman: Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ  
2010, 86 Sayfa, 16 Sayfa Ek

Entomopatojen nematodlar (EPN), tüm dünyada zararlı böceklerle karşı yaygın olarak kullanılan mikrobiyal mücadele etmenlerinden bir tanesidir. Aynı coğrafik bölgede bulunan zararlı böceklerle mücadelede, yerel izolatların uyumu ve taşınmasının birçok önemli avantajları vardır.

Bu çalışmada, Türkiye’de fındık dikim alanlarının ve ormanların büyük bir kısmını barındıran Doğu Karadeniz Bölgesi, Trabzon yöresi, Değirmendere ve Altındere havzalarından entomopatojen nematod izolasyonu ile tür çeşitliliği belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla 98 toprak örneğinden 8 tane entomopatojen nematod izolasyonu gerçekleştirildi (%8,3). Yapılan morfolojik ve morfometrik çalışmalara göre, *Steinernema* cinsine ait olduğu tespit edildi. ITS bölgelerinin dizi analizleri esas alınarak tüm nematodların tür tanımlamaları yapıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda izole edilen nematodların, *Steinernema carpocapsae*, *S. feltiae*, *Steinernema* sp. ve *S. kraussei* türlerine ait oldukları görüldü. Çalışmaya göre *S. feltiae* 'nin bölgede izole edilen en yaygın nematod türü olduğu tespit edildi. *S. kraussei* türü ise Türkiye’den izole edilen ilk tür özelliği taşımaktadır. *Steinernema* sp. ise ülkemiz için yeni olabilecek bir nematod türüdür.

Biyotest çalışmaları sonucunda nematod izolatlarının, 10 gün içerisinde *Agrotis segetum* böceği üzerinde %100 insektisidal etkiye sahip olduğu gösterildi.

**Anahtar Kelimeler:** Entomopatojen nematodlar, *Steinernema*, Biyolojik mücadele.

Master Thesis

SUMMARY

ISOLATION, IDENTIFICATION AND INVESTIGATION OF THE PATHOGENICITY  
OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES FROM VARIOUS SOIL SAMPLES.

Cihan GÖKÇE

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Graduate Program  
Supervisor: Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ  
2010, 86 Pages, 16 Pages Appendix

Entomopathogenic nematodes (EPNs) are extensively used as microbial control agents against the nocuous insects in all over the world. Utilization of the local entomopathogenic isolates for controlling the pests found within the same geographical area has several advantageous including transportation and adaptation.

In the current study, we have conducted a survey to isolate EPNs from a distinct region, Degirmendere Valley and Altındere National Park of Trabzon vicinity in East Black Sea Region of Turkey, where mainly covered by hazelnut plantation areas and forest. Out of 98 soil samples collected from the region, eight were positive for EPNs (8,3%). According to the morphological and morphometric studies, it was determined that all of the samples were in *Steinernema* genus. The pure cultures of all nematodes were further identified based on ITS region sequence analysis. The samples were identified as *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema feltiae*, *Steinernema* sp. and *Steinernema kraussei*. Among these isolates, *S. feltiae* is the most frequently distributed species in the region. *S. kraussei* is recorded for the first time from Turkey.

Bioassay results indicate that isolated nematodes have 100% infectivity within 10 days against *Agrotis segetum*. Therefore it has a high potential to use as microbial pesticide.

**Key Words:** Entomopathogenic nematodes, *Steinernema*, Biological Control.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.	Entomopatojen nematodların morfolojik yapıları ..... 6
Şekil 2.	<i>Steinernema</i> ssp.'nin bazı morfolojik yapılarının taramalı elektron mikroskobu görüntüleri ..... 11
Şekil 3.	<i>Steinernema</i> cinsinin morfolojik yapılarının şematik görünümü ..... 12
Şekil 4.	<i>Heterorhabditis megidis</i> 'in bazı morfolojik yapılarının ışık mikroskobu görüntüleri ..... 14
Şekil 5.	<i>Heterorhabditis</i> ssp.'e ait taramalı elektron mikroskobu görüntüleri ..... 15
Şekil 6.	Entomopatojen nematodla enfekte olmuş tarafından enfekte olmuş <i>Galleria mellonella</i> larvası ..... 18
Şekil 7.	Simbiyotik bakterilerin nematod vücudundaki lokalizasyonu ..... 26
Şekil 8.	Entomopatojen nematod-simbiyotik bakteri hayat döngüsünün şematik gösterimi ..... 27
Şekil 9.	<i>Xenorhabdus nematophilla</i> türü bakterilerde Faz I ve Faz II evrelerinin elektron mikroskop görüntüleri ..... 29
Şekil 10.	18S-28S nüklear ribozomal DNA (nrDNA)'ın Internal Transcribed Sequence (ITS) bölgesi ..... 31
Şekil 11.	Enfekte böceklerden White Trap yöntemiyle entomopatojen nematodların izolasyonu ..... 35
Şekil 12.	Nematod ile enfekte olan larvalardan simbiyotik bakteri izolasyonu ..... 40
Şekil 13.	Trabzon ili Değirmendere Vadisi ve Altındere Milli Parkı'ndan nematod izolasyonu için alınan toprak örneklerinin yerleri ..... 45
Şekil 14.	İzole edilen entomopatojen nematodların genomik DNA'larının % 1'lik agaroz jel görüntüsü ..... 47
Şekil 15.	Entomopatojen nematodların PCR ile çoğaltılan rRNA ITS bölgesinin % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü ..... 48
Şekil 16.	Entomopatojen nematodların 28S rRNA D2/D3 alt ünitesinin % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü ..... 49
Şekil 17.	Türü tespit edilen entomopatojen nematodlar arasındaki akrabalık derecelerini gösteren filogenetik ağaç ..... 53
Şekil 18.	Entomopatojen nematodlarla simbiyotik yaşayan bakterilerden izole edilen genomik DNA'ların % 1'lik agaroz jel görüntüsü ..... 55

Şekil 19.	Entomopatojen nematodlarla simbiyotik yaşayan bakterilerde PCR ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgesinin % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü .....	56
Şekil 20.	İzolatların 1000 IJs/300µl oranında infektif juvenillerinin, <i>Agrotis segetum</i> (Denis & Schiff.) (Lep.: Noctuidae) üzerindeki etkileri.....	58
Şekil 21.	İzolatların 3000 IJs/300µl oranında infektif juvenillerinin, <i>Agrotis segetum</i> (Denis & Schiff.) (Lep.: Noctuidae) üzerindeki etkileri.....	58
Şekil 22.	İzolatların 5000 IJs/300µl oranında infektif juvenillerinin, <i>Agrotis segetum</i> (Denis & Schiff.) (Lep.: Noctuidae) üzerindeki etkileri.....	59

## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1. <i>Steinernema</i> cinsi içinde yer alan türler .....	8
Tablo 2. <i>Heterorhabditis</i> cinsi içinde yer alan türler.....	13
Tablo 3. Heterorhabditis ve Steinernema'nın ayırt edici özellikleri .....	17
Tablo 4. Simbiyotik bakterilerin taksonomik durumu ve ilişkili oldukları EPN türleri.....	25
Tablo 5. EPN ve simbiyotik bakteri ilişkisindeki hayat döngüsü .....	30
Tablo 6. Entomopatojen nematodların sahip olduğu ITS gen bölgeleri ve D2D3 gen bölgeleri için kullanılan primerler .....	32
Tablo 7. Entomopatojen nematodların izole edildiği toprak örneklerinin enlem ve boylam bilgileri .....	46
Tablo 8. İzolatların DNA dizi analizine göre tür tayinleri .....	50
Tablo 9 İzolatların infektif juvenil bireylerinin morfometrik ölçümleri .....	51
Tablo 10. İzole edilen entomopatojen nematodlardan erkek bireylerin morfometrik ölçümleri .....	52
Tablo 11. İzole edilen entomopatojen nematodlarla simbiyotik yaşayan bakterilerin biyokimyasal özellikleri.....	54
Tablo 12. İzole edilen entomopatojen nematodlarla simbiyotik yaşayan bakterilerin rRNA gen dizilerinin benzerlik oranları .....	57
Tablo13. Farklı sıcaklıkların izole edilen entomopatojen nematodların infektif juvenil evrelerinin <i>Galleria mellonella</i> larvaları üzerindeki enfeksiyonuna ve nematod gelişimine etkileri.....	64

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

EPN	: Entomopatojen nematod
İJs	: İnfektif jüvenil nematodlar
µm	: Mikrometre
J1	: 1. evre infektif jüvenil
J2	: 2. evre infektif jüvenil
J3	: 3. evre infektif jüvenil
J4	: 4. evre infektif jüvenil
UV	: Ultravirole
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RAPD	: Randomly Amplified Polymorphic DNA
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ITS	: Internal Transcribed Spacer
rRNA	: Ribozomal RNA
nrDNA	: Nükleer Ribozomal DNA
TAF	: Triethanolamine Formalin
dNTP	: Deoxynucleotide Triphosphate
TSA	: Tryptic Soy Agar
TSB	: Tryptic Soy Broth
PAUP	: Phylogenetic Analysis Using Parsimony

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Giriş

Zararlı böceklerin tarımsal üretimde, birçok engelleyici rolü vardır. Bu kapsamda zararlı böceklerle mücadelede tüm dünyada insektisit kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu kimyasalların yaygın kullanımı çevrede geri dönüşü olmayan yıkımlara ve savaşılan böceklerde direnç oluşumuna neden olmuştur (Immaraju ve ark., 1992; Nagarkatti ve ark., 2002; Onstad ve ark., 2002). Böceklerde direnç oluşması, bu böceklere karşı daha fazla kimyasal kullanımını veya daha fazla toksik madde gelişimini gerçekleştirmiştir. Bu kimyasal maddelerin molekül yapısının ve etkisinin doğada bozulmadan uzun yıllar kalması ve bunun sonucunda canlılarda kalıcı yıkımlara neden olmalası zamanla kullanımlarının azaltılması sonucunu doğurmuştur. Ayrıca bu maddeler zararlı böcekleri öldürmekle birlikte hedef dışı birçok yararlı böcek ve predatör böcek gruplarını da etkilemektedir (Delbeke ve ark., 1997). Bu olumsuz etkilere karşı zararlı böceklerle mücadele kapsamında kimyasal ilaçların yerine, çevre dostu, güvenilir maddeler geliştirmek kaçınılmaz hale gelmiştir. Tüm dünyada zararlı böceklerle mücadele kapsamında alternatif bir yol olan biyolojik mücadele yöntemine hızlı geçiş yapılmaktadır.

Biyolojik mücadele, zararlı böcek popülasyonlarını dolayısıyla böceklerin zararlarını azaltmak için canlı organizmalardan faydalanılarak yapılan ekonomik güvenilir ve etkin bir mücadele yöntemidir. Biyolojik mücadelede mikroorganizmaların kullanılmasına mikrobiyal mücadele adı verilir (Waterhouse ve Norris, 1987).

Tabiatta böceklerin hastalanmasına ve onların ölümüne neden olan pek çok virüs, bakteri, protozoan, fungus ve nematod türü mevcuttur (Lipa, 1975). Bu mikroorganizmalar böceklerde hastalık oluşturdukları için entomopatojen olarak adlandırılır. Tabiatta bulunan entomopatojenler, böcek popülasyonlarının dağılımında büyük öneme sahiptir. Bunların mikrobiyal mücadele etmeni olarak, fiyat ve etkinlik bakımından kimyasal insektisitlere göre daha kullanışlı olması yanında ekosistemdeki biyolojik çeşitliliğin sürdürülmesi, zararlı türlere ait doğal düşmanların korunması, besinler üzerinde kalıntı bırakmaması, hedeflenmemiş diğer organizmalar ve insanlar açısından güvenli olması gibi diğer birçok üstünlükleri de vardır (Lacey, 2001).

Bu yararlı gruplar arasında kendine üst sıralarda yer bulan entomopatojen nematodların son yıllarda önemli canlılar olduğu ve biyolojik mücadele programları kapsamında kullanımlarının yararlı olduğu gösterilmiştir. (Gaugler, 2002; Grewal ve ark., 2005).

Böceklerde parazit olarak yaşayan ve genelde ölümlerine neden olan birçok nematod türü bulunmaktadır. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda 30’u aşkın nematod familyasına ait türlerin, böceklerle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Poinar, 1990; Kaya ve Stock, 1997).

Dünyada, ekonomik öneme sahip zararlıları kontrol altına alabilecek entomopatojen nematod türlerini izolasyonuna yönelik çok sayıda çalışma yürütülmektedir (Hominick, 2002). Entomopatojen nematodlarla ilgili laboratuvar ortamında ve doğal koşullarda yapılan çalışmalar, bunların önemli biyolojik mücadele etmeni olduklarını ve ciddi kayıplara neden olan birçok zararlıyı kolaylıkla baskı altına alıp, bunların mücadelesinde başarılı bir şekilde kullanılacakları gerçeğini ortaya çıkarmıştır (Kaya, 1985; Klein, 1990; Wouts, 1991; Georgis ve Manweiler, 1994; Shapiro-Ilan ve ark., 2002).

Farklı habitatlardan elde edilen toprakta bulunan böceklerde obligat parazit olarak yaşayan ve önemli birçok zararlıyı baskı altına alabilecek yüksek potansiyele sahip bazı entomopatojen nematod türleri; oldukça geniş bir konukçu dağılımına, çok çeşitli üreme şekline, konukçuyu enfekte edebilme özelliğine ve canlı kalabilme yeteneğine sahiptir (Bedding ve ark., 1983; Kaya, 1985; Bedding, 1990). Entomopatojen nematodların enfekte ettiği konukçularında farklı etkiler görülebilir. Bunlar; sterilizasyonun bozulması, ömür uzunluğunda azalma, yumurta bırakma sayısında azalma, uçuş aktivitesinde azalma, gelişimin gecikmesi ya da diğer davranışsal, fizyolojik ve morfolojik bozukluklar şeklinde olabilir. Şiddetli enfeksiyonlarda ise konukçuda hızlı bir ölüm görülür (Koppenhöfer, 2000).

Günümüzdeki çalışmalar, zararlı böceklerin biyolojik mücadelelerinde kullanılma potansiyeli taşımaları bakımından 8 familya üzerinde yoğunlaşmıştır. Bunlar; Mermithidae, Tetradenematidae, Allantonematidae, Aphelenchoididae, Neotylenchidae, Sphaerulariidae, Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarıdır (Kaya ve Stock, 1997; Stock, 2005). Özellikle, Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyaları, entomopatojen nematod olarak isimlendirilir ve zararlı böceklerin mikrobiyal mücadelesinde en sık kullanılan gruplardır (Liu, 2000). Şu an için altmıştan fazla ülkede,



yüzlerce laboratuarda entomopatojen nematodlar ve birlikte yaşadıkları simbiyotik bakteriler üzerine çalışmalar sürdürülmektedir (Burnell ve Stock, 2000).

Günümüzde *Steinernema* cinsine ait 40, *Heterorhabditis* cinsine ait ise 10 nematod türü bulunmaktadır. Ancak, dünyanın pek çok ülkesinde yeni nematod tür ve izolatlarını bulmaya yönelik çalışmalar hızla devam etmektedir. Son 30 yılda entomopatojen nematodlar üzerinde yapılan çalışmalar daha çok sistematik konular üzerinde yoğunlaşmıştır. Son 10 - 15 yıllık bir süredeyse bu nematodların kitlesel üretimleri ve ticari formülasyonları yapılarak alan uygulamalarına başlanmıştır (Adams ve ark., 2006). Bugün ise entomopatojen nematodlar ticari olarak üretilen bir ürün haline gelmiş olup seralarda, orman arazilerinde, fındık bahçelerinde, mantar üretim alanlarında, çilek tarlalarında, şeker pancarı bahçelerinde, çim ekili alanlarda ve golf sahalarında, meyve ve sebze bahçelerinde, turunçgiller yetiştirme alanlarında kullanılabileceği yapılan araştırmalarla gösterilmiştir.

Türkiye, dünyada bulunduğu konumundan dolayı ılıman bir iklime sahip olduğu için tarım yetiştiriciliği konusunda diğer dünya ülkeleri arasında ilk sıralarda yer alır. Türkiye’de bulunan tarım alanları, Avrupa’da bulunan toplam tarım alanlarının %20 sini oluşturmaktadır (Eraktan, 2001). Tarımın bu kadar yaygın olması ve bu alanların birçok zararlıının etkisi altında olması, ülkemizde de yeni entomopatojenlerin bulunması ve geliştirilmesi zorunluluğunu doğurmuştur. Tüm bu ihtiyaçlara rağmen, Türkiye’de yeteri kadar çalışma yapılmamıştır. Özellikle dünyada olduğu gibi Türkiye’de de entomopatojen olarak nematodların kullanılması çalışmalarına yeni başlanmış ve bu konuda çok az araştırmalar yapılmıştır. Ülkemizin coğrafik konumu göz önünde bulundurulduğunda yapılacak araştırmalarla, birçok yeni entomopatojen nematod türü bulunması veya bu topraklara uygun patojen tespit edilmesiyle biyolojik mücadele çalışmalarına katkı sağlanacaktır. Özellikle Doğu Karadeniz Bölgesi gibi iklim koşullarının yumuşak geçtiği bir bölgedeki çalışmalarla bu katkı daha fazla olacaktır.

## 1.2. Entomopatojen Nematodlar (EPN)

Steiner, 1923 yılında Almanya’da testere sineğini *Neodiprion* sp. (Hymenoptera: Diprionidae) enfekte eden ilk entomopatojen nematod türü *Steinernema kraussei* (*Aplectana kraussei*)’yi tanımlamıştır. Glaser ise 1931 yılında Amerika’da *Popilla japonica*’yı (Coleoptera: Scarabaeidae) enfekte eden bir entomopatojen nematod türü olan

*Steinernema glaseri* (*Neoplectana glaseri*)'yi keşfetmiştir. Glaser aynı zamanda *in vitro* koşullarda nematodların kültüvasyonunu yapan ve entomopatojen nematodu bu böcek türüne karşı arazide test eden ilk araştırmacı olmuştur (Stock, 2005).

*S. glaseri*'nin keşfedilmesi ve 20. yüzyılın başlarında biyolojik mücadele etmeni olarak geliştirilmesinden sonra entomopatojen nematodlar üzerine yapılan araştırmalar, zararlı böceklerin mücadelesinde kimyasal pestisitlerin daha fazla kabul görmesinden dolayı etkin hale gelememiştir. Araştırmaların çoğu yeni türlerin tanımlanması, hayat döngüleri ve diğer biyolojik özellikleri üzerinde yoğunlaşmıştır (Stock, 2005).

EPN'lerin besin arama davranışlarının, ekolojik rollerinin ve üreme davranışlarının açıklanmasında olduğu kadar simbiyotik bakterileriyle olan ilişkilerinin, virulans mekanizmalarının ve bakteriyel metabolitlerinin anlaşılmasında da bir takım gelişmeler sağlanmıştır. Bu açıdan bakıldığında entomopatojen nematodların simbiyotik bakterileri üzerine yapılan çalışmalar merkezi bir rol üstlenmiştir. Örneğin; genetik çalışmalar, bu karmaşık ilişkide rol oynayan düzenleyici sistem ve faktörlerin önemine ışık tutmuştur. Bugün *Heterorhabditis bacteriophora*'nın simbiyontu olan *Photorhabdus luminescens*' in tüm genom haritası hazırlanmıştır (Duchaud ve ark., 2003).

EPN'ler, çevresel yönden güvenilir olmaları, laboratuarda çok miktarda üretilibilmeleri ve steart püskürtme yöntemiyle veya sulama sistemiyle kolayca uygulanabilir olmaları sayesinde mükemmel bir mücadele etmeni özelliğindedirler (Liu ve ark., 2000). Ayrıca pestisitlerin çoğuna karşı duyarlılıklarının az olması, konak aralıklarının geniş olması, yüksek derecede patojeniteleri, memelilerde toksik etki göstermemeleri ve ekonomik yönden kitlesel üretimlerinin uygunluğu günümüzde biyolojik mücadele etmeni olarak kullanımlarına hız verilmiştir (Somasekhar ve ark., 2002).

EPN'lerin sahip olduğu bazı özellikler onları biyolojik mücadelede kullanılan diğer organizmalardan (virüs, bakteri, fungus ve mikrosporidia gibi mikroorganizmalar ile böcek parazitoidleri ve predatörleri) ayırmaktadır. Entomopatojen nematodların biyolojik mücadelede kullanılmasının faydasının ve riskinin değerlendirilmesinde aşağıdaki özelliklerin dikkate alınması gerekir:

1. EPN'ler, günümüze kadar bilinen zararlı bir etkisi olmadığı için yıllardır biyolojik mücadelede kullanılmaktadır.

2. EPN'ler, kimyasal pestisitlere kıyasla çevreyi daha az tehdit etmektedir. Günümüzde toprakta kullanılan geniş spektrumlu pestisitlerin yerine geçmişlerdir.

3. İnfektif juvenil adı verilen dayanıklı yaşam evrelerinden biri olan dönemde, konaklarını aktif olarak arayabilme özelliğindedir.

4. Kullanımları için pek çok ülkede onay alınmasına gerek yoktur.

5. Kimyasal insektisitlerin kısıtlı olduğu veya yasaklandığı zararlılara karşı kullanılabilirler.

6. Dünyanın pek çok yerinde topraktan elde edilebilirler.

7. EPN'lerin konak aralıkları, laboratuarda elde edilen sonuçların aksine doğada sınırlıdır.

8. Duyarlı konağın etkili bir şekilde kontrolü için entomopatojen nematodların infektif veya dauer juvenillerinin büyük miktarlarda (> 109 ha-1) uygulanması gerekir.

9. "İnundative (Peryodik salınımın gerçekleştirildiği korunma.)" salınımdan sonra entomopatojen nematod populasyonları, doğal yoğunluklarıyla kıyaslanabilir seviyede hızlı bir şekilde azalma gösterir.

10. Uygulamadan sonra entomopatojen nematodların yayılımları azdır. (Ehlers ve Hokkanen, 1996)

EPN'ler ile sahip oldukları simbiyotik bakterilerin insanlar da dahil olmak üzere sıcakkanlı hayvanlarda güvenilir olduğu bilinmektedir (Ehlers ve Hokkanen, 1996). Ancak, Avustralya'da bir çiftçinin elindeki yaradan Heterorhabditis'lerle mutualistik yaşayan *Photorhabdus asymbiotica* bakterisi izole edilmiştir (Gerrard ve ark., 2004).

### 1.2.1. Entomopatojen Nematodların Sistematiği ve Morfolojisi

Nematodlar, diğer adı ile segmentsiz yuvarlak solucanlar, sayıca dünya üzerinde en fazla bulunan çok hücreli omurgasız canlı grubudur. Nematodların böcekleri üzerinde ölüme sebep olan grupları ise entomopatojen nematod olarak adlandırılır ve sistematikte böcekler üzerinde patojen olan sadece iki familya mevcuttur. Bunlar Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarıdır. Bu familyaların tüm üyelerinin böcekleri öldürücü etkisi vardır ve mikrobiyal mücadelede sıkça kullanılmaktadır. EPN'lerin bireyleri diğer nematodlarda olduğu gibi morfolojik farklılıklar göstermektedir. Dişi birey, erkek bireye nazaran gelişmiş ve daha büyüktür. Erkek bireylerde çiftleşme organı olarak spikül bulunur. Heterorhabditidae familyasının erkek üyesinde spiküle yardımcı olarak bursa adı verilen yapılar bulunur (Şekil 1).

Entomopatojen nematodların sistematığı De Ley ve Blaxter (2002)'e göre verilmiştir.

Phylum: Nematoda

Class: Chromadorea

Ordo: Rhabditida

Sub-ordo: Tylenchina

Infra-ordo: Panagrolaimomorpha

Super-familiya: Strongyloidea

Familiya: Steinernematidae

Genus: *Steinernema*

Genus: *Neosteinernema*

Sub-ordo: Rhabditina

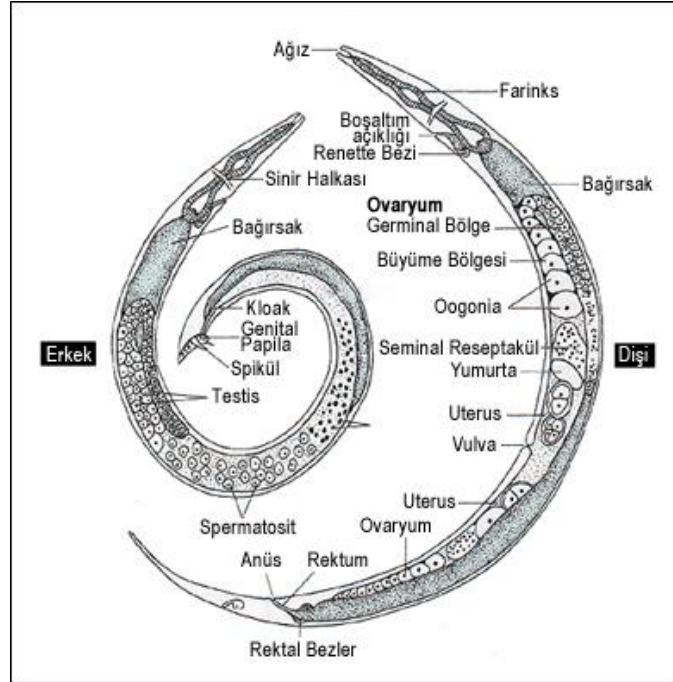
Infra-ordo: Rhabditomorpha

Super-familiya: Strongyloidea

Familiya: Heterorhabditidae

Genus: *Heterorhabditis*

Genus: *Heterorhabditoides*



Şekil 1. Entomopatojen nematodların morfolojik yapıları (URL-1, 2011).

### 1.2.1.1. Steinernematidae

Bu familyanın sistematik durumu zaman içinde değişiklik göstermiştir. Entomopatojen nematodların izolasyonu ilk kez Steiner (1923) tarafından yapılmış ve bulunan tür *Aplectana* cinsi içinde *A. kraussei* olarak isimlendirilmiştir. Travassos (1927) bu cinsi *Steinernema* olarak tekrar isimlendirmiştir. Steiner (1929) iki yıl sonra yeni bir cins ve tür tanımlamış ve *Steinernema kraussei*'ye çok benzeyen bu türü *Neoaplectana glaseri* olarak isimlendirmiştir. Filipjev (1934) *Steinernema* ve *Neoaplectana* cinslerini Steinernematinae alt familyasına yerleştirmiştir. Chitwood ve Chitwood (1937) bu alt familyayı, familya seviyesine yükseltmiş ve Steinernematidae olarak isimlendirmiştir. Wouts ve arkadaşları 1982 yılında iki türü inceleyerek (*Steinernema kraussei* ve *Neoaplectana glaseri*) *Neoaplectana* cinsinin *Steinernema*'nın sinonimi olduğuna karar vermiş ve bu iki cinsi *Steinernema* adı altında birleştirmiştir. Nguyen ve Smart (1994) *Neosteinerema* cinsini tanımlamış ve bu cinsi Steinernematidae familyasına eklemiştir. Günümüzde bu familya *Steinernema* ve *Neosteinerema* olmak üzere iki cins içerir. *Steinernema* cinsi içinde yer alan 63 tür ve izole edildikleri ülkeler Tablo 1'de verilmiştir. *Neosteinerema* cinsi *N. longicurvicauda* isimli tek türle temsil edilir.

Tablo 1. *Steinernema* cinsi içinde yer alan türler

<b>Tür ismi</b>	<b>İzolasyon kaynağı</b>	<b>Lokalite</b>	<b>Referans</b>
<i>S. abbasi</i>	Toprak	Umman	Elawad ve ark., 1997
<i>S. aciari</i>	Toprak	Çin	Qiu ve ark., 2005a
<i>S. affine</i>	Bibionidae	Danimarka	Bovien, 1937
<i>S. akhursti</i>	Toprak	Çin	Qiu ve ark., 2005b
<i>S. anatoliense</i>	Toprak	Türkiye	Hazır ve ark., 2003
<i>S. arenarium</i>	Toprak, <i>Anomola dubia</i>	Rusya	Artyukhovsky, 1967
<i>S. apuliae</i>	Toprak	İtalya	Triggiani ve ark., 2004
<i>S. ashiuense</i>	Toprak	Japonya	Phan ve ark., 2006a
<i>S. australe</i>	Toprak	Şili	Edgington ve ark. 2009
<i>S. backnense</i>	Toprak	Vietnam	Phan ve ark., 2006b
<i>S. beddingi</i>	Toprak	Çin	Qui ve ark., 2005c
<i>S. bicornutum</i>	Toprak	Yugoslavya	Shishiniova ve ark., 1995
<i>S. boemarei</i>	Toprak	Fransa	Lee ve ark., 2009
<i>S. brazilense</i>	Toprak	Brezilya	Nguyen ve ark. 2010
<i>S. carpocapsae</i>	<i>Cydia pomonella</i>	Çek Cumhuriyeti	Weiser, 1955
<i>S. caudatum</i>	Toprak	Çin	Xu ve ark., 1991
<i>S. ceratohorum</i>	Toprak	Çin	Jian ve ark., 1997
<i>S. cholashanense</i>	Toprak	Çin	Nguyen, 2008
<i>S. colombiense</i>	Toprak	Kolombiya	Lopez-Nunez ve ark., 2008
<i>S. costaricense</i>	Toprak	Kosta Rika	Uribe-Lorio ve ark., 2007
<i>S. cubanum</i>	Toprak	Küba	Mracek ve ark., 1994
<i>S. cumgareense</i>	Toprak	Vietnam	Phan ve ark., 2006b
<i>S. diaprepesi</i>	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	ABD	Nguyen ve Duncan, 2002
<i>S. eapokense</i>	Toprak	Vietnam	Phan ve ark., 2006b
<i>S. feltiae</i>	Bibionidae	Danimarka	Filipjev, 1934
<i>S. glaseri</i>	<i>Popillia japonica</i>	ABD	Steiner, 1929
<i>S. guangdongense</i>	Toprak	Çin	Qiu ve ark., 2004
<i>S. hebeiense</i>	Toprak	Çin	Chen ve ark., 2006
<i>S. hermaphroditum</i>	Toprak	Endonezya	Stock ve ark., 2004
<i>S. jollieti</i>	Toprak	ABD	Spiridonov ve ark., 2004
<i>S. ichnusae</i>	Toprak	İtalya	Tarasco ve ark., 2008
<i>S. intermedium</i>	Toprak	ABD	Poinar, 1985
<i>S. kariii</i>	Toprak	Kenya	Waturu ve ark., 1997
<i>S. khoisanae</i>	Toprak	Güney Afrika	Nguyen ve ark., 2006a
<i>S. kraussei</i>	<i>Cephaleia agabeyetis</i>	Almanya	Steiner, 1923
<i>S. kushidai</i>	<i>Anomala cuprea</i>	Japonya	Mamiya, 1988
<i>S. leizhouense</i>	Toprak	Çin	Nguyen ve ark., 2006b

Tablo 1'in devamı

Tür ismi	İzolasyon kaynağı	Lokalite	Referans
<i>S. litorale</i>	Toprak	Japonya	Yoshida, 2004
<i>S. loci</i>	Toprak	Vietnam	Phan ve ark., 2001
<i>S. longicaudum</i>	Toprak	Çin	Shen ve Wang, 1991
<i>S. monticolum</i>	Toprak	Güney Kore	Stock ve ark., 1997
<i>S. neocurtillis</i>	<i>Neocurtilla hexadactilla</i>	ABD	Nguyen ve Smart, 1992
<i>S. oregonense</i>	Toprak	ABD	Liu ve Berry, 1996a
<i>S. pakistanense</i>	Toprak	Pakistan	Shahina ve ark., 2001
<i>S. puertoricense</i>	Toprak	Porto Riko	Roman ve Figueroa, 1994
<i>S. puntauvense</i>	Toprak	Kostarika	Uribe-Lorio ve ark., 2007
<i>S. rarum</i>	Toprak	Arjantin	Doucet, 1986
<i>S. riobrave</i>	<i>Helicoverpa zea</i>	USA	Cabanillas ve ark., 1994
<i>S. ritteri</i>	Toprak	Arjantin	Doucet ve ark., 1990
<i>S. robustispiculum</i>	Toprak	Vietnam	Phan ve ark., 2005
<i>S. sangi</i>	Toprak	Vietnam	Phan ve ark., 2001
<i>S. sasonense</i>	Toprak	Vietnam	Phan ve ark., 2006b
<i>S. scapterisci</i>	<i>Scapteriscus vicinus</i>	Uruguay	Nguyen ve ark.1990
<i>S. scarabaei</i>	<i>Anomala orientalis</i>	ABD	Stock ve Koppenhöfer, 2003
<i>S. siamkayai</i>	Toprak	Taylve	Stock ve ark., 1998
<i>S. sichuanense</i>	Toprak	Çin	Mracek ve ark., 2006
<i>S. silvaticum</i>	Toprak	Almanya	Sturhan ve ark., 2005
<i>S. schliemanni</i>	<i>Osmoderma ceremita</i>	Rusya	Spiridonov ve ark. 2010
<i>S. tami</i>	Toprak	Vietnam	Luc ve ark., 2000
<i>S. texanum</i>	Toprak	ABD	Nguyen ve ark., 2007
<i>S. thanhi</i>	Toprak	Vietnam	Phan ve ark., 2001
<i>S. thermophilum</i>	Toprak	Hindistan	Ganguly ve Singh, 2001
<i>S. xueshanense</i>	Toprak	Çin	Mracek ve ark., 2009
<i>S. websteri</i>	Toprak	Çin	Cutler ve Stock, 2003
<i>S. weiseri</i>	Toprak	Çek Cumhuriyeti	Mracek ve ark., 2003
<i>S. yimgalemense</i>	Toprak	Etiyopya	Nguyen ve ark., 2004a

### 1.2.1.1.1. Steinernema Cinsinin Morfolojik Özellikleri

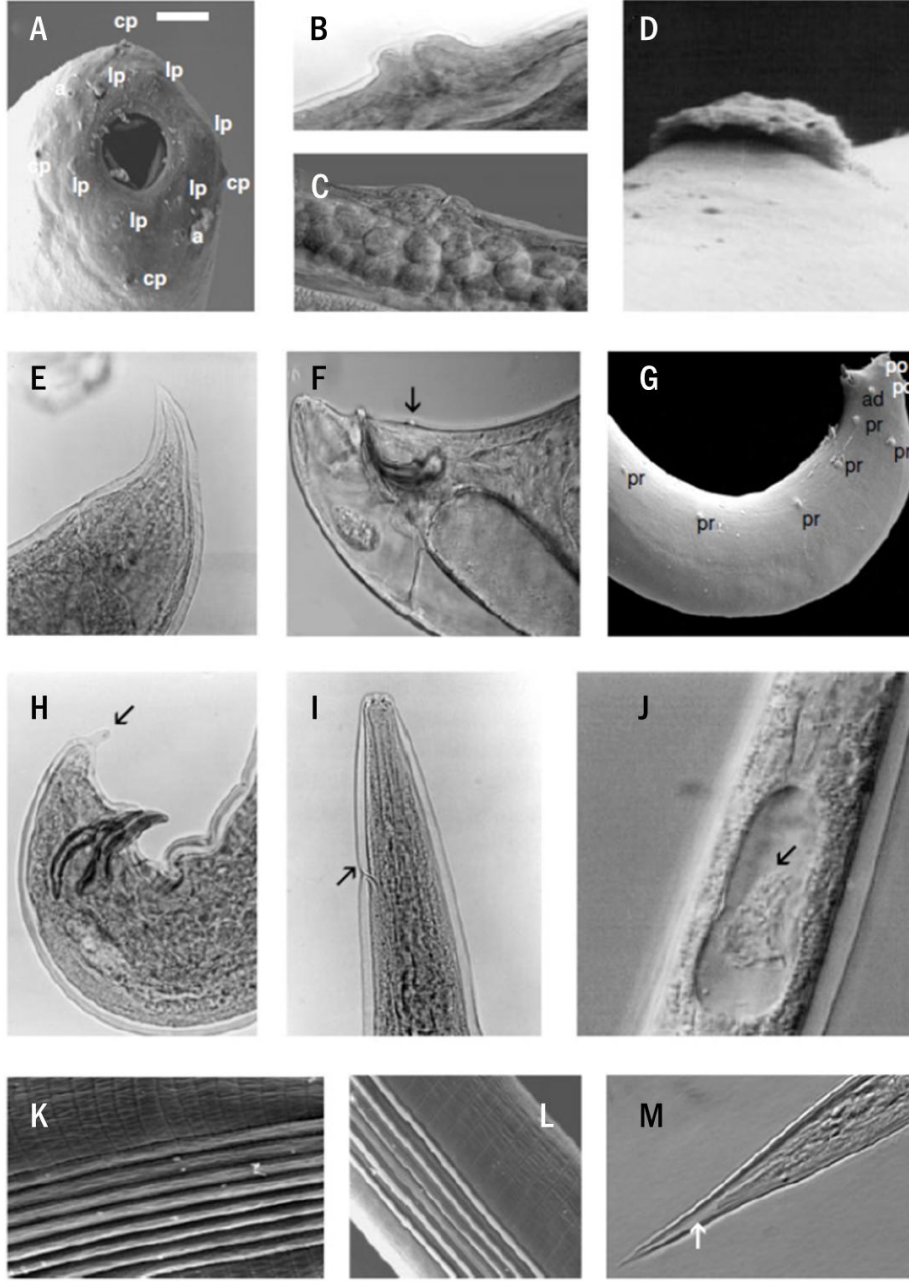
Dişiler, büyüktür ve boyları türden türe değişir. Kutikula düzgün veya halkalıdır. Lateral çizgiler yoktur. Boşaltım açıklığı belirgindir, genellikle sinir halkasının anterioründe yer alır. Kafa yuvarlak, küt veya nadiren bodur şekilli olabilir. Altı dudak

ihtiva eder ve her bir dudak bir labial papillayla veya labial papillaların hemen yanına yerleşmiş papilla benzeri yapılarla çevrelenmiştir. Dört tane sefalik papillaya sahiptir. Amphidler küçüktür. Stoma içe çökük, küçük ve geniştir. Farinks, silindirik bir prokorpus, hafifçe şişkin metakorpus, nispeten dar bir isthmus ve kapaklı ve geniş basal balbtan oluşmuştur. İsthmus sinir halkası ile çevrelenmiştir. Üreme sistemi didelfik, amfidelfik ve geriye doğru esnektir. Vulva vücudun ortasına yerleşmiştir ve çoğu durumda epitigma mevcuttur. Dişiler ovipar veya ovovivipar olabilir. Ovovivipar durumlarda juveniller dişi vücudunu terk etmeden önce infektif evreye kadar gelişir. Kuyruk, bazen anal genişlikten uzun olabilir. Bazı türlerde fazmidler bulunabilir (Poinar, 1975; Adams ve Nguyen, 2002).

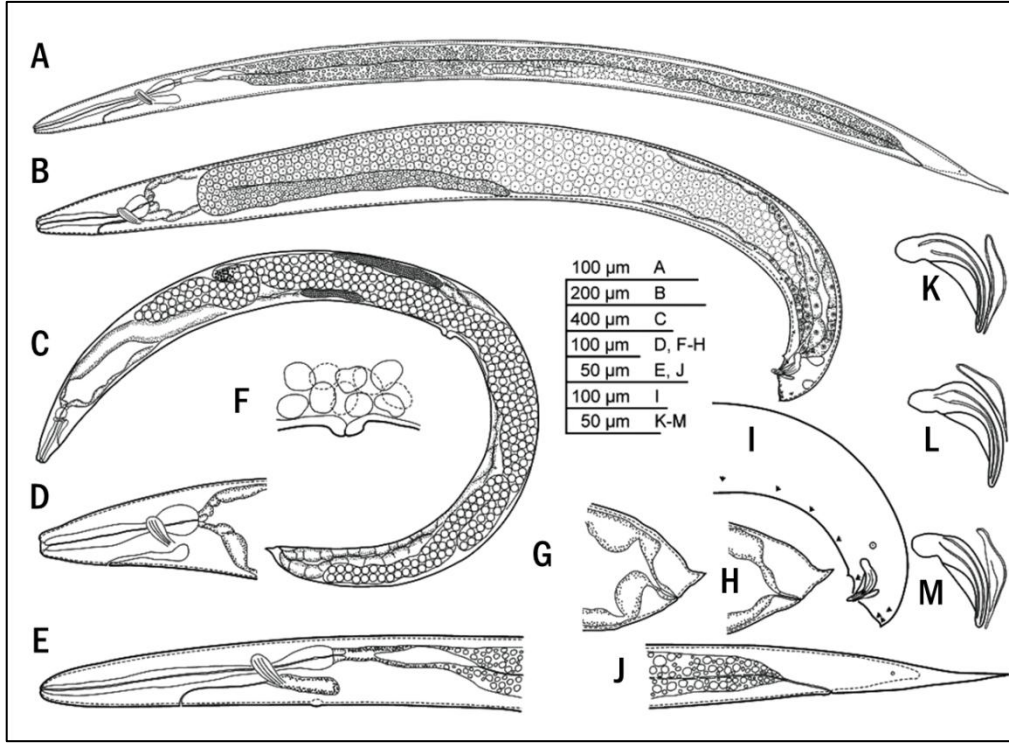
Erkekler, dişilere nazaran daha küçüktür. Anterior bölgede altı labial papilla, dört sefalik papilla ve genelde bir perioral disk bulunur. Farinks dişilerinkine benzerdir. Testis tektir ve geriye doğru esnektir. Spikül çiftleşmiş ve ayırılır. Gubernakulum bazı türlerde spikül kadar uzun olabilir. Bursa yoktur. Kuyruk nispeten yuvarlak veya parmaklı şekilli olabilir. Bazı türlerde mukron bulunur. Bir tane tek ve 7-10 tanesi prekloakal olmak üzere 10-14 genital papilla bulunabilir (Şekil 2) (Poinar, 1975; Adams ve Nguyen, 2002).

İnfektif juvenillerde (üçüncü evre infektif juvenil = İJs) stoma içe çöküktür. Vücut incedir ve bazı durumlarda ikinci evre juvenil evreden kalma kutikula kılıfı taşıyabilir. Vücutun lateralinde özel çiftler oluşturabilen çizgiler bulunur ve salgı kesesi belirgindir. Kuyruk, konoid veya filiformdur. Fazmidler kuyruğun ortasına yerleşmiştir ve bazen kolaylıkla görülemeyebilir (Şekil 3) (Adams ve Nguyen, 2002).





Şekil 2. *Steinernema* ssp.'nin bazı morfolojik yapılarının taramalı elektron mikroskobu görüntüleri. A-D ilk jenerasyon dişi: A, Besin açıklığı ve lebial&cephalic çıkıntılar. B ve C, vulva. D, Epiptigma. E, kuyruk. F-H ilk jenerasyon erkek: F, kuyruk. G, prekloak, adkloak, postkloak. H, kuyruk ve tutunma organı mucro. I-M üçüncü jenerasyon infeksiif juvenil. I, salgı açıklığı. J, simbiyotik bakteriler. K ve L, 5 ve 8 çizgili yanıl alan deseni. M, kuyruğa ait hiyalin kılıf.



Şekil 3. *Steinernema* cinsinin morfolojik yapılarının şematik görünüşleri. A, E, J: İnfektif juvenil. A: Genel görünüşü; E: Farinks bölgesi; J: Kuyruk bölgesi; B, I, K-M: Erkek. B: Genel görünüş; I: Kuyruk bölgesi; K-M: Spikül ve Gubernakulum; C, D, F, G, H: Dişi. C: Genel görünüş; D: Farinks bölgesi; F: Vulva bölgesi; G, H: Kuyruk bölgesi (Phan ve ark., 2006a).

### 1.2.1.2. Heterorhabditidae

Bu familya, Poinar (1975) tarafından Güney Avustralya'da *Heliothis punctigera* (Noctuidae, Lepidoptera) pupasını enfekte eden *Heterorhabditis bacteriophora*'nın tanımlanmasıyla oluşturulmuştur. Familya içinde *Heterorhabditis* ve *Heterorhabditoides* olmak üzere iki cins yer almaktadır. *Heterorhabditis* cinsi biri tartışmalı olmak üzere 17 tür içerir (Tablo 2). *Heterorhabditoides* cinsi ise 2008 yılında tanımlanmıştır ve *H. chongmingensis* olarak isimlendirilen tek türle temsil edilir (Zhang ve ark., 2008).

Tablo 2. *Heterorhabditis* cinsi içinde yer alan türler

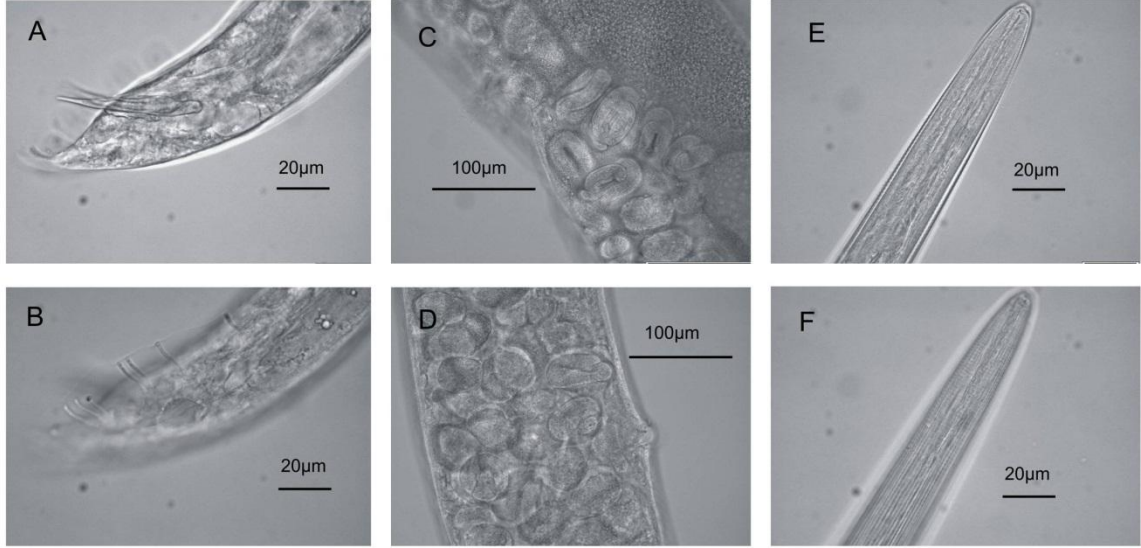
Tür ismi	İzolasyon kaynağı	Lokalite	Referans
<i>H. amazonensis</i>	Toprak	Brezilya	Vealo ve ark., 2006
<i>H. bacteriophora</i>	<i>Heliothis punctigera</i>	Avustralya	Poinar, 1975
<i>H. baujardi</i>	Toprak	Vietnam	Phan ve ark., 2003
<i>H. brevicaudis</i>	Toprak	Çin	Liu, 1994
<i>H. downesi</i>	Toprak	İrvea	Stock ve ark., 2002
<i>H. gerrardi</i>	Toprak	Avusturalya	Plichta ve ark., 2009
<i>H. floridensis</i>	Toprak	ABD	Nguyen ve ark., 2006c
<i>H. georgiana</i>	Toprak	ABD	Nguyen ve ark., 2008
<i>H. indica</i>	<i>Scirpophaga excerptalis</i>	Hindistan	Poinar ve ark., 1992
<i>H. marelata</i>	Toprak	ABD	Liu ve Berry, 1996b
<i>H. megidis</i>	<i>Popillia japonica</i>	ABD	Poinar ve ark., 1987
<i>H. mexicana</i>	Toprak	Meksika	Nguyen ve ark., 2004b
<i>H. poinari</i> *	Toprak	Gürcistan	Kakulia ve Makaia, 1997
<i>H. safricana</i>	Toprak	Güney Afrika	Malan ve ark., 2008
<i>H. sonorensis</i>	<i>Diceroprocta ornea</i>	Meksika	Stock ve ark., 2009
<i>H. taysearae</i>	Toprak	Mısır	Shamseldean ve ark., 1996
<i>H. zealveica</i>	<i>Heteronychus arator</i>	Yeni Zelvea	Poinar, 1990

\* Orjiinal tanımlamayı gösteren çalışmadaki eksiklikler nedeniyle sistematik pozisyonu tartışmalıdır.

#### 1.2.1.2.1. *Heterorhabditis* Cinsinin Morfolojik Özellikleri

İnfektif juveniller konak böceğe girdikten sonra hermafroditik dişilere gelişirler. Bu dişilerde kafa hafifçe yuvarlaklaşmıştır. İyi gelişmiş altı konikal dudak ihtiva eder ve her bir dudağın yakınında bir terminal papilla bulunur. Amfidal açıklıklar küçüktür. Stoma geniş fakat küçüktür. Stomanın alt bölgesi farinksle kaplanmıştır. Farinkste metakorpus bulunmaz, isthmus incedir, basal balb genişlemiş ve kapak indirgenmiştir. Sinir halkası isthmusun ortasında bulunur. Boşaltım açıklığı, genellikle farinksin alt tabanı hizasında bulunur. Vulva yarık şekillidir ve vücudun ortasında bulunur ve eliptik bir halkayla çevrelenmiştir. Ototestis amfidelfiktir ve geriye doğru esnektir. Kuyruk noktalanmış şekillidir ve anal genişlik uzundur. Post-anal kabarıklık genellikle mevcuttur (Adams ve Nguyen, 2002).

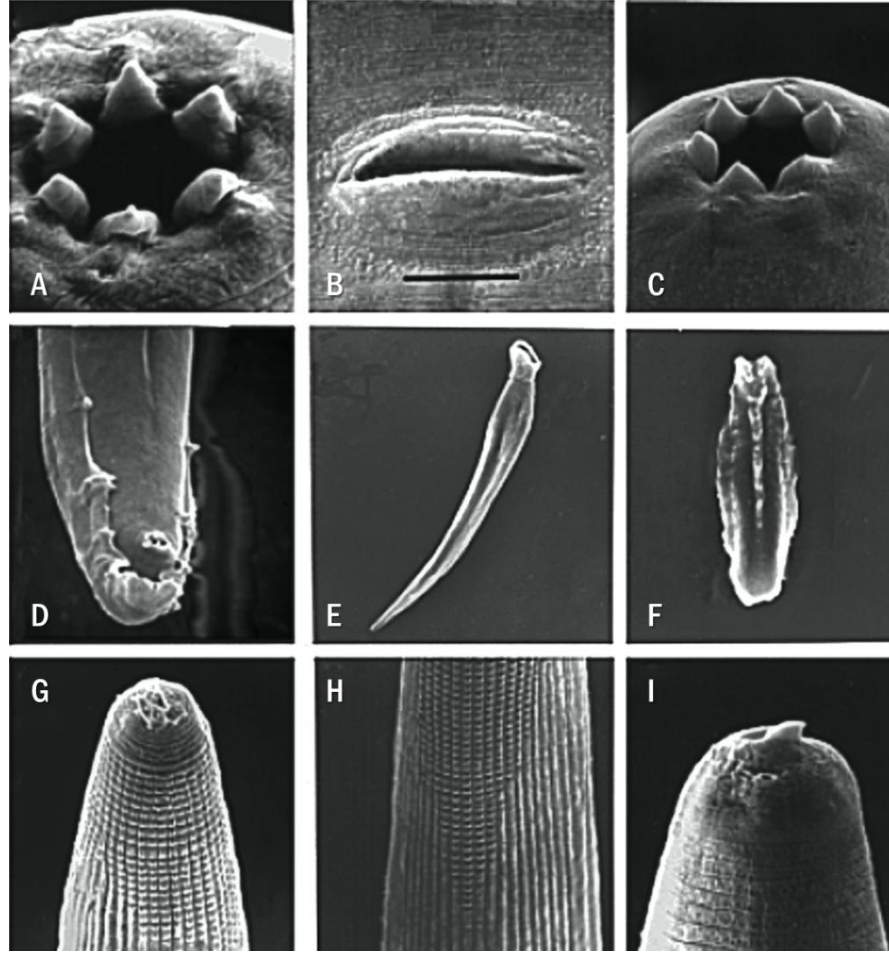
Amfimiktik dişiler, hermafroditik dişilere benzerdir fakat genellikle daha küçüktür. Labial papillalar belirgindir. Üreme sistemi amfidelfiktir. Vulva çiftleşme için işlevselken, yumurta deposition için işlevsel değildir (Adams ve Nguyen, 2002).



Şekil 4. *Heterorhabditis megidis*'in bazı morfolojik yapılarının ışık mikroskobu görüntüleri. A: Spikül ve Gubernakulum; B: Bursa; C: Dişi birey içindeki yumurtalar, D: Vulva; E, F: İnfektif juvenilin anterior bölgesi (Yılmaz ve ark., 2008).

Erkeklerde, hafifçe vücudun ventraline kıvrılmış olan spikül, çift ve ayrıdır. Spikülün baş kısmı laminasından kısadır. Gubernakulum genellikle spikül uzunluğunun yarısı kadardır. Bursa on çift genital papilla içerir ve bursanın yapısı tüm türlerde benzerdir (Adams ve Nguyen, 2002).

İnfektif juveniller, genellikle ikinci evre juvenil evreden kalma kutikula kılıfı taşır. Kafada, belirgin dorsal dişler mevcuttur. Ağız ve anüs kapalıdır. Stoma, paralel duvarlı kapalı bir bölme gibi görünür. Farinks ve bağırsak indirgenmiştir. Boşaltım açıklığı, sinir halkasından daha aşağıda yer alır. Simbiyotik bakteriler, bağırsak içinde bulunur. Kuyruk, noktalanmış şekillidir. İnfektif juvenillerin morfolojik karakterleri tür ayrımı için yeterli değildir (Adams ve Nguyen, 2002).



Şekil 5. *Heterorhabditis* ssp.'e ait taramalı elektron mikroskobu görüntüleri. A, Birinci jenerasyon dişinin dudakları, labial papillalar ve amphidler; B, Vulva; C, İkinci jenerasyonun dişinin kafası; D, Bursa; E, Spikül; F, Gubernakulum; G-I, İnfektif juvenillinin anterior bölgesi ve annulasyon; Bar A= 5  $\mu\text{m}$ , B= 8,6  $\mu\text{m}$ , C= 6  $\mu\text{m}$ , D= 20  $\mu\text{m}$ , E= 15  $\mu\text{m}$ , F= 8,6  $\mu\text{m}$ , G= 8,6  $\mu\text{m}$ , H= 10  $\mu\text{m}$ , I= 3,8  $\mu\text{m}$  (Adams ve Nguyen, 2002)

### 1.2.2. Entomopatojen Nematodların Biyolojisi ve Hayat Döngüsü

EPN'ler (Heterorhabditidae ve Steinernematidae), enfekte edebildikleri böcek tür sayısı oldukça fazla olan, öldürücü endoparazitlerdir (Forst ve Nealon, 1996; Boemare, 2002; Campbell ve ark., 2003). Bu parazitler, Enterobacteriaceae familyasına ait bakterilerle mutualistik bir ilişkiye sahiptirler. Steinernematidler, *Xenorhabdus* cinsine ait bakterilerle; Heterorhabditidler ise *Photorhabdus* cinsi bakterilerle mutualistik ilişki içindedirler. Üçüncü evre infektif juveniller (IJs) beslenmeyen ve serbest yaşayan tek

evredir (Adams ve Nguyen, 2002; Stuart ve ark., 2006). Bunlar gelişimleri durmuş, böcek kadavrası dışındaki ekstrem koşullara karşı uzun süre hayatta kalabilmeye yönelik morfolojik ve fizyolojik yönden adaptasyon gösteren “dauer” juvenillerdir (Brown ve ark., 2002).

Toprakta yaşayan infektif juveniller konak böceğe ağız, anüs ve spirakulum gibi vücut açıklıklarından giriş yapar. Konağa girişten sonra türe özgü simbiyotik bakteriler infektif juvenillerden böcek hemosölüne salınır (Bornstein-Frost ve ark., 2005). Bu bakteriler ürettikleri endo ve ekzotoksinler sayesinde konak böceği öldürürler. Nematodun konak içerisine girmesini takiben konağın ölümü, konağın büyüklüğüne, sıcaklığa ve nematod türüne bağlı olarak 48-72 saat içerisinde gerçekleşir (Kaya ve Stock, 1997; Walsh ve Webster, 2003).

Nematodlar daha sonra konak içerisinde üreyen kendi simbiyotik bakterileri ve bu bakterilerin nematod için uygun hale getirdiği konak dokusu üzerinden beslenerek dördüncü evre juvenillere (J4) dönüşürler. J4'ler beslenip gelişerek ilk jenerasyon dişi ve erkek bireyleri meydana getirirler. Çiftleşmeden sonra birinci evre juvenilleri (J1) oluşturacak olan yumurtaların gelişimi sağlanır. Nematodların yumurtadan çıkması dişinin vücudu içerisinde gerçekleşir. Bu durumda dişi nematodun içerisi juveniller ile dolar. Bu evreye “Endotokia matricida” denir. Bu terim ilk kez Seurat (1914) tarafından kullanılmıştır. Yumurtadan çıkan nematodlar annenin dokularını besin olarak kullandıklarından doğum bu nematodlarda annenin ölümüyle sonuçlanır. Nematodların gelişmemiş evrelerinin böceklerinki ile karışmaması için larva yerine juvenil terimi kullanılır. Her bir juvenil evresinden sonra deri değişimi gerçekleştirilerek sırasıyla J2, J3 ve J4 evrelerine dönüşürler. J4 evresindeki juveniller ikinci jenerasyon dişi ve erkek bireyleri meydana getirir. Dişi ve erkek bireylerin çiftleşmesinden sonra oluşan yumurtalar aynı şekilde J1 ve J2 evrelerini oluşturur. Nematodların üremesi kadavradaki besin kaynaklarının tükenmesine kadar devam eder. Nematodlar genellikle kadavra içerisinde iki ya da üç jenerasyon geçirmektedir. Eğer besin kaynağı sınırlıysa, birinci nesiller tarafından J3 evresi oluşturulunca döngü durur (kısa hayat döngüsü).

Kadavradaki kaynaklar bittiğinde J2 evresindeki juveniller beslenmeye son verip bir vezikül veya kese içine bakterilerini toplayıp infektif evreye dönüşürler. Heterorhabditidler J2 evresinde hala J2 evresinde sahip oldukları kütikulaı barındırırlar. İnfektif juveniller, yeni bir konak bulmak için kadavrayı terk ederler, beslenmeden toprakta aylarca hayatta kalabilirler (Kaya ve Gaugler, 1993; Adams ve Nguyen, 2002).

*Steinernema*'ların aksine *Heterorhabditis*'lerde ilk jenerasyonda dişi-erkek farklılaşması görülmez. Oluşan tüm ergin bireyler hermafrodit dişidir. Hermafrodit dişilerden oluşan yumurtaların juvenillere gelişimi dişi birey içinde gerçekleşir. *Heterorhabditis*'lerin ikinci jenerasyonunda dişi ve erkek bireylerle birlikte ilk jenerasyondaki gibi hermafrodit bireyler de meydana gelir. Raifer ve Glazer (2000) yaptıkları çalışmada bunların oranlarının besin miktarına göre değiştiğini tespit etmişleridir. Yani eşey belirlenmesi çevresel faktörlere göre olmaktadır. Besin kalitesi ve miktarı azaldıkça hermafroditlerin oranı artmakta ve bunu dişiler daha sonra da erkekler izlemektedir. Oysa iyi bir besin ortamında cinsiyet oranları hemen hemen aynıdır. İkinci jenerasyondan İJ evresine ulaşan nematodlar böcek kadavrasını terk eder. Bu İJ'ler *Steinernema*'lardaki gibi J2 evresinden kalma kutikula bir kılıf gibi taşırlar. Bu kılıf *Heterorhabditis*leri kuraklık, don ve fungal patojenlere karşı korur (Timper ve Kaya, 1989; Campbell ve Gaugler, 1991; Wharton ve Surrey, 1994). Tablo 3. te *Heterorhabditis* ve *Steinernema* nın ayırt edici özellikleri gösterilmiştir.

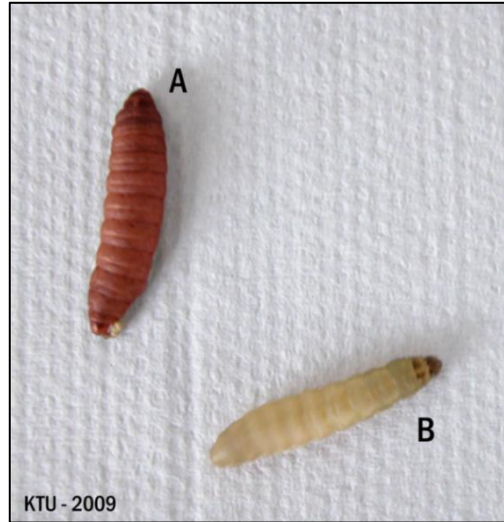
Tablo 3. *Heterorhabditis* ve *Steinernema* nın ayırt edici özellikleri

Fenotipik özellik	<i>Heterorhabditis</i>	<i>Steinernema</i>
İlk jenerasyon ergin	Hermafrodit	Dişi ve erkek ayrı birey
Bakteriyal lokasyon	Bağırsağın son 2/3'ü	Bağırsak veziküllerinin içi
Filogenetik ilişki	Rhabditidae ve Stongylida	Stongyloididae ve Panagrolamidae
Faz II bakterilerini koruma	Yok	Var
İnfektif juvenil özelliği	Kutikular dişlere, sinir halkası aşağısında salgı kesesi ve lateral 2 çizgiye sahip.	Kutikular dişler yok, sinir halkası yukarısında salgı kesesi ve lateral 6-8 çizgiye sahip.
İlk jenerasyon dişi özelliği	Bursa var. 9 çift bursadan oluşan genital papillae	Bursa yok. 10-11 çifte ek olarak 1 tek genital papillae

Entomopatojen nematodların hayat döngülerinin süresi, buldukları sıcaklık derecesine çok bağlıdır (Koppenhöfer, 2000). Oda sıcaklığında 5-7 gün içerisinde hayat döngülerini tamamlarlar. Konak içerisinde 1-3 jenerasyon geçirirler (Burnell ve Stock, 2000). Jenerasyon sayısı ve oluşacak yeni nesil nematod sayısı buldukları konağa ve ortamın sıcaklık derecesine bağlıdır (Finnegan ve ark., 1999; Koppenhöfer ve Kaya, 1999).

Enfekte ettikleri konakta besinin tükenmeye başlaması üzerine 3. evre İJ'ler incelmış konak kütikülünü parçalayarak dışarı çıkar ve yeni konak aramaya başlarlar (Kaya ve Gaugler, 1993). Bu beslenmeyen evre toprak içerisinde uygun bir konak buluncaya kadar aylarca canlılığını sürdürebilir (Burnell ve Stock, 2000).

EPN'ler enfeksiyonu farklı işaretlerden tanınabilir. Konağın ölümünden kısa süre sonra kadavra yumuşamaya ve rengi değişmeye başlar. *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) larvaları göz önüne alındığında nematod türüne bağlı olarak Steinernematidler tarafından enfekte edilen larvalar kahverenginin tonları, toprak rengi ve siyah renk alabilirler. Oysa Heterorhabditler tarafından enfekte edilen larvalar kırmızı, turuncu, mor, sarı ve bazen de yeşil renk alabilmektedirler (Şekil 6.). Kadavrada oluşan renk simbiyotik bakteri nedeniyledir. Heterorhabditlerle enfekte olan larvalar zamanla daha az yumuşaklaşırlar. Enfekte olan larvaların kutikulası ince ve içeriği gösteren bir yapıda olursa nematodlar dışarıdan bakıldığında kolaylıkla görülebilirler. Entomopatojen nematodlarla enfekte olan kadvralar kokuşmazlar ve parçalveıkları zaman dahi kötü bir koku ortaya çıkmaz. Enfekte olan larvaların dokuları normal yapılarını yitirir ve yumuşarlar ancak asla sıvı hale dönmezler. Heterorhabditlerle enfekte olan kadvralarda vücut içeriği sakızimsı bir hal alır (Koppenhöfer, 2000).



Şekil 6. Entomopatojen nematodla enfekte olmuş tarafından enfekte olmuş *Galleria mellonella* larvası. A: *Heterorhabditis* sp., B: *Steinernema* sp. tarafından enfekte olmuş larva.



### 1.2.3. Entomopatojen Nematodların Coğrafi Yayılışı

Entomopatojen nematodların Antraktika kıtası hariç tüm ekosistemlerde bulunduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda Steinernematidler'in tür sayısının fazla olmasından dolayı Heterorhabditidler'e kıyasla daha yaygın oldukları görülmüştür. Bu yeni türlerin Dünya üzerindeki yayılışı sadece bir ülke ile sınırlı görünmesine karşın, yeni survey çalışmalarının yapılması bu türlerin yayılışı hakkında daha iyi fikir sahibi olmamızı sağlayacaktır. *Steinernema* cinsi içinde *S. carpocapsae* ve *S. feltiae* geniş bir coğrafi yayılışa sahipken, diğer türlerin yayılışının kıta veya ülke seviyesinde sınırlı olduğu göze çarpmaktadır (Burnell ve Stock, 2000). *H. bacteriophora* en yaygın Heterorhabditid türüdür ve bütün kıtalardan izole edilmiştir. *H. megidis* ve *H. indica* diğer yaygın türlerdir. Ancak, *H. megidis* daha soğuk iklime sahip bölgelerden sıklıkla izole edilmişken, *H. indica*'nın yayılışının tropik ve sub-tropik bölgelerle sınırlı olduğu görülmektedir.

Dünya üzerinde yapılan birçok survey çalışması, entomopatojen nematodların farklı coğrafi alanlardaki elde edilme oranlarında önemli farklılıklar bulunduğunu göstermiştir. Örneğin ülkemizde yapılan bir çalışmada, Hazır ve arkadaşları (2003b) bu oranı % 2 olarak tespit etmişlerdir. Bu tüm dünyada yapılan çalışmalar arasında elde edilen en düşük oranlardan birisidir. Genellikle entomopatojen nematod elde etme oranları ortalama olarak %8-30 arasında değişmektedir (Griffin ve ark., 1999; Griffin ve ark.,2000; Stock ve ark., 1999).

### 1.2.4. Entomopatojen Nematodların Ekolojisi

Entomopatojen nematodlarla başarılı bir şekilde zararlılarla mücadele yapabilmek için nematodları, zararlının biyolojisini ve ekolojik verileri birlikte değerlendirmek gerekir. Bu yaklaşım nematodların konak seçimi, konağa tutunması ve konağı tanınması gibi infekte etme yönteminin anlaşılmasını gerektirir.

### **1.2.4.1 Entomopatojen Nematodları Etkiyen Abiyotik ve Biyotik Faktörler**

#### **1.2.4.1.1 Abiyotik Faktörler**

Entomopatojen nematodların varlığını pek çok abiyotik faktör etkilemektedir.

Abiyotik faktörler arasında iklim, toprak pH'sı, toprağın yapısı ve toprak sınıfı gibi doğal faktörler ile insan aktivitesi sonucu meydana gelen fiziksel veya kimyasal etkiler sayılabilir. Entomopatojen nematodlar üzerinde abiyotik faktörlerin etkilerine yönelik basitleştirilmiş laboratuvar koşullarında çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu çalışmalarda diğer abiyotik ve biyotik faktörlerin etkileşimlerini azaltmak için toprak veya yapay substratlar kullanılmıştır (Glazer, 2002). Bununla birlikte, doğada kompleks etkileşimler yaygındır ve basit laboratuvar çalışmalarından ekosisteme yönelik sonuca ulaşmak bazı problemler yaratır (Stuart ve ark., 2006).

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

Nem, toprakta yaşayan nematodları etkileyen en önemli abiyotik faktördür. Karada yaşayan nematodlar hareket edebilmek için yeterli kalınlıkta ve devamlılıkta su filmine ihtiyaç duyarlar (Kung ve ark., 1991).

EPN'lerin düşük nem düzeyinde azalan virulansları yağışla veya sulama yapılmasıyla arttırılabilir (Grant ve Villani, 2003).

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

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

Entomopatojen nematodlar ve konak böcekleri poikilothermal organizmalardır. Bu nedenle ortam sıcaklığı son derece önemlidir ve her iki organizmayı da etkilemektedir (Gouge ve ark., 1999). Sıcaklık, entomopatojen nematodların enfektivite, üreme, gelişme (Grewal ve ark., 1993; Jagdale ve Gordon, 1998; Jagdale ve ark., 2005), solunum, hayatta kalış, dağılım ve konak bulma davranışı gibi biyolojik faaliyetleri üzerinde etki göstermektedir (Griffin,1993).

Entomopatojen nematodların hareketliliği ve enfektiviteleri, sahip oldukları simbiyotik bakterilerin de konağın ölümünde etkili olması nedeniyle, tüm sıcaklık aralıklarında aynı değildir (Chen ve ark., 2003). Belirli bir sıcaklıkta konak ölümünün az olması veya hiç gerçekleşmemesi hem nematodun hem de bakterisinin sıcaklığa karşı duyarlılığını gösterir ve hangisinin daha duyarlı olduğu nematodun konağa girişi ile bakteri virulansını test eden deneyler yapılarak belirlenebilir (Griffin,1993).

Pek çok entomopatojen nematod türü için optimum sıcaklık koşulları 5°C-15°C arasında olduğu kaydedilmiştir; 37°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise genellikle ölüm gözlenmiştir (Koppenhöfer ve Kaya, 1999; Hazır, 2002; Stuart ve ark., 2006).

UV ışınları çoğu nematod türü için zararlıdır ve letal etki göstermektedir. Kısa dalga boyundaki (366 nm) UV ışınlarına birkaç dakika maruz kalan *Steinernema carpocapsae*'nin önce enfektivitesinde azalma daha sonra da ölümü gözlenmiştir. Güneş ışığına yakın bir dalga boyu olan 302 nm UV'ye maruz kalan *H. bacteriophora*'nın üreme kapasitesi ve virulansında azalma *S. carpocapsae*'ye kıyasla daha kısa sürede gerçekleşmiştir (Barbercheck ve Duncan, 2004). Entomopatojen nematodların UV'ye doğrudan maruz kalmamaları için toprak yüzeyine uygulamaları, sabah ve akşamları, yeterli miktarda su ile birlikte verilerek yapılmalıdır (Hazır, 2002; Shapiro- Ilan ve ark., 2006).

Dauer juvenillerin ve kadavra içinde bulunan diğer evrelerin hipertonic koşullarda da düzenleyici bir özelliğe sahip oldukları düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda, dauer juveniller tarafından gerçekleştirilen hipotonik düzenlemenin tür içi ve türler arasında farklılık gösterdiği gözlenmiştir. Böyle bir değişikliğin gözlenmesinin nedeni de

yaşadıkları doğal toprak ortamının farklı olmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Wright, 2004). Yüksek konsantrasyonlardaki NaCl, KCl ve CaCl<sub>2</sub>'ün *S. glaseri* türünün toprak sütunu boyunca hareket yeteneğini, konağına yerleşip enfekte etmesini engellediği görülmüştür (Thurston ve ark., 1994). CaCl<sub>2</sub> ve KCl'ün *H. bacteriophora*'nın hayatta kalışı, enfeksiyonu ve toprak sütunu boyunca hareketi üzerinde herhangi bir etkisi görülmemiştir. Ancak bu tuzların aşırı derecede olmayan konsantrasyonları *H. bacteriophora*'nın virulansını arttırmaktadır. NaCl'ün yüksek miktardaki konsantrasyonları ise tüm bu parametreleri olumsuz yönde etkilemektedir (Stuart ve ark., 2006).

Kimyasal pestisitler ile gübrenin entomopatojen nematodlar üzerinde pozitif, nötral veya negatif etkileri olduğu saptanmıştır. Çoğu gübre tavsiye edilen ölçüde kullanıldığında entomopatojen nematodların etkinliği üzerine çok az miktarda etki etmektedir. Bununla birlikte taze ve yüksek miktarda kimyasal gübre kullanımı entomopatojen nematodların hayatta kalış süreleri ve etkinliğinde zarar vericidir. Dodine, methomyl (karbamat) ve parathion (organofosfat) gibi bazı kimyasal pestisitler entomopatojen nematodlar üzerinde toksik etki gösterir. Chlorpyrifos ve endosulfanın (organoklorin) entomopatojen nematodlarla birarada bulunabileceği, tefluthrin ve imidicloprid gibi pestisitlerinse zararlı popülasyonunun baskılanmasında entomopatojen nematodlarla birlikte sinerjistik bir etki gösterdiği bildirilmiştir (Shapiro- Ilan ve ark., 2006).

#### 1.2.4.1.2 Biyotik Faktörler

Toprak yaşamının çok sayıdaki bileşeni, toprak içerisinde bulunan rekabetçi, predatör, parazit, patojen, konak olan ve olmayan özellikteki organizmalar entomopatojen nematodların yoğunluğunu ve dağılımını etkilemektedir (Stuart ve ark., 2006, Kaya, 2002).

Entomopatojen nematodların varlığını ve devamlılığını etkileyen primer biyotik faktör, uygun konakların bulunmasıdır (Mráček ve ark., 1999). Konaklar bol olarak bulunuyorsa, predatör, parazit ve patojenler popülasyonu düzenleyebilmektedir. Toprakta funguslar, bakteriler, protozoanlar, nematodlar, akarlar, kollembolalar ve mikroarthropodların yaygın olarak bulunması ve bu organizmaların laboratuvar koşullarında entomopatojenler üzerinde yüksek orvea predasyon (av-avcı ilişkisi) göstermesi, doğada bu organizmaların entomopatojen nematodlar üzerinde önemli bir etkiye sahip olduklarını kanıtlamaktadır (Stuart ve ark., 2006).

Böcek kadavrasıyla EPN'ler, çeşitli leş yiyicilerin predasyonuna uğramaktadır (Stuart ve ark., 2006). Bununla birlikte, bazen konak kadavrasının kimi karınca türleri üzerinde uzaklaştırıcı bir etki oluşturup, entomopatojen nematod gelişimine koruyucu bir olanak sağladığı bulunmuştur (Zhou ve ark., 2002). Günümüzde bu etkinin sınırlı sayıdaki karınca ve entomopatojen nematod türünde olduğu bilinmektedir (Kaya, 2002).

Davranışsal farklılıkların ve çevresel faktörlerdeki çeşitliliğin belirgin bir niş ayırımına ve rekabetten kaçınmaya imkan tanınması, entomopatojen nematod türlerinin bir arada var olabileceğini gösterir. Laboratuarda ve serada yapılan çalışmalar, konak bulma davranışındaki farklılıkların entomopatojen nematod türleri arasındaki rekabeti azaltacağı ve bir arada var olmayı sağlayacağı yönündedir (Koppenhöfer ve Kaya, 1996).

Bir böcek hem EPN'ler hem de diğer mikrobiyal böcek patojenleri tarafından besin kaynağı olarak kullanılabilir. Entomopatojen nematodlar belirli bir virüsle enfekte olmuş böcekleri enfekte edebilmektedir ancak kadavranın integümentleri (vücut örtüsü) kırılğan olacağından infektif juvenil üretimi azalacaktır. *Steinernema carpocapsae* ve *Bacillus thuringiensis* konağı birlikte enfekte edip üreyebilmektedir. Fakat, bu durumda entomopatojen nematodların gelişiminde anormallikler gözlenmiş, infektif juvenillerin boylarının daha küçük ve besin rezervlerinin daha az olduğu görülmüştür (Stuart ve ark., 2006). Bununla birlikte, entomopatojen nematod ve *B. thuringiensis*'in sinerjistik bir etki göstererek Scarabaeidae familyasına ait larvaların mortalitesini arttırdığı bilinmektedir (Koppenhöfer ve ark., 1999).

Entomopatojen nematodlar belirli bitki paraziti nematodlarla da negatif bir etkileşim içindedirler. Bu etkileşim, bitkiye zarar veren bitki paraziti nematod popülasyonunun azaltılması şeklindedir (Lewis ve ark., 2002; Somasekhar ve ark., 2002). Bitki paraziti nematodların tarım zararlısı olmalarından ötürü entomopatojen nematodların topraktaki nematod komünitesi üzerinde faydalı bir etkisi vardır (Stuart ve ark., 2006). Bitki paraziti nematodlar ve entomopatojen nematodlar arasındaki antagonizm, nematod / bakteri kompleksinin toprakta yaşayan ve hedef olmayan diğer omurgasızlara ve mikrobiyal komüniteye karşı da güvenilir olacağı düşüncesini kuvvetlendirmektedir (De Nardo ve ark., 2006).

### 1.3. Entomopatojen Nematodlarla Simbiyotik Olarak Yaşayan Bakteriler

#### 1.3.1. Entomopatojen Nematodlarla Simbiyotik Bakterilerin İlişkisi

Orta Paleozoik dönemde (yaklaşık olarak 300 milyon yıl önce) *Heterorhabditidae* ve *Steinernematidae* familyalarının birbirinden bağımsız olarak gram olumsuz enterik bakterilerle mutualistik ilişki göstermeye başladığı düşünülmektedir (Poinar, 1993). Bakteri nematod kompleksinin bir sonucu olarak zararlı böceklere karşı bu şekilde etkili bir biyolojik mücadele materyali oluşmuştur. Bu da son 15 yıldır sistematik çalışmaların neden bu grup üzerinde odaklandığını iyi bir şekilde açıklamaktadır (Adams ve ark., 2006). Bu birliktelikten her iki organizma da birbirine ihtiyaç duymaktadır. Nematodun bakteriye ihtiyaç duymasının nedenleri; konak böceğin humoral ve hücrel savunma mekanizmasının üstesinden gelmek, böcek kadavrasını bazı mikroorganizmalara ve çürükçül beslenen böceklere karşı korumak, gelişim ve üreme için uygun bir substrat oluşturmaktır. Bakteri ise böcek hemosölüne girebilmek ve konak böceğin vücudu dışında canlı kalabilmek için nematodu bir vektör olarak kullanır. Nematod simbiyotik bakterisinden yoksun olduğunda genellikle ya böceği öldürememekte ya da ölüm gerçekleştiğinde iyi gelişip, üreyememektedir (Ciche ve ark., 2006).

Taksonomik çalışmalar, her bir entomopatojen nematod türünün özel bir bakteriyle ilişkili olduğunu ancak, aynı bakteri türünün birden fazla nematod türüyle ilişkili olabileceğini göstermiştir (Boemare, 2002). Doğada nematodlar böcek kadavrasının içinde kendi simbiyotik bakterileriyle birlikte monoksenik bir ortamda gelişip ürerler (Adams ve ark., 2006). Nematod ve simbiyotik bakterisi arasındaki monoksenik ilişki nematodun konak içinde üremesi esnasında bakterisinin üretmiş olduğu antimikrobiyal bileşikler sebebiyledir. Üretilen bu bileşiklerin böcek kadavrasında diğer bakteri türlerinin gelişimini engellemeye yönelik olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte pek çok nematod türünün simbiyotik olmayan bakterilerle de ilişki kurduğu görülmüştür (Gouge ve Snyder, 2006). Gerritsen ve arkadaşlarına göre (1998), nematodlar alternatif bir simbiyont da kullanabilmekte ancak virulansında azalma olmaktadır. Diğer bakteriler, nematodlarla koşullara bağlı bir ilişki meydana getirebilirler. Ancak, nematodun simbiyotik bakterisi patojenite, üreme ve gelişme için her zaman daha etkin ortak olmaktadır. Şimdiye kadar tanımlanan simbiyotik bakteriler ve ilişkili oldukları entomopatojen nematod türleri Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Simbiyotik bakterilerin taksonomik durumu ve ilişkili oldukları EPN türleri

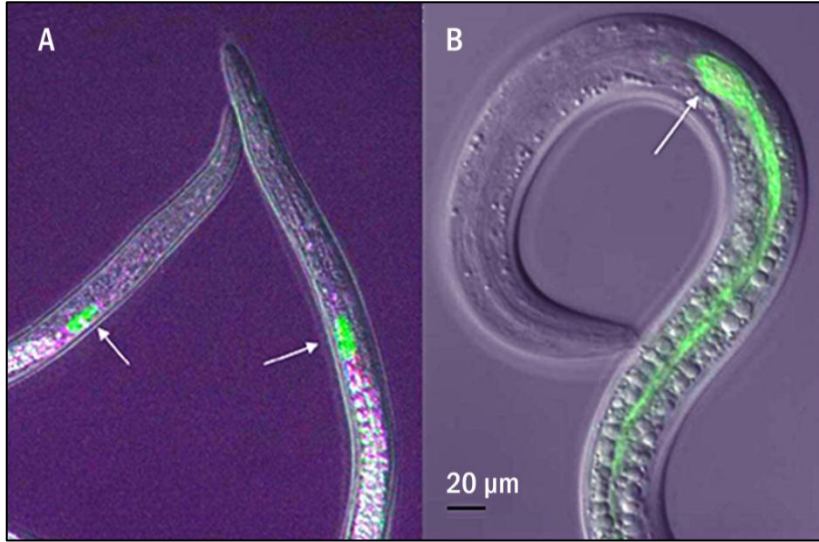
Simbiyotik Bakteri Türü	İlişki Olduğu EPN Türleri*
<i>X. beddingii</i>	<i>S. longicaudum</i>
<i>X. bovienii</i>	<i>S. affine, S. feltiae, S. intermedium, S. kraussei, S. weiseri</i>
<i>X. budapestensis</i>	<i>S. bicornutum, S. ceratophorum</i>
<i>X. cabanillasii</i>	<i>S. riobrave</i>
<i>X. doucetiae</i>	<i>S. diaprepesi</i>
<i>X. ehlersii</i>	<i>S. longicaudum</i>
<i>X. griffiniae</i>	<i>S. hermaphroditum</i>
<i>X. hominickii</i>	<i>S. kariii, S. monticulum</i>
<i>X. indica</i>	<i>S. thermophilum, S. abbasi</i>
<i>X. innexi</i>	<i>S. scapterisci</i>
<i>X. japonica</i>	<i>S. kushidai</i>
<i>X. koppenhoeferi</i>	<i>S. scarabaei</i>
<i>X. kozodoii</i>	<i>S. arenarium, S. apuliae</i>
<i>X. mauleonii</i>	<i>Steinernema sp.</i>
<i>X. miraniensis</i>	<i>Steinernema sp.</i>
<i>X. nematophila</i>	<i>S. carpocapsae</i>
<i>X. poinarii</i>	<i>S. glaseri, S. cubanum</i>
<i>X. romanii</i>	<i>S. puertoricense</i>
<i>X. stockiae</i>	<i>S. siamkayai</i>
<i>X. szentirmaii</i>	<i>S. rarum</i>
<i>P. luminescens</i> subsp. <i>luminescens</i>	<i>H. bacteriophora</i>
<i>P. luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	<i>H. indica</i>
<i>P. luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i>	<i>H. bacteriophora</i>
<i>P. luminescens</i> subsp. <i>kayaii</i>	<i>H. bacteriophora</i>
<i>P. luminescens</i> subsp. <i>thracensis</i>	<i>H. bacteriophora</i>
<i>P. temperata</i>	<i>H. zealveica, H. bacteriophora, H. megidis</i>
<i>P. temperata</i> subsp. <i>temperata</i>	<i>H. megidis</i>

\* Referanslar: Akhurst, 1983; Boemare ve Akhurst, 1988; Boemare ve ark., 1993; Brunel ve ark., 1997; Fischer-Le Saux ve ark., 1998, 1999; Hazır ve ark., 2004; Sicard ve ark., 2004; Lengyel ve ark., 2005; Adams ve ark., 2006; Somvanshi ve ark., 2006.

### 1.3.2. Entomopatojen Nematod-Bakteri Kompleksinin Hayat Döngüsü

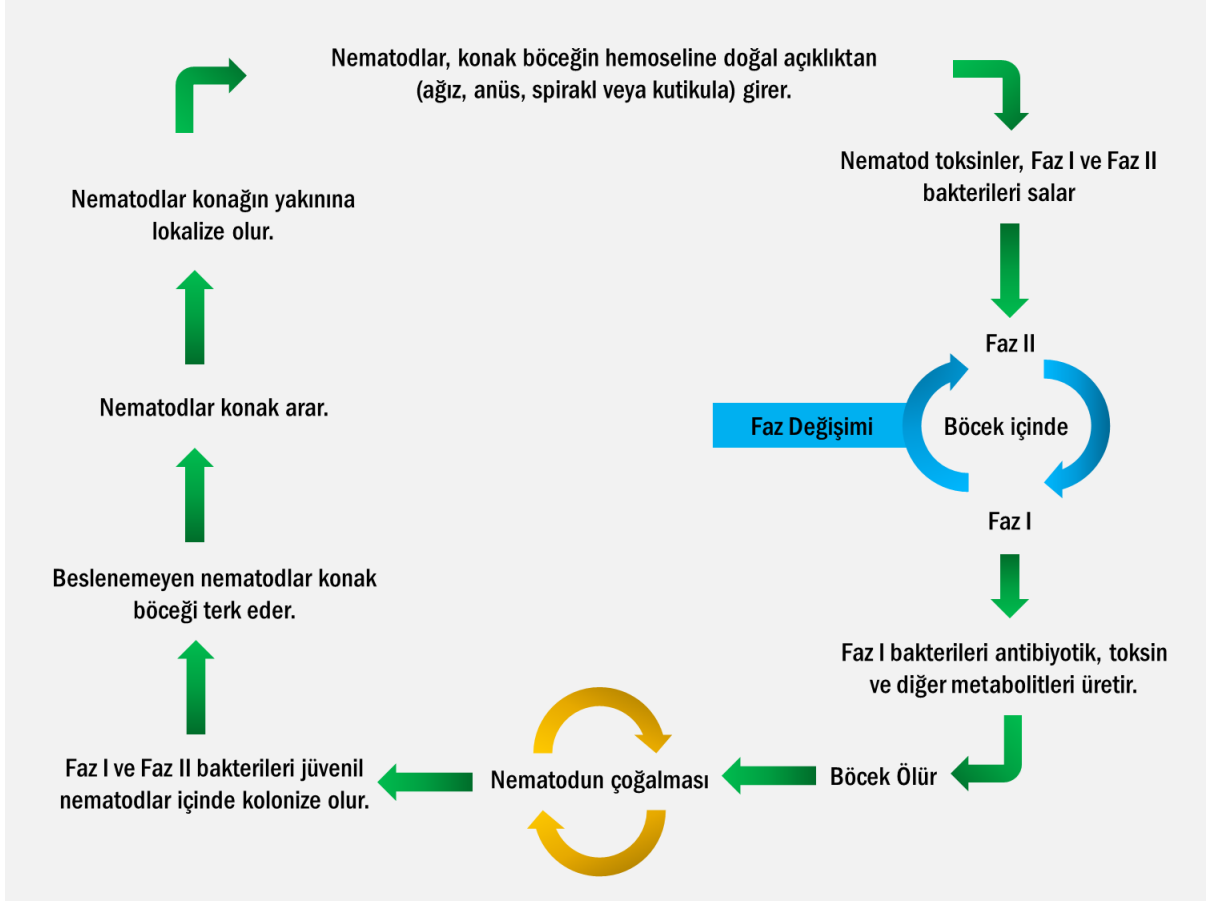
Nematod juvenilleri doğal açıklıklardan konağa girer veya konak tarafından yenilir. Konak doğal yollardan ölene ve saprofitik bakteriler tarafından işgal edilene kadar

nematodlar durgun halde bekler. Daha sonra nematod, saprofitik bakteriler tarafından çürütülen konak kadavrasıyla beslenerek gelişimini ve çoğalmasını sağlar. Hayvanlarda parazitlik oluşturmak üzere özelleşmiş böylesi bir simbiyotik ilişki, sadece entomopatojen nematodlara özeldir (Şekil 8) (Burnell ve Stock, 2000). *Steinernema* cinsi nematodlar *Xenorhabdus* cinsi bakterilerle (Thomas ve Poinar, 1979), *Heterorhabditis* cinsi nematodlar *Photorhabdus* cinsi bakterilerle (Boemore ve ark., 1993) simbiyotik olarak ilişkilidir. *Xenorhabdus* bakterileri, Steinernematidlerin İJ'lerinin anterior bölgesindeki özel bir vezikül içinde yer alırken, *Photorhabdus* bakterileri Heterorhabditidlerin İJ'lerinin bağırsağının anteriore göre 1/3'lük kısmında yoğun olmak üzere bağırsağa yayılmış durumdadır (Şekil 7) (Forst ve ark., 1997).



Şekil 7. Simbiyotik bakterilerin nematod vücudundaki lokalizasyonu. A: *Xenorhabdus nematophila*'nın *S. carpocapsae*'nin İJ'inin özel bir vezikülü içindeki lokalizasyonu, B: *Photorhabdus luminescens*'in *H. bacteriophora*'nın bağırsağının üst bölümündeki lokalizasyonu (Ciche ve ark., 2006).





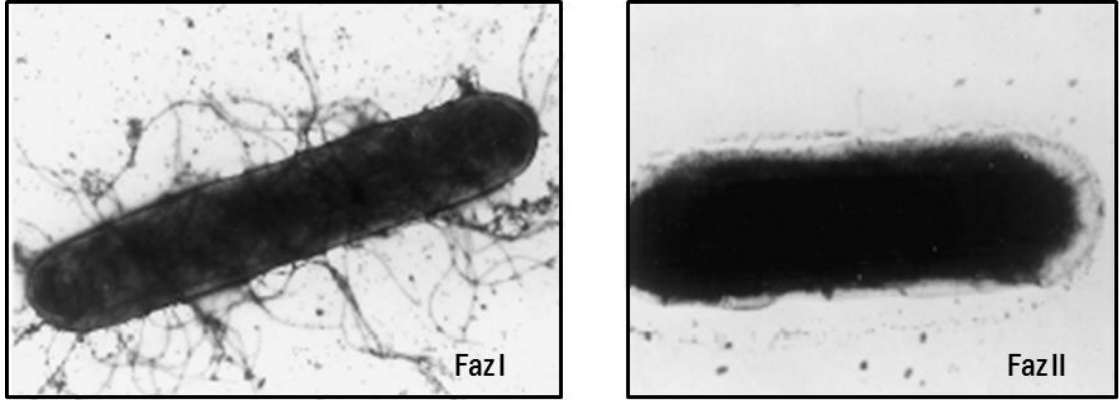
Şekil 8. Entomopatojen nematod-simbiyotik bakteri hayat döngüsünün şematik gösterimi (Owuama, 2001).

Foretik ilişki, bir organizmanın yeni bir besin ortamına ve habitata ulaştıklarında konukçusunu terk etmesi olayına denir. İnfektif juveniller toprakta serbest halde yaşarken, simbiyotik olarak ilişkili oldukları bakterilerle foretik ilişkilidir. Bu foretik ilişki sırasında nematod bağırsağındaki bakteriler, dış çevreden korunurlar ve nematod bakteriyi başka bir konağa taşımak için bir vektör gibi görev yapar (Ciche ve ark., 2006). İJ'ler konağın vücut boşluğuna ulaşabilmek için ince kütikülü, dokuları ve mukus sıvısı gibi doğal bariyerleri geçmek zorundadır. Bunları yapabilmek için nematodlar fiziki güç kullanırlar. Örneğin, vücutlarını ince kütikülden içeriye iterler ya da Heterorhabditis'lerde olduğu gibi ağızlarında terminal olarak yerleşmiş dişler ile bunu gerçekleştirebilirler (Koppenhöfer, 2000). İnfektif juveniller proteolitik salgılar ile doku içerisinde kendilerine yol açabilirler (Peters ve Ehlers, 1997).

Böceklerin immün sistemi humoral ve hücrel faktörlerin integrasyonu ile oluşur. Nematodları elimine etmek için ise kapsül içerisine alma davranışı gösterirler. Bunu

melanizasyon izler. Ancak, nematodlar da bu savunma sistemine karşı kendilerini koruyacak özellikler geliştirmişlerdir. Buna enkapsülasyon adı verilmektedir. Bu durum tam bilinmemekle birlikte, nematod kutikulünün yapı ve kimyasıyla ilgili olabileceği düşünülmektedir (Koppenhöfer, 2000). *S. glaseri*, *Popillia japonica* larvasında tanınıp kapsül içerisine alınmasına rağmen, bu kapsülün içinden kaçıp kurtulabilmektedir (Wang ve ark., 1995). Bir başka çalışmada ise *Heterorhabditis* infektif juvenillerinin penetrasyon esnasında J2 kutikulünü geride bırakarak *Tipula oleracea* larvalarında kapsül içine alınmaktan kurtuldukları tespit edilmiştir (Peters ve Ehlers, 1997).

İJ'ler simbiyotik bakterileri enfeksiyonun ilk yarım saati ile ilk 5 saati arasında konak hemoseline salarlar (Ciche ve Ensign, 2003). Simbiyotik bakteriler hemosele salındığında konak immün sistemi tarafından fagosite edilebilir, cecropin gibi antimikrobiyal peptitler tarafından yaralanabilir veya granülositler tarafından nodül içine alınabilirler (Ciche ve ark., 2006). Nematod ve bakteri beraberce konağın immün sistemini etkisiz hale getirirler. Nematodlar böcekler tarafından oluşturulan antibakteriyal toksinleri parçalayan maddeler de üretirler. *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* türlerinin bazı suşları çok yüksek virülansa sahiptir. Öyle ki, 10'dan daha az bakteri hücrenin, *Galleria mellonella* ve *Mveuca sexta* gibi duyarlı böcek türlerinin hemoseline injekte edilmesi, bu böceklerin hızlı bir şekilde ölmesi için yeterlidir (Poinar ve Thomas, 1967; Forst ve ark., 1997). Bu bakteriler sıvı kültürlerde üretildikleri zaman, kültür ortamına yüksek virülansa sahip insektisidal toksinler salarlar. Bakterilerin salgılamış oldukları parçalayıcı enzimler, böcek dokusunu parçalayarak nematodun gelişimi için zengin bir besin ortamı oluşturur (Burnell ve Stock, 2000). Simbiyotik bakteriler ayrıca infekte konağı saprofitik mikroorganizmalar, bakteriyovor nematodlar ve ayrıştırıcı böcekler gibi organizmaların istilasından korumak için antibiyotik ve antifungal bileşikler üretirler (Boemare ve ark., 1996).



Şekil 9. *Xenorhabdus nematophilla* türü bakterilerde Faz I ve Faz II evrelerinin elektron mikroskop görüntüleri. Faz I evresinde flagellaya sahip olan nematode Faz II flagellasını kaybeder.

*Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterileri, faz-I ve faz-II adı verilen farklı fenotipik formlar oluştururlar. Bunlardan faz-I, nematodlarla doğal ilişkide olan formdur. Faz-I hücreleri faz-II hücrelerinden daha büyüktür ve oldukça farklı bir koloni morfolojisi gösterirler (Şekil 9) (Boemore, 2002). Faz-I formu, faz-II formuna göre çok fazla miktarda ekzoenzim, toksin ve antibiyotik üretirler. Faz-I bakteriler belirli boyaları absorblarlar ve büyük yapıli kristal proteinler üretirler. Fazlar arasındaki patojenite farklılığı farklı konaklar üzerinde test edilmiştir (Volgyi ve ark., 1998). Bazı çalışmalar bunun her zaman geçerli olmadığını belirtse de (Ehlers ve ark., 1990; Volgyi ve ark., 1998) genel görüş faz-I bakterilerinin *in vitro* nematod üretiminde faz-II'lere göre daha etkili oldukları yönündedir (Akhurst ve Boemare, 1990; Boemare ve ark., 1996; Forst ve ark., 1997). Faz-II formu bakterilerin bu simbiyotik ilişkideki rolü açık değildir. Faz değişiminin moleküler mekanizmalarla yönetildiği düşünülmektedir (Burnell ve Stock, 2000).

*Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterileri şimdiye kadar topraktan hiç izole edilememiştir. Nematod olmaksızın toprak ortamında hayatta kalamayacakları düşünülmektedir. Morgan ve ark. (1997) *X. nematophila* ve *P. luminescens*'nin genetik olarak işaretlenmiş suşlarını steril olmayan toprak ortamına uygulamışlar ve 7 gün sonra hücrelerin sayısının tespit edilebilir seviyenin altına düştüğünü belirlemişlerdir. Bleakley ve Chen (1999), *P. luminescens*'in besin gereksinimleri eklenmiş ve steril edilmiş toprağa uygulandığında 30 gün hayatta kalabildiğini göstermiştir.

Tablo 5. EPN ve simbiyotik bakteri ilişkisindeki hayat döngüsü

Evre	Nematodun yaşam döngüsü	Bakterinin yaşam döngüsü
I	Toprakta yaşayan infektif juvenil nematodlar konak böceğin anal açıklığından ve kutikulasından doğrudan içeri girer.	Bakteriler EPNnin bağırsağında bulunur.
II (Erken)	EPNler böceğin hemoseleinde gelişmeye başlarlar. Dişi ve erkek EPNler oluşur.	EPNlerde bulundaki bakteriler böceğin hemolemine salınır. Bakteri tarafından virülans faktörleri üretilir. Sonuçta böcek ölür.
II (Geç)	EPNler çoğalırlar.	Bakteriler durguna faza geçer. Bakteri tarafından antibiyotik, ekzoenzim ve kristal proteinleri üretilir.
III	Yeni infektif juveniller gelişir.	Bakterileri infektif juvenillerin bağırsağında kolonize olurlar.

### 1.3.3. Simbiyotik Bakterilerin Sistematığı

*Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* spp. bakterileri, Enterobacteriaceae familyasına ait, hareketli, Gram negatif, fakültatif anaerob ve çubuk morfolojili organizmalardır. *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterileri penisilin ve beta-lactam antibiyotiklerine karşı dirençlidirler. Bakteriyosin üretirler. Nitratı nitrite indirgeyemezler. %G+C oranları 43-44'tür (Akhurst, 1980; Forst ve Nealson, 1996). İki bakteri cinsi arasındaki en belirgin farklılık *P. luminescens* izolatlarının biyolojik ışımaya (Bioluminescens) yapabiliyor; *Xenorhabdus*'ların yapamıyor olmasıdır. Ayrıca *Photorhabdus*'larda katalaz (+), *Xenorhabdus*'lar ise katalaz (-)'dirler.

### 1.4. Entomopatojen Nematodların Moleküler Karakterizasyonu ve Tanımlanması

Günümüzde Entomopatojen nematodların moleküler karakterizasyonu üç farklı şekilde yapılmaktadır. Bunlar;

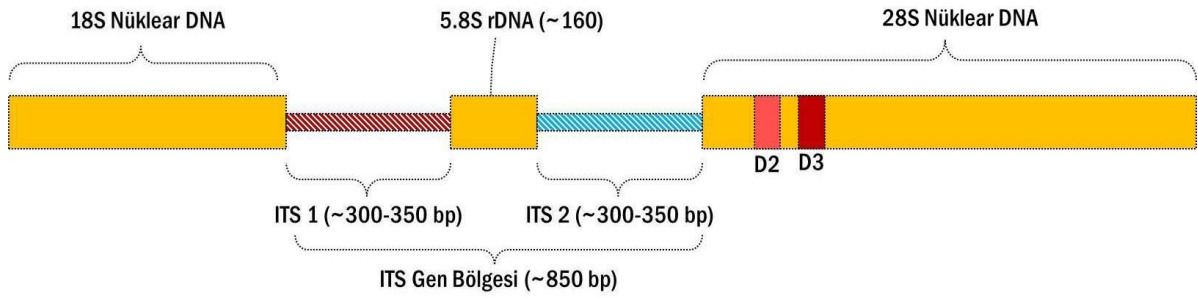
#### 1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

2. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)
3. PCR'a dayalı DNA dizi analizi

#### 1.4.1. ITS: Internal Transcribed Spacer

PCR'a dayalı dizi analizi yöntemlerinde son yıllarda seçilmiş hedef bölgelerin biri ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgeleridir. Bu bölge, bakterilerde 16S ve 23S rRNAları kodlayan genler arasında bulunan bir diziden oluşmaktadır (Alpaslan 2003).

Ökaryotik organizmalar 2 tane ITS bölgesi içerirler. ITS1 18S-5.8S genleri arasında, ITS2 ise 5.8S-28S genleri arasında bulunur (Şekil 10).



Şekil 10. 18S-28S nüklear ribozomal DNA (nrDNA)'ın Internal Transcribed Sequence (ITS) bölgesi (White ve ark. 1990).

Entomopatojen nematodların, 18S-28S nüklear ribozomal DNA bölgelerinde bulunan ITS bölgesini PCR ile çoğaltan ilk primer 1982 de Curen ve arkadaşları tarafından tasarlanmıştır. 1992 yılında Vrain ve arkadaşları tarafından ITS bölgesini çoğaltan bir başka primer tasarlanmıştır. ITS bölgeleri için kullanılan bu primerler günümüze kadar birçok çalışmada başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Ribozom 28S alt biriminde bulunan D2 ve D3 domainlerinin nükleotid sıraları, nematodların türünü belirlemede kullanılmaktadır. 2000 yılında Courtright ve arkadaşları, D2 ve D3 bölgeleri için tasarladıkları primerler yardımıyla ilk kez farklı canlıları taksonomik olarak gruplandırmayı başardılar.

Tablo 6. Entomopatojen nematodların sahip olduğu ITS gen bölgeleri ve D2D3 gen bölgeleri için kullanılan primerler.

<b>Primer adı</b>	<b>Primer sırası</b>
Vrain ITS forward	TTGATTAGGTCCCTGCCCTTT
Vrain ITS reverse	TTTCACTCGCCGTTACTAAGG
Curen ITS forward	GTTTCCGTAGGTGAACCTGC
Curen ITS reverse	ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT
D2D3 forward	ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG
D2D3 reverse	TCGGAAGGAACCAGCTACTA

### 1.5. Tezin Amacı

Günümüzde özellikle zararlı böcekleri mücadele altına almak için kimyasal insektisitlerin yerini biyolojik mücadele etmenleri almaya başlamıştır. Çevre dostu bu etmenler içerisinde entomopatojen nematodlar çok önemli bir grup olarak göze çarpmaktadır. Bu tez kapsamında, entomopatojen nematodların Doğu Karadeniz Bölgesi içerisinde yer alan Trabzon ili Değirmendere ve Altındere havzalarından alınan toprak örneklerinden elde edilen EPN izolatlarını tanımlamak, karakterize etmek ve bölgede zarar yapan bazı böcek türleri üzerindeki insektisidal etkilerini belirlemek amaçlanmıştır. Bu sayede özellikle bölgede zarar yapan yerel zararlılara karşı etkili ve güvenilir bir şekilde kullanılabilecek bir biyolojik kontrol ajanının tespit edilmesi hedeflenmiştir.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae)'nin Laboratuvar Ortamında Beslenmesi

Topraktan entomopatojen nematodların izolasyonunda kullanılan en yaygın yöntem, duyarlı bir konağı toprak içerisine bırakarak enfekte olmasını sağlamaktır. Bedding ve Akhurst (1975), özellikle büyük mum güvesi olarak bilinen *Galleria mellonella* larvalarının son evrelerini kullanarak topraktan entomopatojen nematodların kolaylıkla izole edilebildiğini göstermiştir. Bu, son yıllarda topraktan entomopatojen nematod izolasyonunda en çok kullanılan yöntemdir (Steiner, 1996; Yoshida ve ark., 1998; Mracek ve ark., 1999; Stock ve ark., 1999; Boff ve ark., 2000).

Büyük bal mum güvesinin laboratuvar ortamında çoğaltılması Gouge (1997)'nin yöntemi değiştirilerek gerçekleştirildi. Primer kültür olarak larvalar, Giresun'un Çanakçı ilçesindeki arıcılardan temin edildi. Böcek kültürleri plastik kaplar (15 × 8,5 × 6 cm) içerisinde 25-28 °C sıcaklıkta yapay besinle beslenerek oluşturuldu. Yapay besin olarak, 300 gr. buğday unu, 100 ml bal, 100 ml gliserol ve 50 gr. kuru mayadan hazırlanan karışım kullanıldı. Larvaların hazırlanan yapay besinle beslenerek pupa olması sağlandı. İki hafta sonra pupadan çıkan güvelerin kabın kenarlarına bıraktıkları yumurtalar dikkatlice toplanarak içinde yapay besin bulunan beslenme kaplarına transfer edildi. Besinler haftalık olarak yenilendi. Yaklaşık 30-45 gün sonunda son evreye ulaşan büyük bal mum güvesi larvaları kaplardan alındı. Kaplardan toplanan son evre larvalar, gelişimlerini durdurmak, ağ ve pupa oluşturmalarını engellemek için bir akvaryum kepçesi içinde 55-58 °C'deki su banyosunda 10-15 saniye tutuldu. Bu işlemde hemen sonra oda sıcaklığındaki su içerisinde 10 saniye tutularak larvaların ölmesi engellendi. Hemen kullanılmayacak larvalar içinde odun talaşı bulunan kaplarda 10-15 °C'de iki hafta canlı halde muhafaza edildi.

### 2.2. Toprak Örneklerinin Alınması

Trabzon ili Değirmendere Vadisi'nden başlayarak Altındere Milli Parkı ve Cami Boğazı Yaylasına kadar olan çeşitli lokalite ve yüksekliklerden 20 Mart ve 17 Kasım 2009

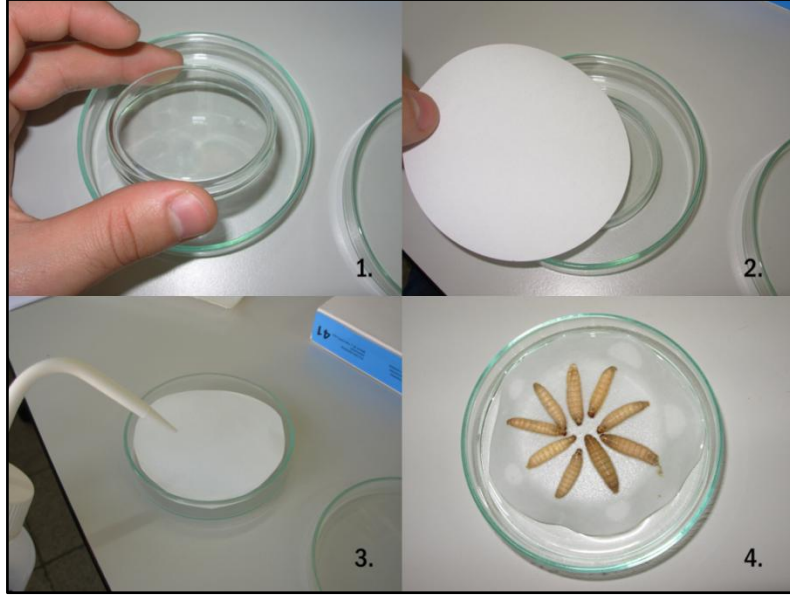
tarihleri arasında rastgele yerlerden 98 toprak örneği alındı (Griffin ve ark., 2000). Örnekler, toprağın üst yüzeyi temizlendikten sonra 20 cm derinliğe kadar kazılarak alındı (Sturhan ve Liskova, 1999; Mracek and Becvar, 2000). Her 100 m<sup>2</sup>'lik alan içinden 3-8 toprak örneği olacak şekilde toplam 1 kg alındı ve iyice karıştırıldı (Stock ve ark., 1999). Örnek alınan lokaliteler arasında arazinin durumuna göre 5-10 km mesafe bırakıldı. Örneklerdeki su kaybını en aza indirmek için toprak örnekleri polietilen kaplarda soğutucu içinde laboratuara getirildi. Toprak alınan yerdeki enlem ve boylam dereceleri, yükseklik ve habitat bilgileri gibi veriler kaydedildi.

### 2.3. Topraktan Entomopatojen Nematodların İzolasyonu

Toprak örneklerinden entomopatojen nematod izolasyonunda böcek tuzak yöntemi kullanıldı. Alınan 1 kg toprak örneği iyice karıştırılarak 200 gr'lık kısmı kapaklı plastik kutulara (12 × 10 × 6 cm) yerleştirildi. Her bir kutuya son evre yedi *Galleria mellonella* larvası yerleştirildi ve larvalar toprağın altında kalacak şekilde kutular ters çevrildi (Bedding and Akhurst, 1975; Stock et al., 1999). Kutular 22-25 °C'de 10 gün etüv içinde inkübe edildi. Üç günde bir kontroller yapılarak ölü larvalar kutulardan çıkarıldı.

Ölü böceklerden, enfeksiyon özelliğine sahip juvenil nematodları izole etmek için White Trap yöntemi kullanıldı (White, 1927). Bu yöntemde 55 mm çapında bir petri kabı ters çevrilerek 100 mm çapındaki başka bir petri kabının içine yerleştirildi. Küçük petri kabının üzerine nemlendirilmiş bir filtre kağıdı konuldu ve ölü larvalar filtre kağıdının üzerine bırakıldı. İki petri kabı arasında kalan boşluğa 10 ml steril su ilave edildi ve büyük petri kabının kapağı kapatıldı (Şekil 11). Yeni nesil nematodlar üreyip konağı terk ettikten sonra bu filtre kağıdı üzerinde hareket ederek büyük petri kabındaki suya doğru yönelir. Bu suyun alınması durumunda nematodların sadece infektif juvenil evreleri elde edilmiş olur. Juvenil nematodların ölü böcek kadavralarını terk edip suya geçip geçmedikleri günlük kontrol edildi.





Şekil 11. Enfekte böceklerden White Trap yöntemiyle entemopatojen nematodların izolasyonu. 1. İç içe geçmiş büyük ve küçük petri kapları, 2. Filtre kağıdının konulması, 3. Saf su eklenmesi, 4. Enfekte olmuş larvalar.

#### 2.4. Entomopatojen Nematod İzolatlarının White Trap'dan Toplanması ve Yıkınması

Entomopatojen nematodların konağı terk edip suya geçmesi 10-15 günlük bir süre aldığı için suya geçen infektif juveniller bir pipet yardımıyla iki günlük aralıklarla bir hafta boyunca toplandı. Toplanan süspansiyonlar 25 ml'lik cam beherlere alındı ve üstüne steril distile su eklendi. Yirmi dakika boyunca nematodların dibе çökmesi için beklendi ve daha sonra üst kısımda kalan su pipet yardımıyla dikkatlice uzaklaştırıldı. Her seferinde behere steril distile su eklendi ve bu işlem 3-5 kez tekrar edilerek nematodlar yıkandı (Wood-ring ve Kaya, 1988).

#### 2.5. Nematodların *In vivo* Üretilmesi

Elde edilen entomopatojen nematod izolatlarının infektivite özelliğini doğrulamak ve izolatları çoğaltmak için *Galleria mellonella* larvaları bu nematodlarla enfekte edildi. Elde edilen nematod süspansiyonlarından ml'de 200 canlı infektif juvenil olacak şekilde

örnekler hazırlandı. Hazırlanan süspansiyondan 1'er ml alınarak dip kısmında 9 cm Whatman # 41 filtre kağıdı bulunan 9 cm'lik petrilere yayıldı. Daha sonra petriye 10 adet son evre *G. mellonella* larvası eklendi. Petri kabı kapatılarak parafilm ile sarıldı ve 22 °C'de karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Enfeksiyondan 5 gün sonra tipik nematod enfeksiyonu semptomları gösteren böcekler White trap'a alındı (Stock, 1997).

## 2.6. Nematodların Depolanması

Nematod kültürleri hücre kültür flaskları içersinde steril distile su içinde, süspansiyon halinde 10-15 °C'de ve tamamen karanlık bir ortamda muhafaza edildi. Konsantrasyon ml'de yaklaşık 2000 infektif juvenil olacak ve derinlik 1 cm'yi geçmeyecek şekilde ayarlandı. Nematod kültürleri her ay *in vivo* olarak çoğaltılarak yenilendi (Wooding ve Kaya, 1988).

## 2.7. Entomopatojen Nematodların Tür Teşhislerinin Yapılması

### 2.7.1. Morfometrik Özelliklerin Belirlenmesi

Entomopatojen nematodların morfolojik ve morfometrik olarak incelenmesi için her bir izolatın erkek, dişi ve infektif juvenil bireylerinden kalıcı preparatlar hazırlandı. Bu amaçla, nematodlar *G. mellonella* larvaları nematodlarla enfekte edildi. Enfeksiyondan sonraki 4-8 gün sonra ölü larvalar stereo mikroskop altında diseksiyonu yapıldı. Dişi ve erkek nematodlar kadavralardan toplandı ve çukur cam kaplarda sıcak TAF (2 ml Triethanolamine, 7 ml % 40 lık Formalin ve 91 ml saf su) solüsyonunda fiske edildi. TAF solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra kap içerisine Solüsyon I (99 birim: % 4'lük formalin, 1 birim: gliserin) konuldu ve içerisinde % 96 lik etanol olan desikatöre konulduktan sonra sıcaklığı 40 °C olan ortamda bir gün bekletildi. İkinci gün desikatörden çıkarılan kaplar Solüsyon I yerine Solüsyon II (95 birim: % 96'lık etanol ve 5 birim: gliserin) eklendi ve 40 °C sıcaklıkta kapların üçte ikisi kapalı olacak şekilde bir gün bekletildi. Bu süre boyunca her iki saatte bir azaldıkça Solüsyon II eklendi. Gün bitiminde Solüsyon II yerine Solüsyon III (50 birim: %96'lık etanol ve 50 birim:

gliserin) eklenerek içerisinde  $\text{CaCl}_2$  bulunan desikatörde oda sıcaklığında bir gün boyunca bekletildi. Fikse edilen nematodlar Seinhorst (1959)'a göre gliserol içine alınarak kalıcı preparatlar oluşturuldu.

Nematodları morfolojik ve morfometrik olarak tanımlamak için Steinernematid izolatlarından 20'şer birinci jenerasyon erkek ve infektif juvenil bireylerinden hazırlanan preparatlar çizim tüpü ve kameralı Olympus BX50 ışık mikroskobu altında incelendi.

Toplam vücut boyu, vücut genişliği, salgı poru ve sinir halkasının anterior kısımdan uzaklığı, özafagusun boyu, kuyruk uzunluğu, anüs genişliği, vücut oranları (a, b, c, c', D, E), spikül ve gubernakulum'un uzunluğu ve genişliği gibi çeşitli morfolojik ve morfometrik özellikler ölçüldü. Yapılan gözlem ve ölçümler literatürdeki bilgilerle karşılaştırılarak izolatlar uygun taksonomik gruplara yerleştirildi (Stock ve Kaya 1996; Hominick ve ark., 1997).

## **2.7.2. Moleküler Özelliklerin Belirlenmesi**

### **2.7.2.1. DNA İzolasyonu**

Her izolatın sadece bir dişi veya juvenil bireyinden DNA izolasyonu Joyce ve arkadaşlarına (1994) göre değiştirilerek yapıldı. Her izolat için bir örnek 10  $\mu\text{l}$  worm lizis tamponu (500 mM KCl, 100 mM Tris-Cl pH 8,3, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM DTT, % 4,5 Tween 20, % 0,1 jelatin) içinde parçalandı. Hazırlanan homojenat, içinde 10  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O ve 2  $\mu\text{l}$  proteinaz K (600  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) bulunan Eppendorf tüplerine eklendi. Tüpler -80 °C'de 10 dakika bekletildikten sonra sırasıyla 65 °C'de 1 saat ve 95 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Karışım 13000 g'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra DNA'nın bulunduğu süpernatant alınarak -20 °C'de muhafaza edildi. İzole edilen DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu spektrofotometrede ölçüldü.

### 2.7.2.2. PCR ile rRNA ITS Bölgesinin Çoğaltılması

18S ve 28S rRNA alt üniteleri arasında kalan ITS1, 5.8S ve ITS2 bölgelerinin PCR ile çoğaltılması için ileri primer olarak 18S (5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3') ve geri primer olarak 28S (5'-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3') kullanıldı (Vrain ve ark., 1992).

PCR reaksiyonu için 5 µl DNA süspansiyonu, 5 µl (10X) PCR tamponu, 2 µl MgCl<sub>2</sub> (10mM), 1 µl dNTP karışımı (her birinden 10 mM), her bir primerden 0,3 µl (500 nM), 0,4 µl *Taq* DNA polimeraz (5U/µl) ve dd H<sub>2</sub>O ile son hacim 50 µl'ye tamamlandı. PCR koşulları 94 °C'de 6 dakikalık denatürasyondan sonra 94 °C'de 1 dakika, 55 °C'de 2 dakika ve 72 °C'de 2 dakika şeklinde 35 döngü tamamlandı. Son olarak 72 °C'de 10 dakika bekletilerek eksik kalan reaksiyonların tamamlanması sağlandı (Phan ve ark., 2005).

PCR reaksiyonundan sonra oluşan üründen 5 µl alınarak, 0.5 µg/ml etidium bromür katkılı %1'lik agaroz jelde 90 V'de 1 saat elektroforez edildi (Phan ve ark., 2005). Geri kalan PCR ürünleri Promega Wizard SV Gel ve PCR Clean-Up System kitiyle saflaştırıldı.

### 2.7.2.3. PCR ile 28S rRNA D2/D3 Alt Ünitesi'nin Çoğaltılması

28S rRNA içinde yer alan D2-D3 alt ünitelerinin PCR ile çoğaltılması için ileri primer olarak D2A (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3') ve geri primer olarak D3B (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3') kullanıldı (Joyce ve ark., 1994).

PCR reaksiyonu için 5 µl DNA süspansiyonu, 5 µl 10x PCR tamponu, 2 µl MgCl<sub>2</sub> (10mM), 1 µl dNTP karışımı (her birinden 10 mM), her bir primerden 0,3 µl (500 nM), 0,4 µl *Taq* DNA polimeraz (5U/µl) ve dd H<sub>2</sub>O ile son hacim 50 µl'ye tamamlandı. PCR koşulları 95 °C'de 5 dakikalık denatürasyondan sonra 94 °C'de 30 saniye, 55 °C'de 45 saniye ve 72 °C'de 45 saniye şeklinde 39 döngü tamamlandı. Son olarak 72 °C'de 8 dakika bekletilerek eksik kalan reaksiyonların tamamlanması sağlandı.

PCR reaksiyonundan sonra oluşan üründen 5 µl alınarak, 0.5 µg/ml etidium bromür katkılı %1'lik agaroz jelde 90 V'de 45 dakika elektroforez edildi (Phan ve ark., 2005). Geri kalan PCR ürünleri Promega Wizard SV Gel ve PCR Clean-Up System kitiyle saflaştırıldı.

#### 2.7.2.4. PCR Ürünlerinin Klonlanması ve DNA Analizi

PCR ürünleri pGEM-T Easy vektörüne kaynaştırıldıktan sonra *Escherichia coli* DH 10 $\beta$  hücrelerine elektrotransformasyon yapıldı. Klonlanan plazmitler Promega Wizard “Minipreps DNA Purification System” kitiyle tekrar izole edilip, DNA dizi analizi için Macrogen (Kore) firmasına gönderildi. Elde edilen veriler gen bankasında bulunan verilerle karşılaştırıldı (Spiridonov ve ark., 2004).

#### 2.7.2.5. DNA Dizi Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Filogenetik Analiz

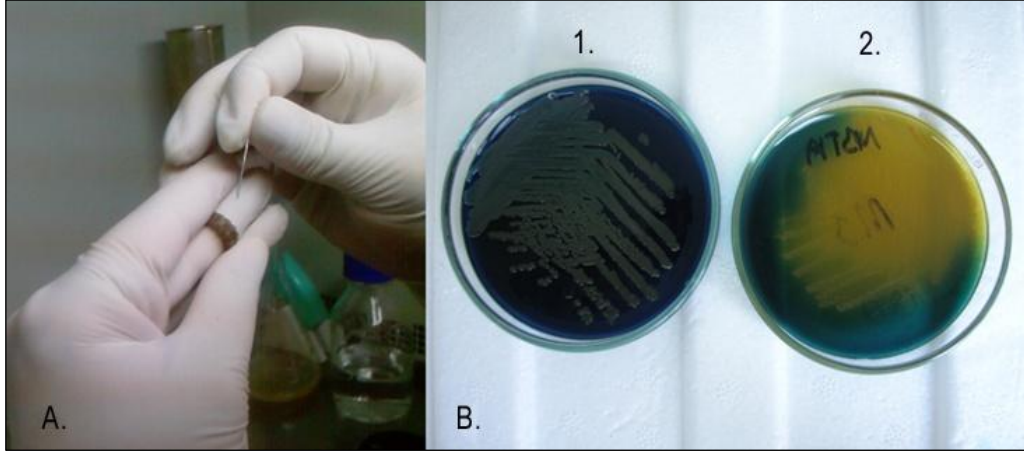
DNA dizi sonuçları Clustal X programında eşleştirilerek baz dizileri, izolatlar arası, tür içi ve türler arası seviyede karşılaştırıldı. Eşleştirilmeler GeneDoc programında düzenlendi. Filogenetik ilişkiler PAUP 4.0 programı kullanılarak tespit edildi ve Bootstrap ağaçlar oluşturuldu.

### 2.8. Entomopatojen Nematodlarla Simbiyotik Olarak İlişkili Bakterilerin Tanımlanması

#### 2.8.1. Simbiyotik Bakterilerin İzolasyonu

Entomopatojen nematodlarla simbiyotik olarak ilişkili olan bakteriler, nematodlar tarafından enfekte edilen *G. mellonella* larvalarının hemolenfinden Poinar (1975)’a göre izole edildi. Beş adet son evre *G. mellonella* larvası, tabanı Whatman kağıdı ile kaplanmış büyük boy petri kaplarına yerleştirildi. Daha sonra her bir petri kabına 200 IJ/ 500  $\mu$ l distile su olacak şekilde nematodlar eklendi. Petri kapları parafilmle sarılarak karanlık ortamda oda sıcaklığında 72-96 saat bırakılarak enfeksiyonun gerçekleşmesi beklendi. Nematodlarla enfekte olmuş *G. mellonella* larvalarının arka ayaklarından steril iğne ile deldikten sonra hemolenften alınan sıvılar, içinde NBTA (Nutrient agar + %0.0025 bromthymol blue + %0.004 triphenyltetrazoliumchloride) bulunan petriyer üzerine yayma ekim yapıldı ve 28 °C’de 48-72 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından Faz-I bakterileri besiyeri içindeki bromthymol mavisini absorladığı için mavi renkli koloniler oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 12) (Boemare ve ark., 1996). Mavi renkli koloniler dikkatlice seçilerek

TSA besiyerine ekim yapıldı. Bu şekilde saflaştırılan bakteriyal izolatlardan %20'lik gliserol içinde stok kültürler oluşturuldu. Elde edilen bakteriyal izolatlar üzerinde yapılan tüm tanımlama çalışmaları Faz-I bakteriler kullanılarak yapıldı.



Şekil 12. Nematod ile enfekte olan larvalardan simbiyotik bakteri izolasyonu. (A) Enfekte olmuş böceklerin hemolenfinden bakteri izolasyonu. (B.1) Bromthymol mavisini absorblayan Faz I bakterileri. (B.2) Kontrol grubu (*Staphylococcus aureus*).

### 2.8.2. Simbiyotik Bakterilerin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Simbiyotik bakterilerin bazı biyokimyasal özellikleri, çeşitli karbon kaynaklarını kullanıp kullanmadıklarına bakılarak tespit edildi. Farklı karbon kaynaklarından hazırlanmış besiyeri ortamına konulan bakterilerin, bu karbon kaynakların kullanıp kullanmadıklarına bakıldı. Bunun için farklı karbon kaynağı içeren Nutrient Broth besiyerlerine ekim yapılarak 28 °C de 14-18 saat inkübasyonu yapıldı. Büyüme sonrasında ihtiyacı olanlarda farklı ayraçlar kullanarak diğerlerinde ise farklılıkları gözleyerek sonuçlar belirlendi.

### 2.8.3. Simbiyotik Bakterilerin Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi

#### 2.8.3.1. Simbiyotik Bakterilerden DNA İzolasyonu

Bakteriyal izolatlardan DNA izolasyonu yapmak için TSB içinde gece kültürleri yapıldı. Hücreler santrifüjle çöktürüldü ve besiyeri uzaklaştırıldı. DNA izolasyonu Genomik DNA İzolasyon kitiyle (Promega) üretici firma prosedürüne göre yapıldı.

#### 2.8.3.2. Simbiyotik Bakterilerin 16S rRNA Gen Bölgelerinin Çoğaltılması

Bakteriyal izolatları moleküler olarak tanımlamak için 16S rRNA bölgesinin DNA dizisi kullanıldı. Bu bölge PCR ile çoğaltılması için ileri primer olarak 62 5'-ACGGGCGGTGTGTACAAG-3' ve geri primer olarak 18F 5'-AGAGTTTGATCITGGCTCAG-3' kullanıldı. PCR reaksiyonu için 5 µl DNA süspansiyonu, 5 µl 10x PCR tamponu, 2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl dNTP karışımı (her birinden 10 mM), her bir primerden 0,5 µl (500 nM), 1,5 ünite *Taq* DNA polimeraz ve 36 µl ddH<sub>2</sub>O karıştırılarak, son hacim 50 µl'ye tamamlandı. PCR koşulları 95 °C'de 2 dakikalık denatürasyondan sonra 40 döngü 94 °C'de 30 saniye, 55 °C'de 45 saniye ve 72 °C'de 1 dakika şeklinde gerçekleştirildi. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 90 Voltta 45 dakika elektroforez edildi. Jel görüntüleme sistemiyle görülen bantlar bistüri yardımıyla dikkatlice jelden kesilerek çıkartıldı. Jelden kesilip alınan PCR ürünleri "Promega Wizard SV Gel" kitiyle saflaştırıldı ve DNA dizi analizi yaptırıldı. DNA dizileri çift yönlü olarak okutularak gen bölgesinin tüm dizisi elde edildi. DNA dizi sonuçları Chromas 14 programında birleştirildi ve gen bankasındaki verilerle karşılaştırıldı.

### 2.9. Entomopatojen Nematodların Zararlı Böcekler Üzerindeki İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

Entomopatojen nematod izolatların farklı böcek türleri üzerindeki insektisidal etkilerini belirlemek ve bunların biyolojik mücadelede kullanılma potansiyellerini tespit etmek amacıyla Doğu Karadeniz Bölgesinde zarar oluşturan üç böcek (*Agrotis segetum*,

*Gryllotalpa gryllotalpa*, *Agriotes spp.*) seçildi. Bu zararlı böcekler seçilirken hayat döngülerinin en az bir evresinde toprakla ilişkili olmasına dikkat edildi.

### **2.9.1. Entomopatojen Nematodların *Agrotis segetum* (Denis & Schiff.) (Lepidoptera: Noctuidae) Üzerindeki İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi**

Deneylerde kullanılan *Agrotis segetum* (Bozkurt) larvaları böcek istilasına uğramış tütün alanları ve sebze bahçelerinden toplandı ve laboratuara getirildi. Biyotest için kullanılan IJ nematodlar, *Galleria mellonella* larvalarında *in vivo* olarak çoğaltıldı ve depolandı. Kullanılan nematod kültürlerinin en fazla 3 haftalık olmasına dikkat edildi.

Entomopatojen nematod izolatlarının bozkurt üzerindeki insektisidal etkilerini belirlemek için yapılan biyotest çalışmaları Kaya ve Stock (1997) ve Ansari ve arkadaşlarının (2003) yöntemleri değiştirilerek gerçekleştirildi. Bir nematod türü için biyotest çalışmaları 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarından 5 tekamlı üç farklı sayıda nematod olacak şekilde ve bir kontrol grubu olmak üzere toplam 270 larva kullanıldı. Her bir kuyucuğa (3 cm çapında) 10 gr. steril edilmiş dere kumu ile karıştırılmış toprak dolduruldu. Üçlü grup için her birinin içerisine 1000 IJs/300 µl, 3000 IJs/300 µl ve 5000 IJs/300 µl distile su olacak şekilde infektif juveniller eklendi. Kontrol grubu için ise her kuyucuğa sadece 300 µl distile su ilave edildi. Daha sonra her bir kuyucuğa bir *A. segetum* larvası eklendi. Bu aşamada kültür kaplarının kapakları kapatıldı, buharlaşmayı engellemek için Parafilmle sarıldı ve 25 °C'ye ayarlı etüvde karanlık ortamda 10 gün bekletildi. Sonuçlar günlük takip edildi. Ölü larvalar kaptan çıkartılarak Stereo mikroskop altında diseksiyon yapıldı ve ölümün nematod enfeksiyonundan olup olmadığı belirlendi.

### **2.9.2. Entomopatojen Nematodların *Gryllotalpa gryllotalpa* (L.) (Orth.: Gryllotalpidae) Üzerindeki İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi**

Deneylerde kullanılan *Gryllotalpa gryllotalpa* (Danaburnu) erginleri Trabzon ili Akçaabat ilçesi sebze bahçelerinden toplandı. Plastik kaplar içinde laboratuara getirilen *G. gryllotalpa* erginleri, deneyler başlayana kadar patates ile beslendi. Biyotestlerde kullanılacak IJ nematodlar, *Galleria mellonella* larvalarında *in vivo* olarak çoğaltıldı ve depolandı. Kullanılan nematod kültürlerinin en fazla 3 haftalık olmasına dikkat edildi.



Entomopatojen nematod izolatlarının danaburnu böceği üzerindeki insektisidal etkilerini belirlemek için yapılan biyotest çalışmaları Kaya ve Stock (1997) ve Ansari ve arkadaşlarına (2003) göre değiştirilerek yapıldı. Biyotest çalışmaları çapı 6 cm olan 5 tane plastik kap içerisinde 3 tekrarlı şekilde yapıldı ve her bir nematod izolatu için 15 böcek, üç farklı sayıda nematod olacak şekilde ve 15 kontrol kabı olmak üzere toplam 135 ergin böcek kullanıldı. Her bir kaba 20 gr steril edilmiş dere kumu ile karıştırılmış toprak dolduruldu. Üçlü grup için her birinin içerisinde 1000 IJs/1000 µl, 3000 IJs/1000 µl ve 5000 IJs/1000 µl distile su olacak şekilde infektif juveniller eklendi. Kontrol grubu için ise her kuyucuğa sadece 1000 µl distile su ilave edildi. Daha sonra her bir kuyucuğa orta boyda *G. gryllotalpa* erginleri konuldu. Bu aşamada kaplarının kapakları kapatıldı, buharlaşmayı engellemek için Parafilmle sarıldı 25 °C'ye ayarlı etüvde karanlık ortamda 10 gün bekletildi. Larvaların ölüp ölmediği günlük takip edildi. Ölü larvalar kaptan çıkartılarak Stereo mikroskop altında diseksiyon yapıldı ve ölümün nematod enfeksiyonundan olup olmadığı kontrol edildi.

### **2.9.3. Entomopatojen Nematodların *Agriotes* spp. (Col: Elateridae) Üzerindeki İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi**

Deneylerde kullanılan *Agriotes* spp. (Tel kurdu) larvaları Trabzon ilindeki sebze bahçelerinden toprak kazılarak toplandı. Plastik kaplar içerisinde laboratora getirilen larvalar deneyler başlayıncaya kadar toprak içerisinde oda sıcaklığında tutuldu. Biyotestlerde kullanılacak IJ nematodlar, *Galleria mellonella* larvalarında *in vivo* olarak çoğaltıldı ve depolandı. Kullanılan nematod kültürlerinin en fazla 3 haftalık olmasına dikkat edildi.

Entomopatojen nematod izolatlarının tel kurdu böceği üzerindeki insektisidal etkilerini belirlemek için yapılan biyotest çalışmaları Kaya ve Stock (1997) ve Ansari ve arkadaşlarına (2003) göre değiştirilerek yapıldı. Bir nematod türü için, biyotest çalışmaları 6 cm olan 3 tane plastik kap içerisinde 3 tekrarlı şekilde yapıldı ve her bir nematod izolatu için 9 böcek, üç farklı sayıda nematod olacak şekilde ve dokuz kontrol kabı olmak üzere toplam 81 ergin böcek kullanıldı. Her bir kuyucuğa (3 cm çapında) 10 gr. steril edilmiş dere kumu ile karıştırılmış toprak dolduruldu. Üçlü grup için her birinin içersine 1000 IJs/300 µl, 3000 IJs/300 µl ve 5000 IJs/300 µl distile su olacak şekilde infektif juveniller eklendi. Kontrol grubu için ise her kuyucuğa sadece 300 µl distile su ilave edilmiştir. Daha

sonra her bir kuyucuğa bir *Agriotes* spp. larvası eklendi. Bu aşamada kültür kaplarının kapakları kapatıldı, buharlaşmayı engellemek için Parafilmle sarıldı 25 °C'ye ayarlı etüvde karanlık ortamda 10 gün bekletildi. Larvaların ölüp ölmediği günlük takip edildi. Ölü larvalar kaptan çıkartılarak Stereo mikroskop altında diseksiyon yapıldı ve ölümün nematod enfeksiyonundan olup olmadığı kontrol edildi.

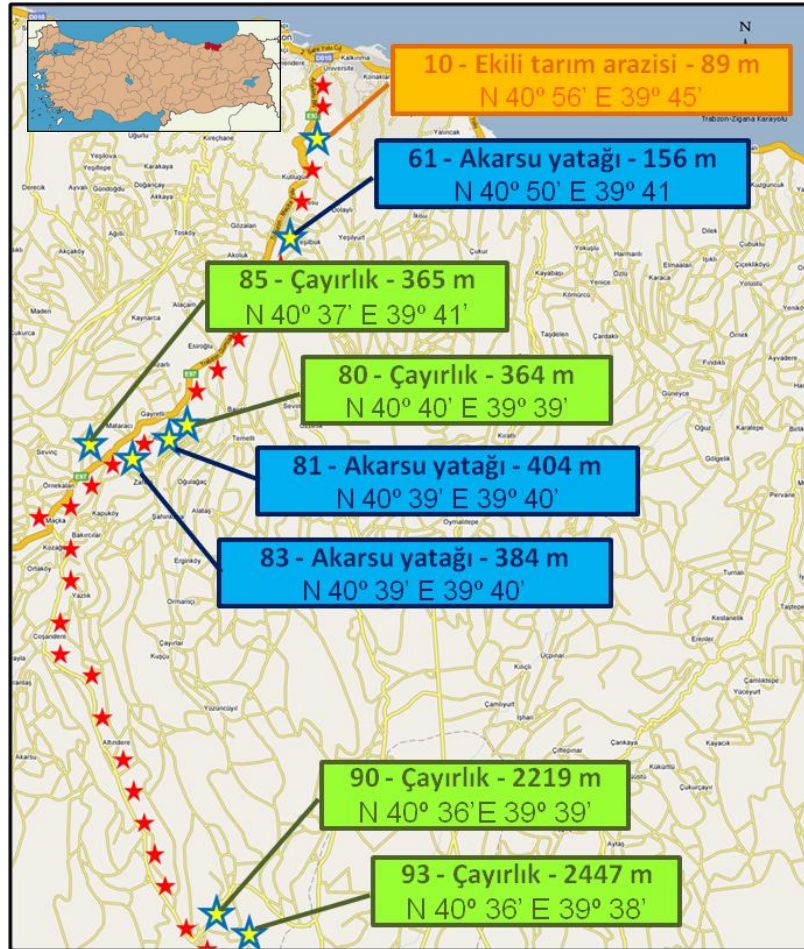
### **2.10. Farklı Sıcaklık Derecelerinin İnfektivite ve Nematod Gelişimi Üzerine Etkilerinin Tespit Edilmesi**

Altı gözlü doku kültür kaplarının her bir gözüne 2 gr steril ince kum dolduruldu. Bu çukurlardan her birinin içerisine 100 IJs/100 µl olacak şekilde infektif juveniller eklendi (Koppenhöfer ve Kaya, 1999). Her izolat için 4 kültür kabı kullanıldı. Bu çalışma için 4°C, 10°C, 15°C, 28°C ve 37°C, 40°C'sıcaklık dereceleri seçildi. Nematod eklenerek hazırlanan kaplar sıcaklık ayarlaması için 1 saat süreyle uygulanacak sıcaklık derecelerinde tutuldu. Bu süre sonunda kapların her bir gözüne bir *Galleria mellonella* larvası konularak kapaklar kapatıldı. Deney düzeneğinin nem miktarı sabit kalsın diye kültür kapları, plastik torbalar içerisinde deney sıcaklıklarında bekletildi. Kontrol grubu olarak gözeneklere sadece 100 µl distile su konulup daha sonra her gözeneğe bir *Galleria mellonella* larvası eklendi. Hazırlanan bu ortamların kurummasını önlemek için deney düzeneği plastik torbalar içerisine yerleştirildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Toprak Örneklerinin Toplanması ve Entomopatojen Nematodların İzolasyonu

Trabzon ili Değirmendere Vadisi ve Altındere Milli Parkı'ndan deniz seviyesinden 2447 m yüksekliğe kadar farklı alanlardan rastgele olarak seçilen 98 yerden toprak örnekleri alındı (Şekil 13). Toplam 98 alandan Galleria tuzak yöntemiyle 8 farklı entomopatojen nematod izolasyonu gerçekleştirildi (Tablo7). İzolatların 6 tanesi Değirmendere havzasından, 2 tanesi ise Altındere Milli Parkı'ndan gerçekleştirildi.



Şekil 13. Trabzon ili Değirmendere Vadisi ve Altındere Milli Parkı'ndan nematod izolasyonu için alınan toprak örneklerinin yerleri.

Alınan 98 toprak örneğinin 14 tanesi ekili tarım arazisinden, 25 tanesi akarsu yatağından, 52 tanesi çayırılık alanlardan ve 7 tanesi ormanlık alanlardan toplandı. Ekili tarım arazisinden alınan 14 toprak örneğinden 1 tane, akarsu yatağından alınan 25 toprak örneğinden 3 tane, çayırılık alanlardan alınan alınan 52 toprak örneğinden 4 tane entomopatojen nematod izole edilmiştir. Ayrıca, ormanlık alanlardan alınan 7 tane toprak örneğinden ise entomopatojen nematod tespit edilmemiştir.

Tablo 7. Entomopatojen nematodların izole edildiği toprak örneklerinin enlem ve boylam bilgileri.

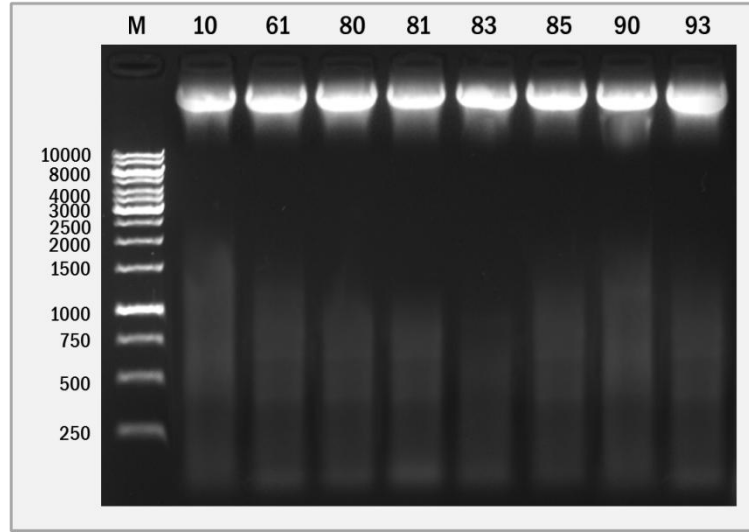
<b>İzolat numarası</b>	<b>Örnek Koordinat</b>	<b>Deniz Seviyesinden Yüksekliği (m.)</b>	<b>Örnek Ekosistemi</b>
10	N 40° 56' E 39° 45'	89	Ekili tarım arazisi
61	N 40° 50' E 39° 41'	156	Akarsu yatağı
80	N 40° 40' E 39° 39'	364	Orman kenarı ve çayırılık
81	N 40° 39' E 39° 40'	404	Akarsu yatağı ve çayırılık
83	N 40° 39' E 39° 40'	384	Akarsu yatağı ve çayırılık
85	N 40° 37' E 39° 41'	365	Çayırılık
90	N 40° 36' E 39° 39'	2219	Camiboğazı yaylası, Çayırılık
93	N 40° 36' E 39° 38'	2447	Camiboğazı yaylası merkezi, Çayırılık

\*(N: kuzey enlemi, E: doğu boylamını ifade etmektedir)

### 3.2. İzole Edilen Entomopatojen Nematodların Tür Teşhisleri

#### 3.2.1. Moleküler Özellikler

Çalışmalar sonucunda izole edilen entomopatojen nematodların genomik DNA'ların temizliği ve parçalanmamış oldukları Agaroz jel elektroforeziyle teyit edildi (Şekil 14).

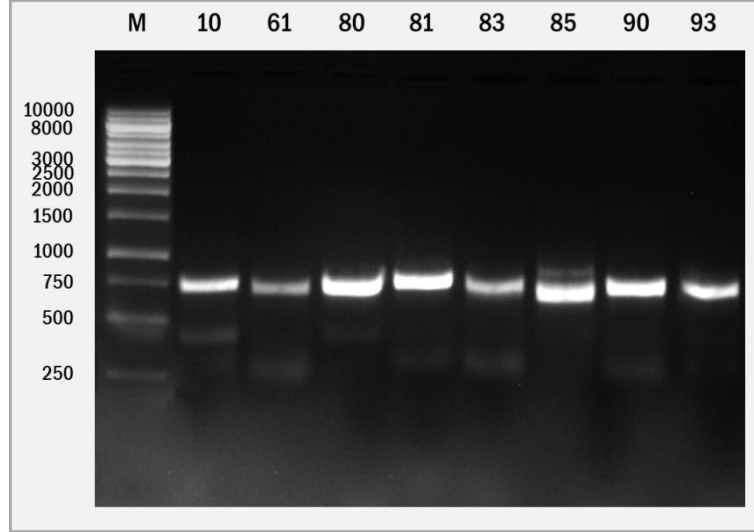


Şekil 14. İzole edilen entomopatojen nematodların genomik DNA'larının % 1'lik agaroz jel görüntüsü. M: moleküler işaretleri (1 kb), üst sıradaki rakamlar izolat numaralarını göstermektedir.

#### 3.2.1.1. Entomopatojen Nematodların ITS Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması

Nematodlardan saflaştırılan DNA örneklerinden identifikasyon amacıyla rRNA ITS dizisinin çoğaltılmasına yönelik PCR çalışmaları yapıldı. Bu çalışma için Curen ITS Primerlerini (Frw-5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') (Rw-5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') kullanarak rRNA ITS bölgeleri çoğaltıldı. İzolatlara ait DNA'lar % 1'lik agaroz jelde yaklaşık 750-850 baz çifti büyüklüğünde olduğu belirlendi (Şekil 15).

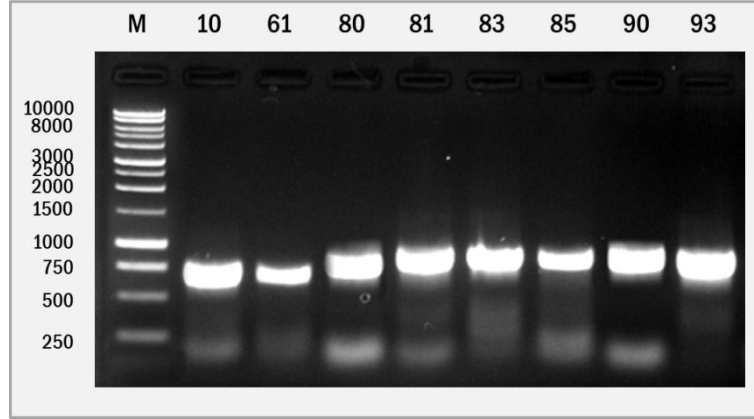
Beklenen büyüklükte ve istenilen temizlikte olduğu belirlenen PCR ürünleri sonra pGEMT-Easy klonlama vektörüne aktarıldı. Nükleotid sırasının belirlenmesi için dizin analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlar değerlendirildi. Dizinin analizi işlemi genlerin her iki tarafından olmak üzere çift yönlü gerçekleştirildi. Farklı noktalardan izole edilen 8 entomopatojen nematodun rRNA ITS bölgesinin DNA dizin analizi yapıldı (Ek 1).



Şekil 15. Entomopatojen nematodların PCR ile çoğaltılan rRNA ITS bölgesinin % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: moleküler işaretçi (1 kb), üst sıradaki rakamlar izolat numaralarını göstermektedir.

### 3.2.1.2. Entomopatojen Nematodların 28S rRNA D2/D3 Alt Ünite Bölgeleri

Genomik DNA izolasyon kiti kullanılarak saflaştırılan genomik DNA'lar ile D2D3 Primerlerini (Frw-5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3') (Rw-5'-TCGGAAGGAACC AGCTACTA-3') kullanarak izolatların 28S rRNA D2/D3 alt ünitesi PCR ile çoğaltıldı. İzolatlara ait 750-850 baz çifti büyüklüğünde DNA fragmentleri agaroz jelde görüntülendi (Şekil 16).



Şekil 16. Entomopatojen nematodların 28S rRNA D2/D3 alt ünitesinin % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: moleküler işaretçi (1 kb), üst sıradaki rakamlar ise izolat numaralarını göstermektedir.

Entomopatojen nematodların 28S rRNA D2/D3 alt ünite bölgeleri, PCR ile çoğaltıldıktan sonra pGEMT-Easy klonlama vektörüne aktarıldı. Nükleotid sırasının belirlenmesi için dizin analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlar değerlendirildi. Dizin analizi işlemi genlerin her iki tarafından olmak üzere çift yönlü gerçekleştirildi. Farklı noktalardan izole edilen 8 entomopatojen nematodun 28S rRNA D2/D3 alt ünite bölgeleri DNA dizin analizi yapıldı (Ek 2).

### 3.2.1.3. Entomopatojen Nematodların DNA Dizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Farklı noktalardan izole edilen 8 entomopatojen nematodun rRNA ITS bölgesinin (Ek 1) ve 28S rRNA D2/D3 alt ünite bölgelerinin (Ek 2) DNA dizin analizi sonrasında, baz sıraları NCBI Gen Bank'taki verilerle karşılaştırıldı. Blast sonucuna göre 8 nematodun türü tespit edildi (Tablo 8). Bu sonuçlara göre 10 numaralı izolatın *Steinernema carpocapsae*, 61, 80, 83, 85 ve 90 numaralı izolatların *Steinernema feltiae*, 81 numaralı izolatın ise *Steinernema kraussei* olduğu belirlendi. *Steinernema* cinsine ait olduğu tespit edilen 93 numaralı izolatın ise tür tayini yapılamadı.

Tablo 8. İzolatların DNA dizi analizine göre tür tayinleri.

İzolat numarası	Tür adı	ITS Bölgelerine göre		D2D3 Bölgelerine göre	
		Büüklük	Benzerlik oranı	Büüklük	Benzerlik oranı
10	<i>Steinernema carpocapsae</i>	772 bp	%99	826 bp	%99
61	<i>Steinernema feltiae</i>	772 bp	%99	819 bp	%99
80	<i>Steinernema feltiae</i>	943 bp	%99	880 bp	%99
81	<i>Steinernema kraussei</i>	767 bp	%99	873 bp	%99
83	<i>Steinernema feltiae</i>	943 bp	%99	822 bp	%99
85	<i>Steinernema feltiae</i>	772 bp	%99	795 bp	%99
90	<i>Steinernema feltiae</i>	782 bp	%99	869 bp	%99
93	<i>Steinernema</i> sp.	778 bp	%92	749 bp	%97

### 3.2.2. Morfometrik Özellikler

Çalışmalar sonucunda tespit edilen entomopatojen nematodların infektif juvenillerinin ve erkek bireylerinin morfolojik ve morfometrik ölçümleri yapıldı. Ölçümlere ait veriler Tablo 9 ve Tablo 10'da, yer almaktadır. Ölçümlere ait verilerde *S. feltiae* izolatlarından sadece birinin ölçümleri alınmıştır.



Tablo 9. İzolatların infektif juvenil bireylerinin morfolometrik ölçümleri.

İzolat numarası	L	W	EP	NR	ES	T	a	b	c	D%	E%
<b>(10)</b> <i>S. carpocapsae</i>	558	25	32	85	120	53	22	4,6	10,5	26,6	60
*İnfektif juvenil	438- 650	20- 30	30- 60	76- 99	103- 190	46- 61	19- 24	4- 4,8	9,1- 11,2	23- 28	54- 66
<b>(61)</b> <i>S. feltiae</i>	849	26	62	99	136	81	33	6,2	10,4	45,5	77
*İnfektif juvenile	736- 950	22- 29	53- 67	88- 112	115- 150	70- 92	29- 33	5,3- 6,4	9,2- 12,6	45- 51	69- 86
<b>(81)</b> <i>S. kraussei</i>	980	34	66	na	132	70	29	7,4	14	50	94
*İnfektif juvenil	797- 1102	30- 36	50- 66	99- 111	119- 145	63- 86	na	na	na	na	na
<b>(93)</b> <i>S. sp.</i>	856	25	56	94	138	80	34	6,2	9,8	48,5	70
*İnfektif juvenil	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na

\* (L: vücut uzunluğu, W: vücut genişliği, EP: anterior-boşaltım açıklığı uzaklığı, NR: anterior-sinir halkası uzaklığı, ES: Özofagus uzunluğu, T: kuyruk uzunluğu, a: L/W, b: L/ES, c: L/T, D%: EP/ES × 100, E%: EP/T × 100, \*infektif juvenil: 3. evre infektif juvenillerin en düşük ve en yüksek standart ölçütleri, na: ölçü yok).

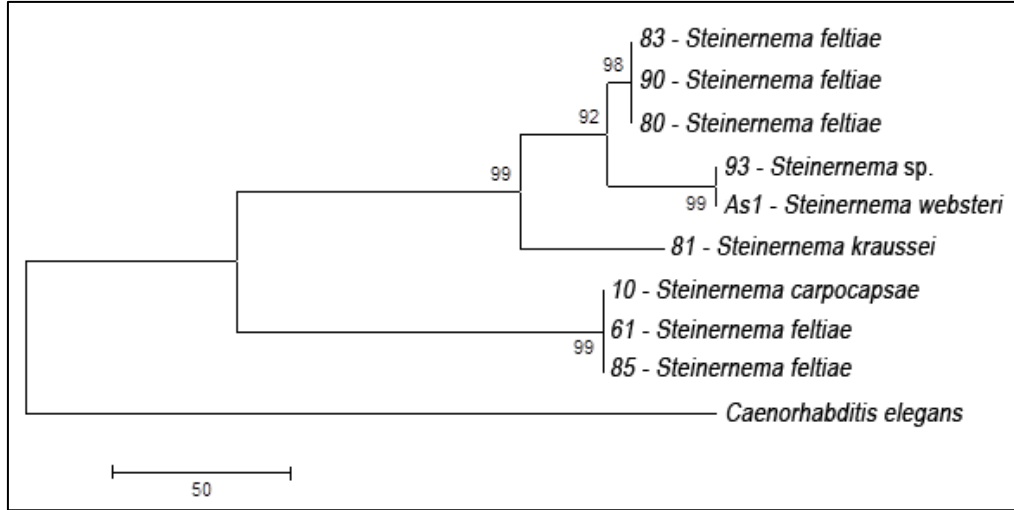
Tablo 10. İzole edilen entomopatojen nematodlardan erkek bireylerin morfometrik ölçümleri.

İzolat numarası	SL	GL	W	D%	GS	MUC
(10) <i>S. carpocapsae</i>	63	47	101	43	0,74	Var
<i>S. carpocapsae</i> için Standart ölçüler	58-77	39-55	77-130	27-55	0,59-0,88	
(61) <i>S. feltiae</i>	69	41	75	61	0,59	Var
<i>S. feltiae</i> için Standart ölçüler	65-77	34-47	60-90	na	0,52-0,61	
(81) <i>S. krausei</i>	56	35	118	52	0,62	Var
<i>S. krausei</i> için Standart ölçüler	52-57	23-38	110-144	na	na	
(93) <i>S. sp.</i>	70	40	72	57	0,57	Veri yok
<i>S. sp.</i> için Standart ölçüler	na	na	na	na	na	

\* (SL: spikül uzunluğu, GL: gubernakulum uzunluğu, W: vücut genişliği, D%: EP/ES, GS: gubernakulum uzunluğu/spikül, MUC: mukron, EP: anterior-boşaltım açıklığı uzaklığı, ES: Özofagus uzunluğu, na: ölçü yok).

### 3.3. Filogenetik Analiz

DNA dizi analizleri yapılan, entomopatojen nematodların rRNA ITS gen bölgeleri esas alınarak PAUP 4.0 (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) Filogenetik Ağaç Programı ile tespit edilen türlerin birbirleri arasındaki akrabalık derecesi belirlendi (Şekil 17). Elde edilen veriler sonucunda *Steinernema feltiae* türleri arasında coğrafik farklılıkların olduğu tespit edildi. *Steinernema krausei* türü ise tanımlamasını yaptığımız türler arasında uzak akraba olduğu görüldü. *Steinernema carpocapsae* türünün *Steinernema feltiae* türü ile benzer özellik gösterdiği ve *Steinernema sp.* türünün ise diğer tüm izolatlardan farklı olduğu tespit edildi.



Şekil 17. Türü tespit edilen entomopatojen nematodlar arasındaki akrabalık derecelerini gösteren filogenetik ağaç. Dış grup olarak *Caenorhabditis elegans* alınmıştır.

### 3.4. Entomopatojen Nematodlarla Simbiyotik Olarak İlişkili Bakterilerin Özellikleri

#### 3.4.1. Simbiyotik Bakterilerin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Entomopatojen nematodlarla simbiyotik yaşayan bakterilerin biyokimyasal özellikleri yapılan karakteristik testlerle belirlendi. Farklı karbon kaynağı içeren Nutrient Broth besiyerine bakteriler ekim yapılarak 28 °C de 14-18 saat inkübasyonu yapıldı. Buna göre elde edilen veriler Tablo 11’de yer almaktadır.

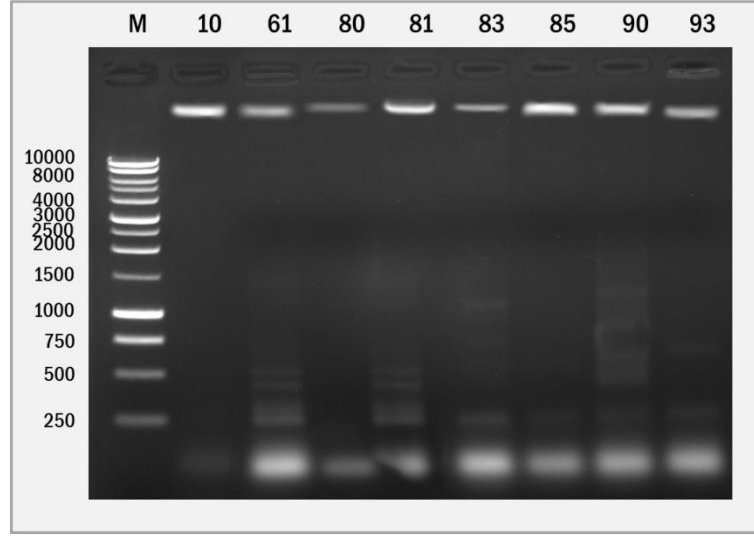
Tablo 11. İzole edilen entomopatojen nematodlarla simbiyotik yaşayan bakterilerin biyokimyasal özellikleri

<b>Bakteriyal izolatlar</b>	<b>10</b>	<b>61</b>	<b>80</b>	<b>81</b>	<b>83</b>	<b>85</b>	<b>90</b>	<b>93</b>
<b>Lipolysis</b>								
Tween 20	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 40	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 60	+	-	-	-	-	-	-	-
Tween 80	-	+	-	+	-	-	-	-
<b>Karbon kaynaklarının kullanımı</b>								
D-Riboz	Z+	Z+	Z+	Z+	Z+	Z+	Z+	Z+
D-Fruktoz	+	+	+	+	+	+	+	+
İnositol	+	Z+	Z+	-	Z+	Z+	Z+	-
D-Maltoz	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannoz	+	+	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ -Laktoz	-	-	-	-	-	-	-	-
Sitrat	-	+	+	-	+	+	+	-
<b>Diğer biyokimyasal aktiviteler</b>								
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-
Üre	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrat Redüksiyonu	-	Z+	Z+	Z+	Z+	Z+	Z+	Z+
İndol Üretimi	-	-	-	-	-	-	-	-
Jelatin Hidrolizi	+	-	-	-	-	-	-	-

(+:Pozitif, -:Negatif, Z+:Zayıf pozitif)

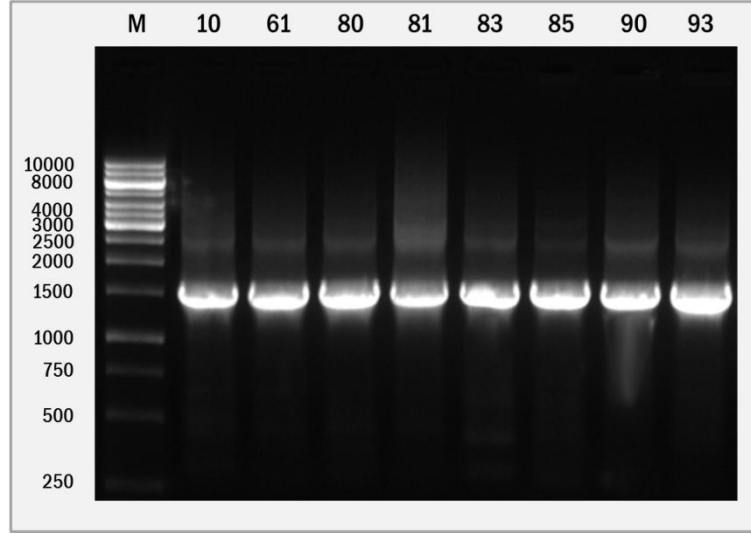
### 3.4.2. Simbiyotik Bakterilerin Moleküler Özellikleri

Çalışmalar sonucunda elde edilen entomopatojen nematodlarla simbiyotik yaşayan bakterilerden izole edilen genomik DNA'lar agaroz jel elektroforeziyle teyit edildi (Şekil 18.).



Şekil 18. Entomopatojen nematodlarla simbiyotik yaşayan bakterilerden izole edilen genomik DNA'ların % 1'lik agaroz jel görüntüsü. M: moleküler işaretçi (1 kb), üst sıradaki rakamlar izolat numaralarını göstermektedir.

Genomik DNA izolasyon kiti kullanılarak saflaştırılan genomik DNA'lar ile 16S rRNA Primerlerini (Frw-5'-ACGGGCGGTGTGTACAAG-3') (Rw-5'-AGAGTTTGATCITGGCTCAG-3') kullanarak simbiyotik bakterilerin 16S rRNA gen bölgeleri PCR ile çoğaltıldı. Bakterilere ait yaklaşık 1500 baz çifti büyüklüğünde DNA fragmentleri, agaroz jelde görüntülendi (Şekil 19).



Şekil 19. Entomopatojen nematodlarla simbiyotik yaşayan bakterilerde PCR ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgesinin % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: moleküler işaretçi (1 kb), üst sıradaki rakamlar ise izolat numaralarını göstermektedir.

Entomopatojen nematodlarla simbiyotik yaşayan bakterilerin 16S rRNA gen bölgesi, PCR ile çoğaltıldıktan sonra Promega pGEMT-Easy klonlama vektörüne aktarıldı. Nükleotid sırasının belirlenmesi için dizin analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlar değerlendirildi. Dizin analizi işlemi genlerin her iki tarafından olmak üzere çift yönlü gerçekleştirildi. Farklı noktalardan izole edilen 8 entomopatojen nematodun simbiyotik bakterileri 16S rRNA gen bölgesinin DNA dizin analizi tamamlandı (Ek 3).

Farklı noktalardan izole edilen 8 entomopatojen nematodun simbiyotik bakterileri 16S rRNA bölgesinin DNA dizin analizi sonrasında, baz sıraları NCBI Gen Bank'taki verilerle karşılaştırıldı. Blast sonucuna göre türü tespit edilen bakteriler Tablo 12'de belirtilmiştir.

Tablo 12. İzole edilen entomopatojen nematodlarla simbiyotik yaşayan bakterilerin rRNA gen dizilerinin benzerlik oranları

İzolat	Simbiyotik Bakteri	İzole edildiği Entomopatojen Nematod	Büyükük	Benzerlik oranı
10	<i>Xenorhabdus nematophila</i>	<i>Steinernema carpocapsae</i>	1467 bp	%99
61	<i>Xenorhabdus bovienii</i>	<i>Steinernema feltiae</i>	1370 bp	%99
80	<i>Xenorhabdus bovienii</i>	<i>Steinernema feltiae</i>	1474 bp	%99
81	<i>Xenorhabdus bovienii</i>	<i>Steinernema kraussei</i>	1484 bp	%99
83	<i>Xenorhabdus bovienii</i>	<i>Steinernema feltiae</i>	1511 bp	%99
85	<i>Xenorhabdus bovienii</i>	<i>Steinernema feltiae</i>	1498 bp	%99
90	<i>Xenorhabdus bovienii</i>	<i>Steinernema feltiae</i>	1559 bp	%99
93	<i>Xenorhabdus bovienii</i>	<i>Steinernema</i> sp.	1441 bp	%99

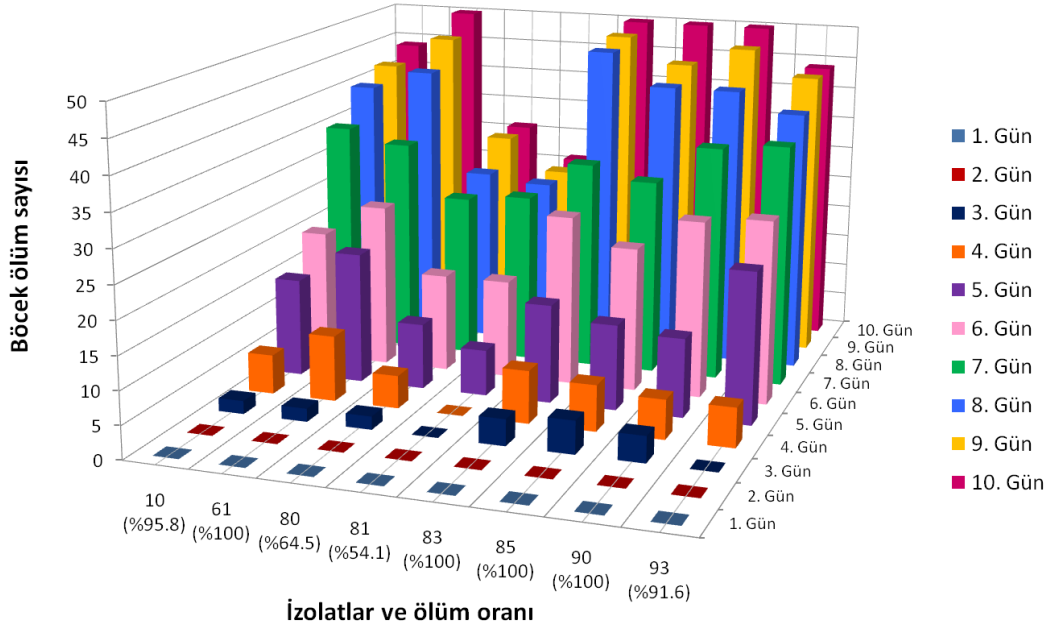
### 3.5. Entomopatojen Nematodların Zararlı Böcekler Üzerindeki İnsektisidal Etkileri

#### 3.5.1. Entomopatojen Nematodların *Agrotis segetum* (Denis & Schiff.) (Lepidoptera: Noctuidae) Üzerindeki İnsektisidal Etkileri

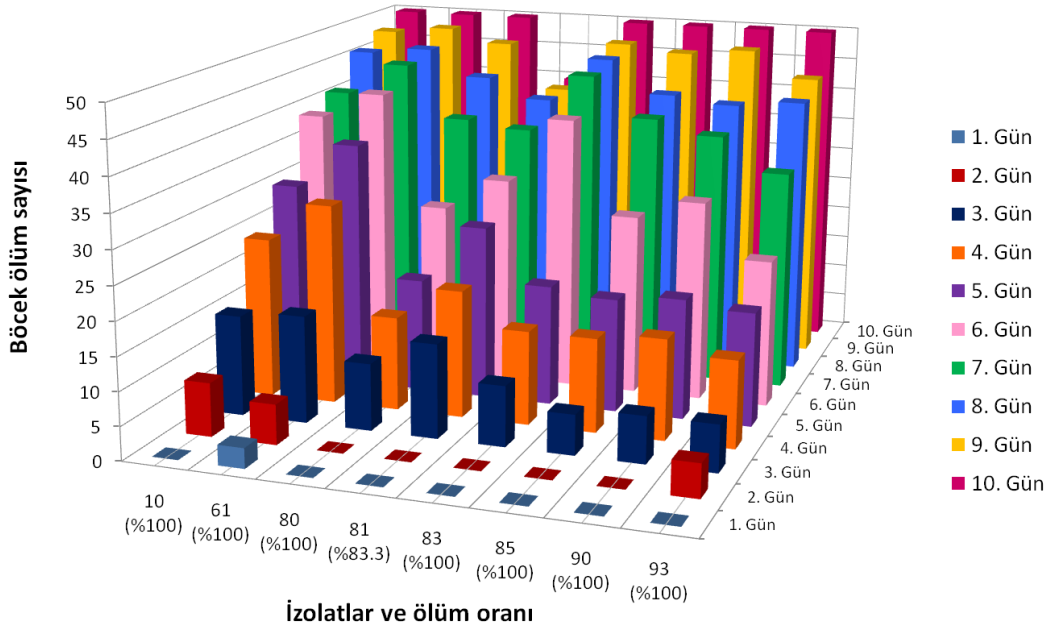
İzole edilen nematodlara ait infektif juvenillerin oranı 1000 IJs/300µl olacak şekilde sayıldıktan sonra *Agrotis segetum* böceğinin larvaları üzerinde yapılan insektisidal aktivite sonuçlarında nematodlar, 10 numaralı izolat için %95,8; 80 numaralı izolat için 64,5; 81 numaralı izolat için 54,1; 93 numaralı izolat için 91,6; ve 61, 83, 85, 90 numaralı izolatlar için %100 oranlarında etki göstermiştir (Şekil 20).

3000 IJs/300µl oranındaki infektif juvenil ile enfekte edilen *Agrotis segetum* böceğinin larvaları üzerinde yapılan insektisidal aktivitesi sonuçlarında nematodlar, 81 numaralı izolat için %83,3 ve 10, 61, 80, 83, 85, 90, 93 numaralı izolatlar için %100 oranlarında etki göstermiştir (Şekil 21).

5000 IJs/300µl oranındaki infektif juvenil ile enfekte edilen *Agrotis segetum* böceğinin larvaları üzerinde yapılan insektisidal aktivitesi sonuçlarında nematodlar, tüm izolatlarda % 100 oranında etki göstermiştir (Şekil 22).

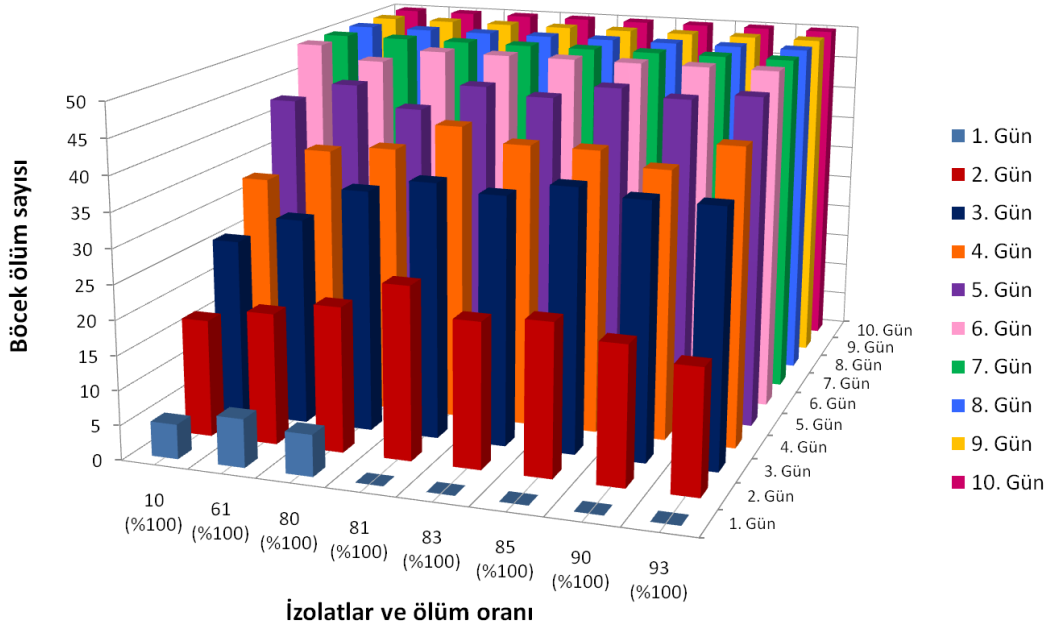


Şekil 20. İzolatların 1000 IJs/300µl oranında infektif juvenillerinin, *Agrotis segetum* (Denis & Schiff.) (Lep.: Noctuidae) üzerindeki etkileri.



Şekil 21. İzolatların 3000 IJs/300µl oranında infektif juvenillerinin, *Agrotis segetum* (Denis & Schiff.) (Lep.: Noctuidae) üzerindeki etkileri.





Şekil 22. İzolatların 5000 IJs/300µl oranında infektif juvenillerinin, *Agrotis segetum* (Denis & Schiff.) (Lep.: Noctuidae) üzerindeki etkileri.

### 3.5.2. Entomopatojen Nematodların *Grylotalpa grylotalpa* (L.) (Orth.: Grylotalpidae) Üzerindeki İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

İzole edilen nematodlara ait infektif juvenillerin oranı 1000 IJs/1000µl (Tablo 16), 3000 IJs/1000µl (Tablo 17) ve 5000 IJs/1000µl olacak şekilde sayıldıktan sonra *Grylotalpa grylotalpa* böceğinin erginleri üzerinde yapılan insektisidal aktivite sonuçlarında tüm oranlardaki nematodlarda herhangi bir etki gözlenmemiştir.

### 3.5.3. Entomopatojen Nematodların *Agriotes spp.*, (Col: Elateridae) Üzerindeki İnsektisidal Etkileri

İzole edilen nematodlara ait infektif juvenillerin oranı 1000 IJs/300µl (Tablo 19), 3000 IJs/300µl (Tablo 20) ve 5000 IJs/300µl olacak şekilde sayıldıktan sonra *Agriotes spp.* böceğinin larvaları üzerinde yapılan insektisidal aktivite sonuçlarında tüm oranlardaki nematodlarda herhangi bir etki gözlenmemiştir.

### 3.4. Farklı Sıcaklık Derecelerinin İnfektivite ve Nematod Gelişimi Üzerine Etkileri

İzole edilen 8 entomopatojen nematodun infektif juvenil evrelerinin farklı sıcaklık derecelerinin infektivite ve nematod gelişimi üzerindeki etkileri belirlendi. Sıcaklık denemelerinde izole edilen tüm infektif juvenil nematodlar, 4 °C de *Galleria mellonella* larvalarını enfekte etmediği belirlendi. 10 °C de ise yalnızca 81 numaralı izolatin enfekte ettiği, 15 °C, 28 °C ve 37 °C lerde ise tüm izolatların enfekte ettikleri belirlendi. Ayrıca 37 °C 81 numaralı izolat dışındaki nematodlarda herhangi bir değişiklik gözlenmezken bu nematodun infektif juvenil boylarında kısalma olduğu gözlemlendi. 40 °C de ise tüm izolatların enfekte etmediği belirlendi (Tablo 13).

Tablo 13. Farklı sıcaklıkların izole edilen entomopatojen nematodların infektif juvenil evrelerinin *Galleria mellonella* larvaları üzerindeki enfeksiyonuna ve nematod gelişimine etkileri.

Sıcaklık	10	61	80	81	83	85	90	93
4 °C	EY	EY	EY	EY	EY	EY	EY	EY
10 °C	EY	EY	EY	+N	EY	EY	EY	EY
15 °C	+N	+N	+N	+N	+N	+N	+N	+N
28 °C	+N	+N	+N	+N	+N	+N	+N	+N
37 °C	+N	+N	+N	+BK	+N	+N	+N	+N
40 °C	EY	EY	EY	EY	EY	EY	EY	EY

\*(+: Enfeksiyon pozitif, EY:Enfeksiyon yok, N: Normal gelişim, BK: Boyda kısalma)

#### 4. TARTIŞMA

Günümüzde zararlı böceklerle mücadelede, kimyasal ilaçların yerini biyolojik mücadele materyalleri almaktadır. Bu materyaller arasında en yaygın olanları entomopatojen organizmalardır. Bunlar; virüsler, bakteriler, protozoanlar, funguslar ve nematodlardır. Bu patojenlerin, zararlı böcekler üzerinde kullanımına bakıldığında, birbirileri arasında büyük farklılıkların olduğu görülmektedir. Bunlar arasında entomopatojen nematodların özellikle hayatlarının en az bir evresi toprakla bağlantılı olan zararlı böcek grupları üzerinde etkili olduğu bilinmektedir.

Bu tez kapsamında, Doğu Karadeniz Bölgesi Trabzon ili çevresinden alınan toprak örneklerinden elde edilen EPN izolatları tanımlamak ve karakterize etmek ve bölgede zarar yapan bazı böcek türleri üzerindeki insektisidal etkilerini belirlemek amaçlanmıştır. Bu sayede özellikle bölgede zarar yapan yerel zararlılara karşı etkili ve güvenilir bir şekilde kullanılabilen bir biyolojik mücadele etmeni tespit edilmesi hedeflenmiştir.

Entomopatojen nematodların, mikrobiyal mücadele kapsamında diğer patojenlere kıyasla avantajlı olduğu noktalar mevcuttur. Bu patojenlerin hareketli olmaları, konağını aktif olarak aramaları, dar bir konak spektrumuna sahip olmaları ve uygun olmayan koşullara kolayca uyum sağlamaları gibi özellikler bu avantajlar arasından bir kaçını sıralanabilir. Bu sebepler doğrultusunda dünyada entomopatojen nematodların kullanımına karşı ilgi gün geçtikçe artmakta, hatta entomopatojen nematodlar aktif olarak mikrobiyal mücadelede kullanılmaktadır.

Dünyada yaygın olarak kullanılan entomopatojen nematodların, adapte olmuş yaşam alanlarının bilinmesi, hangi zararlı böcek grupları üzerinde etkili olduğunun öğrenilmesi, bulunacak yeni türlerin etkilerinin tespit edilmesi ve geniş alanlara ait tür taraması çalışmalarının yapılması önem kazanmıştır. Yeni türlerin bulunması, araştırma yapılan bölgedeki entomopatojen nematodların patojen özellikleri ve zararlı böcek gruplarında etkinliklerinin tespit edilmesi bu önemlerin en temel sebebidir.

Çalışma kapsamında deniz seviyesinden başlayıp, 2400 metre yüksekliğindeki Cami Boğazı Yaylasına kadar olan değişik habitatlardan (Trabzon, Değirmendere Vadisi ve Altındere Milli Parkı) toprak örnekleri alındı (Şekil 13). Alınan toprak örneklerinden entomopatojen nematodlar izole edildikten sonra, tanımlanması, karakterizasyonu ve bazı zararlı böcekler üzerindeki etkileri tespit edildi.

Çalışması sonucunda Trabzon, Değirmendere Vadisi ve Altındere Milli Parkı'ndan alınan 98 toprak örneğinden 8 tane entomopatojen nematod izole edildi. Böylece örneklerde gerçekleşen izolasyon sıklığı %8'in üzerindedir. Bu oranın %8 üzerinde olmasının sebebinin alınan toprak örneklerinin sınırlı bir alan içerisinde ve çok sık mesafelerden alınmasından kaynaklandığı düşünülebilir.

Dünyanın birçok yerinde yürütülen çeşitli çalışmalarda entomopatojen nematodların çalışılan toprak örneklerinde bulunma oranları İskoçya'da % 2,2 (Boag ve ark., 1992), Türkiye'de % 2 ve % 4,72 (Hazır ve ark., 2003b; Özer ve ark., 1995), Portekiz'de % 3,9 (Rosa ve ark., 2000), Kore'de % 4,6 (Choo ve ark., 1995), İtalya'da % 5 (Ehlers ve ark., 1991), Etiyopya'da % 6,9 (Nguyen ve ark., 2004), Belçika'da % 8,47 (Miduturi ve ark., 1997), Endonezya'da % 11,7 (Griffin ve ark., 2000), Kosta Rika'da % 20,5 (Lorio ve ark., 2005), Arizona'da % 23,3 (Stock ve Gress, 2006), Amerika'da % 26,3 (Stock ve ark., 1999) olarak bulunmuştur. Entomopatojen nematodların elde edilme oranının yüksek olduğu çalışmalardan biri % 48,6 ile İngiltere'de (Hominick ve Briscoe, 1990), diğeri ise % 53,8 ile Çek Cumhuriyeti'nde yürütülmüş olan çalışmalardır (Mracek ve ark., 1999).

Bu tez kapsamında alınan 98 toprak örneğinden izolasyonu yapılan entomopatojen nematodlardan, 1 tanesi ekili tarım arazisinden, 3 tanesi akarsu yatağından ve 4 tanesi çayırılık alanlardan tespit edildi (Tablo 7). İzole edilen bu nematod türlerinin *Steinernema* olması, tüm dünyada olduğu gibi (Steiner, 1996) yaptığımız çalışmada da bu türlerin deniz seviyesinden yükseklerde bulunduğunu göstermiştir.

Alınan 98 toprak örneğinin 14 tanesi ekili tarım arazisinden, 25 tanesi akarsu yatağından, 52 tanesi çayırılık alanlardan ve 7 tanesi ormanlık alanlardan toplandı. Ekili tarım arazisinden alınan toprak örneklerinden 1 tane, akarsu yatağından alınan toprak örneklerinden 3 tane, çayırılık alanlardan alınan toprak örneklerinden 4 tane entomopatojen nematod izole edildi. Ayrıca ormanlık alanlardan alınan toprak örneklerinden ise entomopatojen nematod tespit edilmemiştir. Bu sayılar nematodların bulunma sıklığının ekili tarım arazisinde %7, akarsu yatağında %12, çayırılık alanlardan alınan toprak örneğinde ise %4 olduğunu göstermiştir. Yaptığımız çalışmada akarsu yataklarından alınan toprak örneklerinden izole edilen entomopatojen nematod izolasyonu ekili tarım arazisi, çayırılık ve orman alanlarına göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Entomopatojen nematodların suya bağımlı canlılar olduğu düşünüldüğünde akarsu yataklarında bulunma sıklıklarının yüksek olmasının nedenini açıklamaktadır. Ancak, bu

tür genel sonuçlara varabilmek için alınan toprak örneği ve habitat çeşitliliğinin çok daha fazla olması göz ardı edilmemelidir.

Çalışmada tespit edilen bazı türlerin ülkemizdeki ilk tespitleri 1995 yılında başlayan ve farklı bölgelerde yürütülen araştırmalarla olmuştur. Ülkemizde entomopatojen nematodlarla ilgili yapılan ilk çalışma Özer ve arkadaşlarının 1995 yılında yapmış olduğu araştırmadır. Bu çalışma süresince aldıkları 106 toprak örneğinin 5 tanesini pozitif olarak tespit etmişlerdir. Elde ettikleri 5 izolattan sadece Karadeniz Bölgesi'nde Rize'de buldukları türü, *Steinernema carpocapsae* olarak tanımlamışlardır. Ancak bu tür daha sonra Reid tarafından *Steinernema feltiae* olarak tekrar tanımlanmıştır (Hominick ve ark., 1996). Diğer dört *Steinernema* izolatu ise sadece cins düzeyinde tanımlanmıştır (Hazır ve ark., 2003b). Tüm bu çalışmaların yakın zamanda olması, ülkemizde entomopatojen nematod çalışmalarının az olması bu alanın gelecek vaad eden bir bilim dalı olduğunu göstermektedir.

Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yapılan bu araştırmada, en yaygın entomopatojen nematod türü, 8 pozitif örneğin 5'ini oluşturan *Steinernema feltiae* türüdür (Tablo 8). Bu türün, dünyada en yaygın bulunan türler olduğu daha önce yapılan çalışmalarda da belirlenmiştir (Hominick ve ark., 1996). *Steinernema feltiae* tropik bölgelerden soğuk iklimlerin hakim olduğu bölgelere kadar her yerden tespit edilmiştir ama daha çok soğuk iklim bölgelerine adapte olmuş ve genelde kıyıda uzak kesimlerden elde edilmiştir (Wright, 1992; Hominick ve ark., 1996).

Bu araştırmada deniz seviyesinden başlayıp, 2400 metre yüksekliğindeki Cami Boğazı Yaylasına kadar olan değişik habitatlardan incelemelerde bulunuldu. Yapılan bu araştırmalar sonucunda, deniz seviyesindeki entomopatojen nematod çeşitliliğinin, yüksek rakıma gidildikçe arttığı gözlenmiştir. Deniz seviyesinin bulunduğu alanların yerleşim yerleri olduğu, bu yüzden de tür çeşitliliği için yaşam alanlarının kısıtlanması, tarım alanlarının yerleşim yerleri içinde yok denecek kadar az olması ve çevre tahribatı, bunun sebepleri arasında gösterilebilir. Tüm bunların aksine Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki zengin ekosistemin tür çeşitliliği üzerinde olumlu etkisi olduğu da düşünülmelidir.

Günümüzde ribozomal RNA üzerindeki ITS bölgeleri karşılaştırılarak tespit edilen 25.000 nematod türünün moleküler identifikasyonları yapılmıştır. Ancak bilim adamları tanımlanmamış 20 milyon nematod türü daha olduğunu tahmin etmektedir (Crow 2002).

Diğer ökaryotik organizmalarda olduğu gibi entomopatojen nematodların türünü belirlemede PCR'a dayalı dizi analizi yöntemlerinde son yıllarda seçilmiş hedef bölgelerin

biri ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgeleridir. Bu bölge, bakterilerde 16S ve 23S rRNA'ları kodlayan genler arasında bulunan bir diziden oluşmaktadır (Alpaslan 2003). Ayrıca 28S rRNA üzerinde bulunan D2 ve D3 bölgelerinin dizi analizi ile de tür teşhisi yapılmaktadır (Spiridonov, 2004).

Bu tez çalışmasında elde edilen 8 tane entomopatojen nematodun DNA izolasyonu yapıldıktan sonra ribozomal bölgelerde bulunan ve 18S, 5,8S ve 28S baz dizilerini içeren ITS gen bölgeleri (Şekil 15) ile 28S baz dizisi üzerinde bulunan D2 ve D3 bölgeleri (Şekil 16) uygun primerler ile çoğaltıldı. PCR ile çoğaltılan bu gen bölgelerinin yapılan dizi analizleri sonucunda tespit edilen 8 tane entomopatojen nematodun *Steinernema* cinsine ait olduğu belirlendi (Tablo8).

Entomopatojen nematodlarda morfometrik özellikler belirlenirken erkek nematodlar üzerinde ölçümler yapılır. Aynı tür içinde erkek nematodlar (Tablo 10), morfolojik ve tipik olarak değişiklik göstermezler. Ayrıca morfolojik özellikler juvenil nematodlar üzerinde de (Tablo 9) yapılmaktadır. Morfolojik çalışmalar, enfeksiyondan sonraki 4. günden sonra yapılmalıdır. Enfeksiyonun ilk günlerinde ortamdaki juvenillerin gelişip, dişi veya erkek bireyleri oluşturması gerekmektedir. Bir haftalık kadavralarda besin miktarında azalmalar olduğundan erkek ve dişi nematodlar türlerin devamlılığı için besin olarak kendilerini feda ederler.

DNA dizi analizlerine göre belirlenen *Steinernema* cinsinin infektif juvenil bireyleri ile erkek bireylerinin morfolojik ölçümleri yapıldı. Nematodlar için tipik özellik gösteren vücut uzunluğu, vücut genişliği, anterior-boşaltım açıklığı uzaklığı, anterior-sinir halkası uzaklığı, özofagus uzunluğu, kuyruk uzunluğu ayrı ayrı ölçülerek belirlendi.

Teşhisleri yapılan türler, aynı ve farklı türlerin dişi ve erkek bireyleri ile çiftleştirme testine alınarak doğru tanımlama yapıp yapılmadığı bir kez daha kontrol edildi. Böcek kadavralarından alınan her türe ait dişi bireyler, moleküler dizi analizine göre aynı ve farklı tür olduğu belirlenen erkek bireyleri ile çiftleştirme testine alındı. *Galleria mellonella* böceğinin homoselinden alınan bir damla sıvı içerisine konulan bireylerin çiftleştirme testinde aynı türe ait olmayanlarda erkek bireyin dişi birey ile çiftleşmediği gözlemlendi.

Tür tanımlanması ve akrabalık dereceleri belirlenen entomopatojen nematodlarla simbiyotik yaşayan bakterilerin izolasyonu yapılarak NBTA besiyerinde büyümeleri sağlandı. Bakteriler, nütrient agar ile hazırlanmış bu besiyeride bulunan bromothymol blue indikatör boyasını absorblarlar. Bu boya pH 7,6 üzerinde mavi, pH 6 dan aşağıdaki pH larda sarı renge dönüşür. Entomopatojen nematodlarla simbiyotik yaşayan bakteriler

Enterobacteriaceae familyasının üyeleridir ve buldukları ortamın pH sını bazik duruma çevirirler. Bu nedenle NBTA da büyüyen simbiyotik bakterilerin oluşturdukları koloniler mavi renk alır.

Saf kültürleri elde edilen bakteri türlerinin belirlenmesi için genomik DNA'larının izolasyonları yapıldı. Daha sonra DNA'ları üzerinde bulunan 16S rRNA gen bölgeleri, 16S üniversal primerler kullanılarak PCR ile çoğaltıldı (Şekil 19). Çoğaltılan 16S rRNA gen bölgeleri, daha iyi ve güvenilir bir dizi analizi yapabilmek için Promega klonlama vektörü olan pGEMT-Easy vektörüne aktarıldı. Daha sonra bu vektörü çoğaltmak için *E. coli* DH 10 $\beta$  suşuna elektrotransformasyonu gerçekleştirildi. Klonlan plazmit vektörler sonra izole edilip baz dizilişleri belirlendi. Sonuçlara göre tespit edilen bakterilerin bir tanesi *Xenorhabdus nematophila* ve yedi tanesi ise *Xenorhabdus bovienii* olduğu tespit edildi (Tablo 12). Bu bakterilerin birden fazla nematod türü ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Fakat bir nematod türünde sadece belirli bir tür bulunduğundan, bulunan sonuçlar literatür ile karşılaştırıldı.

Tür tayinleri yapılan 8 tane entomopatojen nematodun, *Agrotis segetum* (Denis & Schiff.) (Lepidoptera: Noctuidae), *Grylotalpa grylotalpa* (L.) (Orth.: Grylotalpidae) ve *Agriotes* spp., (Col: Elateridae) türlerindeki üç farklı böcek üzerinde etkisi farklı nematod sayıları ile test edildi.

Çalışma kapsamında izole edilen 8 entomopatojen nematod ile yapılan testlerin sonuçlarına göre *Agrotis segetum* türü böcek üzerinde 1000 IJs/300 $\mu$ l infektif juvenil ile (Şekil 20) yapılan biyotest sonuçlarında %54,1-100 arasında, 3000 IJs/300 $\mu$ l infektif juvenil ile (Şekil 21) yapılan biyotest sonuçlarında 83,3-100 arasında ve 5000 IJs/300 $\mu$ l infektif juvenil ile (Şekil 22) yapılan biyotest sonuçlarında ise %100 başarı sağlanmıştır.

*Grylotalpa grylotalpa* türü böcek üzerinde 1000 IJs/1000  $\mu$ l, 3000 IJs/1000  $\mu$ l ve 5000 IJs/1000  $\mu$ l ve *Agriotes* spp. türü böcek üzerinde 1000 IJs/300  $\mu$ l, 3000 IJs/300  $\mu$ l ve 5000 IJs/300  $\mu$ l infektif juvenil ile yapılan biyotestte herhangi bir enfeksiyon gerçekleşmemiştir.

Çalışma kapsamında türü tespit edilen nematodlar, Lepidoptera grubu böceklerde enfeksiyona sebep olmaktadır. İzole edilen 8 entomopatojen nematodun Lepidoptera grubu böcekler üzerinde etkili olması beklenen bir sonuçtur. Ayrıca bu nematod türlerinin Coleoptera grubunda etkili olmadığı daha önceki literatür çalışmalarında (Poinar, 1979; Koppenhöfer ve Fuzy, 2003) olduğu gibi bir kez daha görülmüştür.

Entomopatojen nematodların büyük bölümü farklı gruplardan birçok böceği konak olarak kullanabilme özelliği taşımaktadır. *Steinernema carpocapsae*'nin farklı ordolardan 250'nin üzerinde böcek türünü enfekte ettiği bilinmektedir (Poinar, 1979). *Steinernema scarabei* gibi bazı entomopatojen nematodlar ise sadece bir tek grup üzerinde patojenite gösterebilmektedir (Koppenhöfer and Fuzy, 2003).

*Steinernema kraussei* ve *Steinernema feltiae*'nin konak dağılımına bakıldığında bu türün sadece belli bir grup üzerinde patojenite göstermeyip, farklı familyalardan böceklerde enfeksiyon oluşturduğu belirlenmiştir.

Nematodların farklı konak bulma stratejileri vardır. Türe özgü olarak nematodlarda farklı konak arama davranışları mevcuttur. Bazıları konaklarını aktif olarak toprak içerisinde arayıp bulur. Bu tür nematodlar, daha çok toprak içerisinde hareketsiz duran konakları bulmaya uygun bir davranış sergilerler. Bazıları ise dur ve bekle taktiğini kullanarak toprak içerisinde fazla hareket etmezler. Bunlar hareketli konakların yakınlarından geçmesini beklerler. Bu iki tip davranışın dışında her iki davranışı da gösterebilen bir ara grup mevcuttur. Bu guruba giren nematodlar duruma göre isterlerse konaklarını aktif olarak ararlar ya da otur ve bekle yöntemini kullanırlar (Lewis et al., 2006). *Steinernema kraussei* ve *Steinernema feltiae* grubu (IJs uzunlukları 700 µm -1000 µm) "intermediate" olarak adlandırılan bu son grup içerisinde yer almaktadır. Bunlar toprak partikülleri üzerinde "niktasyon hareketi" yapmakta ancak sıçrayamamaktadırlar. Bu yüzden *Steinernema kraussei* ve *Steinernema feltiae*'nin daha çok toprak yüzeyine yakın yerlerde bulunan konaklar üzerinde etkili bir nematod türü olduğu düşünülmektedir.

Yapılan laboratuvar denemelerinde, yüksek üreme potansiyeli ve soğuğa gösterdiği olağanüstü adaptasyonu ile *Steinernema kraussei* ve *Steinernema feltiae* iyi bir biyolojik mücadele etmeni olabilecek potansiyel göstermektedir. Bu durum özellikle toprak içerisinde larva ya da pupa şeklinde kışı geçiren böcek türleri üzerinde, etkin bir biyolojik kontrol sağlayacaktır. Ancak saha uygulamalarında, toprak ekosistemindeki karmaşık abiyotik ve biyotik etkileşimler nedeniyle, farklı sonuçların alınabileceği unutulmamalıdır.

Trabzon, Değirmendere Vadisi ve Altındere Milli Parkı'ndan alınan toprak örneklerinden izole edilen entomopatojen nematodların farklı sıcaklıklardaki infektivite oranları tespit edildi. Buna göre izole edilen entomopatojen nematodların infektivite oranının en yüksek olduğu sıcaklığın 15 ile 37 °C arasında olduğu belirlendi (Tablo 13).

Molyneux (1986), Heterorhabditis ve Steinernematid'lerin birçok izolatu ile yaptığı çalışmada Steinernematid'lerin düşük sıcaklık derecelerinde konakları bulup enfekte



etmede daha aktif olduklarını ortaya koymuştur. Buna paralel olarak kuzey-batı Avrupa'da Heterorhabditis'lerin nadiren bulunuşu düşük sıcaklığın bu grup üzerinde sınırlayıcı bir faktör olduğunu göstermiştir. Bütün bu bilgiler doğrultusunda Steinernematid'lerin Heterorhabditis'lere oranla düşük sıcaklıklara daha iyi adapte olduğu ve canlılıklarını sürdürmede daha başarılı oldukları söylenebilmektedir (Mracek and Webster, 1993).

Pek çok çalışmada nematodların izole edildikleri bölgenin iklimik özellikleriyle bu nematodların büyüebildikleri uygun sıcaklık aralıkları arasında bir korelasyon bulunduğunu göstermiştir (Molyneux, 1985; Kung et al., 1991). Türkiye 7 farklı coğrafik bölgeye sahip olup bölgeler arasında büyük iklimsel farklılıklar bulunmaktadır. Türkiye'de daha önce yapılan araştırmalarda *Steinernema feltiae*, *Steinernema affine*, *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema anatoliense* ve *Heterorhabditis bacteriophora* türleri izole edilmiştir (Ozer et al., 1995; Susurluk et al., 2001; Hazır et al., 2003, 2004). Bunlar içerisinde *Steinernema feltiae* ve *Steinernema affine* dışındakiler sıcak iklime adapte olan türlerdir.

Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki yapılan bu araştırmada, en yaygın entomopatojen nematod türlerinden 8 pozitif örneğin 5'ini *Steinernema feltiae* türü oluşturmuştur. Bu türün, dünyada en yaygın bulunan türler olduğu daha önce yapılan çalışmalarda da belirlenmiştir (Hominick ve ark., 1996). *Steinernema feltiae* tropik bölgelerden soğuk iklimlerin hakim olduğu bölgelere kadar her yerden tespit edilmiştir Fakat daha çok soğuk iklim bölgelerine adapte olmuş ve genelde kıyıda uzak kesimlerden elde edilmiştir (Wright, 1992; Hominick ve ark., 1996). *Steinernema feltiae* Avrupa'da yapılmış birçok çalışmada tespit edilmiştir (Griffin ve ark., 1991).

*Steinernema feltiae* türü dünyadaki en yaygın entomopatojen nematod türü olarak kabul edilmektedir. Bunun muhtemel nedeni, *Steinernema feltiae* türünün ya kıtalar ayrılmadan önce ortaya çıkmış bir tür olması ya da etkin bir dağılım gösterebilen özellik taşıyor olmasıdır (Hominick ve ark., 1996). Türkiye'den ilk elde edilen entomopatojen nematod türü de *Steinernema feltiae*'dir (Özer ve ark., 1995). Daha önce yapılan çalışmalarda, Hazır ve ark (2003) tarafından yapılan çalışmada elde edilen 17 *Steinernema*'nın 10 tanesi yine *Steinernema feltiae* türüne ait bulunmuş ve Türkiye'deki en yaygın entomopatojen nematod türü olduğu belirtilmiştir.

*Steinernema feltiae* tüm Avrupa'da kaydedilmiş bir türdür. Kuzey Avrupa'da bu tür genellikle en sık rastlanan türdür (Griffin et al., 1991; Boag et al., 1992; Vainio et al., 1994).

Orta Avrupa'da ise *Steinernema feltiae* subdominant türdür. *Steinernema feltiae*'nin Alplerin eteklerinde ve Jura dağlarında dominant tür olması, bu türün düşük sıcaklığa adapte olduğu görüşünü desteklemektedir (Hominick and Briscoe, 1990).

*Steinernema feltiae*'nin kırsal alanda daha çok bulunması bu türün doğal konakları olan ve bitki kökleri ile beslenen Lepidoptera larvalarının (Noctuidae ve Hepialiidae) o bölgelerde bulunması nedeniyledir (Poinar, 1990).

*Steinernema feltiae* kadar geniş bir dağılım göstermemesine rağmen, *H. bacteriophora* daha çok tropik bölgelerde olmak üzere (Constan et al., 1998), soğuk bölgelere kadar (Hominick et al., 1996) yayılım gösterebilmektedir.

Entomopatojen nematodların ekstrem sıcaklıklarda gösterdikleri enfektivite ve üreme miktarlarındaki farklılıklar, mutualistik olarak yaşadıkları bakterilerin özelliklerinden de kaynaklanmaktadır. Çünkü nematod-bakteri iş birliğinde konak ölümünü gerçekleştiren organizmanın bakteri olduğu bilinmektedir. Özellikle düşük sıcaklıklarda enzim aktivitesi ve üreme gösterebilen bakteriler, birlikte oldukları nematodlara bu düşük sıcaklıklarda enfektivite oluşturma özelliği kazandırmaktadır. Bakteriyal enzimlerin oluşturulması ve sentezlenmesi sıcaklıkla doğrudan ilişkilidir (Boemare, 2002).

Çalışmada türü tespit edilen ve soğuğa adapte türler olduğu bilinen *Steinernema kraussei* ve *Steinernema feltiae*'nin mutualistik ilişki içinde olduğu *Xenorhabdus bovienii* bakterisi 32°C'ye kadar üreyebilmektedir. Diğer *Xenorhabdus* türlerinden *X. nematophila* 35°C; *X. poinarii* 40°C; *X. bedingii* 39 °C ve *X. japonica* 35 °C'ye kadar üreyebilmektedir (Fischer- Le Saux et al., 1999; Boemare, 2002). Buradan da anlaşılacağı üzere *Xenorhabdus bovienii* türü bakteriler diğer *Xenorhabdus* türlerine oranla yüksek sıcaklıklara karşı daha az tolerans göstermektedir. Bu yüzden *X. bovienii* için soğuğa adapte nematodların simbiyontu adı verilmektedir (Boemare and Akhurst, 1988; Boemare, 2002).

## 5. SONUÇ

Bu çalışma sonucunda Trabzon, Değirmendere Vadisi ve Altındere Milli Parkı'ndan alınan toprak örneklerinden entomopatojen nematodlar izole edildikten sonra, tanımlanması, karakterizasyonu ve bazı zararlı böcekler üzerindeki etkileri tespit edildi.

Gerçekleştirilen bu tez çalışması sonucunda Trabzon, Değirmendere Vadisi ve Altındere Milli Parkı'ndan alınan 98 toprak örneğinden 8 tane entemopatojen nematod izole edildi. Böylece örneklerde gerçekleşen izolasyon sıklığı yaklaşık % 8'dir (Tablo 13).

Alınan 98 toprak örneğinden izolasyonu yapılan entomopatojen nematodlardan, 1 tanesi ekili tarım arazisinden, 3 tanesi akarsu yatağından ve 4 tanesi çayırılık alanlardan tespit edildi. Bu veriler nematodların bulunma sıklığının ekili tarım arazilerinde % 7, akarsu yatağında %12 ve çayırılık alanlardan % 4 olduğunu göstermiştir.

Elde edilen 8 tane entomopatojen nematodun moleküler (Tablo 14) ve morfofolojik özellikleri (Tablo 15) dikkate alınarak elde edilen sonuçlara göre bu türlerin *Steinernema* cinsine ait olduğu belirlendi.

Morfolojik, morfometrik ve moleküler verilerin bir arada değerlendirilmesi sonucunda elde edilen *Steinernema* cinsine ait nematodların, *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema feltiae*, *Steinernema kraussei* ve bu cinse ait yeni bir tür olduğu düşünülen *Steinernema* sp. olduğu tespit edildi.

Tanımlanması yapılan 8 tane entomopatojen nematodun aralarındaki akrabalık derecelerini tespit etmek için PAUP 4.0 Filogenetik Ağaç Programı ile filogenetik ağaç grafiği çizildi. Elde edilen veriler sonucunda *Steinernema feltiae* türleri arasında coğrafik farklılıkların olduğu tespit edildi. *Steinernema kraussei* türü ise tanımlamasını yaptığımız türler arasında uzak akraba olduğu görüldü. *Steinernema carpocapsae* türünün *Steinernema feltiae* türü ile benzer özellik gösterdiği ve *Steinernema* sp. türünün ise diğer tüm izolatlardan farklı olduğu tespit edildi.

Erkek bireyler ve infektif juveniller üzerinde yapılan morfometrik çalışmalarda elde edilen ölçüm sonuçlarına göre *S. kraussei* türünün izole ettiğimiz türler arasında en büyük tür olduğu belirlendi.

Tür tanımlanması ve akrabalık dereceleri belirlenen entomopatojen nematodlarla simbiyotik yaşayan bakterilerin izolasyonu yapılarak NBTA besiyerinde büyümeleri sağlandı.

Saf kültürleri elde edilen bakterilerin türlerinin belirlenmesi için yapılan moleküler çalışmaların sonucuna göre tespit edilen bakterilerin bir tanesi *Xenorhabdus nematophila* ve yedi tanesi ise *Xenorhabdus bovienii*'dir.

Tür tanımlanması yapılan 8 tane entomopatojen nematodun, *Agrotis segetum* (Denis & Schiff.) (Lepidoptera: Noctuidae), *Gryllotalpa gryllotalpa* (L.) (Orth.: Gryllotalpidae) ve *Agriotes* spp., (Col: Elateridae) türlerindeki üç farklı böcek üzerinde etkisi farklı nematod sayıları ile test edildi.

Çalışma kapsamında izole edilen 8 entomopatojen nematodlar ile yapılan testlerin sonuçlarına göre *Agrotis segetum* türü böcek üzerinde 5000 IJs/300µl infektif juvenil ile yapılan biyotest deneyi ile beşinci gün sonunda %100 başarı sağlanmıştır.

*Gryllotalpa gryllotalpa* ve *Agriotes* spp. türü böcek üzerinde 1000 IJs/1000 µl, 3000 IJs/1000 µl ve 5000 IJs/1000 µl infektif juvenil ile yapılan biyotestte herhangi bir enfeksiyon gerçekleşmemiştir.

Tüm analiz ve değerlendirmeler sonucunda 61 numaralı izolat olan *Steinernema feltiae*'nin *Agrotis segetum* böceğine karşı mikrobiyal mücadele ajanı olarak kullanılabileceği yapılan biyotest sonuçları ile tespit edilmiştir.

Trabzon, Değirmendere Vadisi ve Altındere Milli Parkı'ndan alınan toprak örneklerinden izole edilen entomopatojen nematodların farklı sıcaklıklardaki infektivite oranları tespit edildi. Buna göre izole edilen entomopatojen nematodların infektivite oranının en yüksek olduğu sıcaklığın, 15 ile 37 °C arasında olduğu tespit edildi. Bunlar arasında *S. kraussei* türü nematodun 37 °C de infektif juvenillerinin boylarında kısalma olduğu tespit edildi.

## 6. ÖNERİLER

Doğu Karadeniz ikliminin hakim olduğu Trabzon ilinde özellikle fındık, çay, tütün, mısır ve kestane başta olmak üzere patates, kivi, çilek ve çeşitli sebze meyve üretimi gerçekleştirilmektedir. Birçok tarım ürünlerinin yetiştirilmesinden dolayı, bu bölgede çok sayıda toprak altı zararlısı mevcuttur. Mikrobiyal mücadelede entomopatojen nematod dışındaki kullanılan diğer zararlı mücadele maddelerinin, konak seçiciliğinin az olması, geride kalıntı bırakması gibi olumsuz yönleri vardır. Entomopatojen nematodların konak seçiciliğinin yüksek olması, konağını hareketi ile aktif olarak bulması, geride kalıntı bırakmaması ve toprak altında diğer patojenlerin ulaşamayacağı noktalara ulaşabilmesi gibi üstünlükleri vardır.

Toprak, doğal yapısı itibariyle uygulanan insektisitlere karşı doğal bir bariyer özelliği taşımaktadır. Bu nedenle toprak altı zararlılarıyla mücadele etmek oldukça zordur. Oysa toprak doğal yaşam ortamları olduğu için entomopatojen nematodlar açısından böyle bir bariyer söz konusu değildir. Ayrıca kimyasal insektisitlerin kullanımının çevre ve insan sağlığı açısından ortaya çıkardığı olumsuz sonuçlar, entomopatojen nematodlar için geçerli değildir. Bu nedenlerden dolayı elde edilen entomopatojen nematod izolatlarının gelecekte bu bölgedeki zararlı organizmalara karşı etkin bir mikrobiyal mücadele ajanı olarak kullanılması mümkün olabilecektir. Milyonlarca yıllık bir süreç içerisinde bulunduğu çevreye uyum sağlamış olan ve o bölgeye özgü entomopatojen nematod izolatlarının kullanılması mikrobiyal mücadelenin başarı oranını arttıracak en önemli unsur olacaktır.

Trabzon ilinin sahip olduğu coğrafik konum, arazi konumunun farklı yüksekliklerde olması ve çok sayıda akarsu yatağının bulunması, bu bölgenin entomopatojen çeşitliliğinin fazla olacağını göstermektedir. Bölgede yeni türlerin tespit edilebileceği aşikardır. Akarsu yatakları ile ayrılmış birçok ekosistemin bulunduğu düşünüldüğünde yapılacak alan taramalarının genişliğini daraltıp, çok sık toprak örneklerinin alınması gerekmektedir.

Çalışmada elde edilen entomopatojen nematod türlerinin bölgedeki ekonomik olarak önemli olan zararlılara karşı başarılı birer mikrobiyal mücadele etmeni olarak kullanılabilme ihtimallerinin olabileceği düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

- Adams B.J. and Nguyen K.B., 2002. Taxonomy and systematics. In: R. Gaugler (ed.), *Entomopathogenic Nematology*, 1-34, CABI Publishing, Oxon, New York,
- Adams, B. J., Fodor, A., Koppenhöfer, H. S., Stackebrandt, E., Stock, S. P. and Klein, M. G., 2006 .Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens, *Biological Control*, 37, 32-49.
- Adams, B.J. and Nguyen, K. B., 2002. Taxonomy and systematics. In: Gaugler, R. (Ed.), *Entomopathogenic Nematology*, 1-33, CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Akhurst, R.J., 1983. Taxonomic study of *Xenorhabdus*, a genus of bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33, 1, 38-45.
- Andalo, V., Nguyen, K.B. and Moino, A., 2006. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp (Rhabditida : Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil, *Nematology*, 8, 853-867.
- Ansari, M.A., Tirry, L. and Moens, M., 2003. Entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria for the biological control of *Hoplia philanthus* (Coleoptera : Scarabaeidae), *Biological Control*, 28, 1, 111-117.
- Armer, C.A., Berry, R.E., Reed, G.L. and Jepsen, S.J., 2004. Colorado potato beetle control by application of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis marelata* and potato plant alkaloid manipulation, *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 111, 1, 47-58.
- Barbercheck, M. E. and Duncan, L., 2004. Abiotic Factors. In: Gaugler, R., and Bilgrami, A. L. (Ed.), *Nematode Behaviour*, 309-345, CABI, Wallingford, UK.
- Bedding R.A. Molyneux A.S. and Akhurst R.J., 1983. *Heterorhabditis* s, *Neoaplectana* s and *Steinernema kraussei*, Interspecific and Intraspecific Differences in Infectivity to Insects, *Experimental Parasitology*, 55, 248-257.
- Bedding, R.A. and Akhurst, R.J., 1975. Simple technique for detection of insect parasitic Rhabditid nematodes in soil, *Nematologica*, 21, 1, 109-110.
- 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, 6671, 71-75.
- Boag B. Neilson R. and Gordon S.C., 1992. Distribution and Prevalence of the Entomopathogenic Nematode *Steinernema feltiae* in Scotland, *Annals of Applied Biology*, 121, 355-360.

- Boemare, N., 2002. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: Gaugler, R. (Ed.), *Entomopathogenic Nematology*, 35-57, CABI, Wallingford, UK.
- Boemare, N., Laumond, C. and Mauleon, H., 1996. The entomopathogenic nematode-bacterium complex: Biology, life cycle and vertebrate safety, *Biocontrol Science and Technology*, 6, 3, 333-345.
- Boemare, N.E., Boyergiglio, M.H., Thaler, J.O. and Akhurst, R.J., 1993. The phages and bacteriocins of *Xenorhabdus* spp, symbiont of the nematodes *Steinernema* spp and *Heterorhabditis*, *Nematodes and The Biological Control Of Insect Pests*, 137-145.
- Boff, M.I.C., Wieggers, G.L. and Smits, P.H., 2000. Effect of storage time and temperature on infectivity, reproduction and development of *Heterorhabditis megidis* in *Galleria mellonella*, *Nematology*, 2, 635-644.
- Brown, I. M., Lovett, B. J., Grewal, P. S. and Gaugler, R., 2002. Latent infection: a low temperature survival strategy in steinernematid nematodes, *Journal of Thermal Biology*, 27, 531-539.
- Burnell, A. M. and Stock, S. P., 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts lethal pathogens of insects, *Nematology*, 2, 31-42.
- Cabanillas, H.E., 2003. Susceptibility of the boll weevil to *Steinernema riobrave* and other entomopathogenic nematodes, *Journal of Invertebrate Pathology*, 82, 3, 188-197.
- 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, 2, 142-145.
- Campbell, L.R. and Gaugler, R., 1991. Role of the sheath in desiccation tolerance of 2 entomopathogenic nematodes, *Nematologica*, 37, 3, 324-332.
- Chen, S., Li, J., Han, X. and Moens, M., 2003. Effect of temperature on the pathogenicity of entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis* s) to *Delia radicum*, *BioControl*, 48, 713-724.
- Chen, S.L., Li, X.H., Yan, A.H., Spiridonov, S.E. and Moens, M., 2006. A new entomopathogenic nematode, *Steinernema hebeiense* sp n. (Rhabditida : Steinernematidae), from North China, *Nematology*, 8, 563-574.
- Choo H.Y., Kaya H.K. and Stock P., 1995. Isolation of Entomopathogenic Nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) from Korea. *Japanese Journal of Nematology*, 25, 44-51.
- Ciche, T.A., Darby, C., Ehlers, R.U., Forst, S. and Goodrich-Blair, H., 2006. Dangerous liaisons: The symbiosis of entomopathogenic nematodes and bacteria. *Biological Control*, 38, 1, 22-46.

- Ciche, T.A. and Ensign, J.C., 2003. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out, Applied and Environmental Microbiology, 69, 4, 1890-1897.
- Constant, P., Marchay, L., Fischer-Le-Saux, M., Briand-Panoma, S. and Mauleon, H., 1998. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida : Steinernematidae and Heterorhabditidae) in *Guadeloupe islands*, Fundamental and Applied Nematology, 21, 6, 667-672.
- Crow, W.T., 2002. Using Nematodes to Control Insects: Overview and Frequently Asked Questions. University of Florida. Extension on Institute of Food and Agricultural Sciences, 1-6.
- De Nardo, E. A. B., Grewal, P. S., McCartney, D. and Stinner, B. R., 2006. Nontarget effects of entomopathogenic nematodes on soil microbial community and nutrient cycling process: A microcosm study, Applied Soil Ecology, 34, 250-257.
- Delbeke, F., Vercruyse, P., Tirry, L., De Clercq, P. and Degheele, D., 1997. Toxicity of diflubenzuron, pyriproxyfen, imidacloprid and diafenthiuron to the predatory bug *Orius laevigatus* (Het.: Anthocoridae), Entomophaga, 42, 3, 349-358.
- Dorris, M., Viney, M.E. and Blaxter, M.L., 2002. Molecular phylogenetic analysis of the genus *Strongyloides* and related nematodes, International Journal For Parasitology, 32, 12, 1507-1517.
- Edgington, S., Buddie, A.G., Tymo, L., Hunt, D.J., Nguyen, K.B., France, A.I., Merino, L.M. and Moore, D., 2009. *Steinernema australe* n. sp (Panagrolaimomorpha: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Isla Magdalena, Chile, Nematology 11, 699-717.
- Ehlers R.U., Deseö K.V. and Stackebrandt E., 1991. Identification of *Steinernema* s (Nematoda) and Their Symbiotic Bacterial *Xenorhabdus* s from Italian and German Soils, Nematologica, 37, 360-366.
- Ehlers, R. U. and Hokkanen, H. M. T.. 1996. Insect biocontrol with non-endemic entomopathogenic nematodes *Steinernema* and *Heterorhabditis* s: Conclusions and recommendations of a combined OECD and COST workshop on scientific and regulatory policy issues, Biocontr. Sci. Technol, 6, 295-302.
- Elawad, S., Ahmad, W. and Reid, A.P., 1998. *Steinernema abbasi* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) from the Sultanate of Oman, Fundamental and Applied Nematology, 20, 5, 435-442.
- Eraktan, G., 2001. Tarım politikasının temelleri ve Türkiye’de tarımsal destekleme politikası, s.93, Ankara.
- Finnegan, M.M., Downes, M.J., O'Regan, M. and Griffin, C.T., 1999. Effect of salt and temperature stresses on survival and infectivity of *Heterorhabditis* IJs, Nematology, 1, 69-78.



- Fischer-Le Saux, M., Arteaga-Hernandez, E., Mracek, Z. and Boemare, N.E., 1999. The bacterial symbiont *Xenorhabdus poinarii* (Enterobacteriaceae) is harbored by two phylogenetic related host nematodes: the entomopathogenic species *Steinernema cubanum* and *Steinernema glaseri* (Nematoda : Steinernematidae), Fems Microbiology Ecology, 29, 2, 149-157.
- Forst, S. and Nealson, K., 1996. Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* s and *Photorhabdus*, Microbiological Review, 60, 21-43.
- Forst, S., Dowds, B., Boemare, N. and Stackebrandt, E., 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* s: Bugs that kill bugs, Annual Review of Microbiology, 51, 47-72.
- Gaugler R., 2002. Preface. In: Gaugler, R. Ed. Entomopathogenic Nematology, pp 9-10, CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Gaugler, R. and Campbell, J.F., 1991. Selection for enhanced host-finding of scarab larvae (Coleoptera, Scarabaeidae) in an entomopathogenic nematode, Environmental Entomology, 20, 2, 700-706.
- Georgis R. and Manweiler S.A., 1994. Entomopathogenic Nematodes: A Developing Biological Control Technology, Agricultural Zoology Reviews, 6, 63-94.
- Gerrard, J., Waterfield, N., Vohra, R. and Ffrench-Constant, R., 2004. Human infection with *Photorhabdus asymbiotica*: an emerging bacterial pathogen, Microbes and Infection, 6, 2, 229-237.
- Glazer, I., 2002. Survival Biology. In: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology, 169-187, CABI, Wallingford, UK.
- Gouge, D. H., and Synder, J. L., 2006. Temporal association of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) and bacteria, Journal of Invertebrate Pathology, 91, 147-157.
- Gouge, D. H., Lee, L. L., and Henneberry, T. J., 1999. Effect of temperature and lepidopteran host species on entomopathogenic nematode (Nematoda: Steinernematidae, Heterorhabditidae) infection, Environmental Entomology, 28, 5, 876-883.
- Grant, J. A and Villani, M. G., 2003. Soil Moisture effects on entomopathogenic nematodes, Environmental Entomology, 32, 1, 80-87.
- Grewal P.S., Ehlers R.U. ve Shapiro-Ilan D.I., 2005. Nematodes as Biocontrol Agents, 505, CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Griffin, C. T., 1993. Temperature responses of entomopathogenic nematodes: implications for the success of biological control programmes. In R. Bedding, R. Akhurst, and H. Kaya, Eds. "Nematodes and the biological control of insects", 115-126, CSRIO Publications. East Melbourne: Australia.

- Griffin, C.T., Chaerani, R., Fallon, D., Reid, A.P. and Downes, M.J., 2000. Occurrence and distribution of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* s and *Heterorhabditis indica* in Indonesia, Journal of Helminthology, 74,2, 143-150.
- Griffin, C.T., Dix, I., Joyce, S.A., Burnell, A.M. and Downes, M.J. 1999. Isolation and characterisation of *Heterorhabditis* s (Nematoda : Heterorhabditidae) from Hungary, Estonia and Denmark, Nematology, 1, 321-332.
- Griffin, C.T., Joyce, S.A., Dix, I., Burnell, A.M. and Downes, M.J., 1994. Characterization of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis* (nematoda, heterorhabditidae) from Ireland and Britain by molecular and cross-breeding techniques, and the occurrence of the genus in these Islands, Fundamental and Applied Nematology, 17, 3, 245-253.
- Hazir, S., Stock, S.P. and Keskin, N., 2003a. A new entomopathogenic nematode, *Steinernema anatoliense* n. sp (Rhabditida : Steinernematidae), from Turkey, Systematic Parasitology, 55, 3, 211-220.
- Hazir S., Keskin N., Stock P., Kaya H.K. and Ozcan S., 2003b. Diversity and distribution of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Turkey, Biodiversity and Conservation, 12, 375-386.
- Hazir, S., 2002. Türkiye'deki entomopatojenik nematodlar (*Steinernematidae* ve *Heterorhabditidae*) üzerine faunistik çalışmalar. Doktora Tezi H. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Hominick W.M. and Briscoe B.R., 1990. Occurrence of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in British Soil. Parasitology, 100, 295-302.
- Hominick W.M., 2002. Biogeography. In: Gaugler, R. Ed. Entomopathogenic Nematology. pp 115-143, CABI Publishing. Wallingford, UK.
- Hominick, W.M., Briscoe, B.R., del Pino, F.G., Heng, J.A., Hunt, D.J., Kozodoy, E., Mracek, Z., Nguyen, K.B., Reid, A.P., Spiridonov, S., Stock, P., Sturhan, D., Waturu, C. and Yoshida, M., 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions, Journal of Helminthology, 71, 4, 271-298.
- Immaraju, J.A., Paine, T.D., Bethke, J.A., Robb, K.L. and Newman, J.P., 1992. Western flower thrips (*Thysanoptera*, thripidae) resistance to insecticides in coastal California greenhouses, Journal of Economic Entomology, 85, 1, 9-14.
- Jagdale, G. B. and Gordon, R., 1998. Effects of propagation temperatures on temperature tolerance of entomopathogenic nematodes, Fundam. Appl. Nematol., 21, 2, 177-183.
- Jagdale, G. B., Grewal, P. S. and Salminen, S. O., 2005. Both heat-shock and coldshock influence trehalose metabolism in an entomopathogenic nematode, J.Parasitol. 91, 5, 988-994.

- Jian, H., Reid, A.P. and Hunt, D.J. 1997. *Steinernema ceratophorum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from north-east China, Systematic Parasitology, 37, 2, 115-125.
- Joyce S.A., Reid A., Driver F. and Curran J. 1994. Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to the identification of entomopathogenic nematodes. In: Burnell AM, Ehlers RU, Masson JP, editors. COST 812 Biotechnology: Genetics of entomopathogenic nematode-bacterium complexes, Proceedings of Symposium and Workshop, St Patrick's College, Maynooth, Co. Kildare, Ireland. DG XII, Luxembourg: European Commission, 178-187.
- Kaya H.K., 1985. Entomogenous Nematodes for Insect Control in IPM Systems. In: Hoy M.A. ve Herzog D.C. Eds. Biological Control in Agricultural IPM Systems, Orlando, FL: Academic Press., 283-302.
- Kaya, H. K. and Gaugler, R., 1993. Entomopathogenic nematodes. Annual Review of Entomology, 38, 181-206.
- Kaya, H. K. and Stock, S. P., 1997. Techniques in insect nematology. In "Manual of Techniques in Insect Pathology" (L. Lacey, Ed.), Academic Press, San Diego, 281-324.
- Klein M.G., 1990. Efficacy Against Soil-Inhabiting Insect Pests. In: R. Gaugler ve H.K. Kaya, Eds. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. Boca Raton, FL: CRC Press., 195-214.
- Koppenhöfer, A. M. and Fuzy, E. M., 2003. Ecological characterization of *Steinernema scarabaei*, a scarab – adapted entomopathogenic nematode from New Jersey, Journal of Invertebrate Pathology, 83, 139-148.
- Koppenhöfer, A. M. and Kaya, H. K., 1996. Coexistence of entomopathogenic nematode species (Steinernematidae and Heterorhabditidae) with different foraging behavior, Fundam. Appl. Nematol., 19,175-183.
- Koppenhöfer, A. M. and Kaya, H. K., 1999. Ecological characterization of *Steinernema rarum*, Journal of Invertebrate Pathology, 73,120-128.
- Koppenhofer, A.M., Grewal, P.S. and Kaya, H.K. 2000. Synergism of imidacloprid and entomopathogenic nematodes against white grubs: the mechanism, Entomologia Experimentalis Et Applicata, 94, 3, 283-293.
- Koppenhofer, A.M. and Kaya, H.K. 1999. Ecological characterization of *Steinernema rarum*, Journal of Invertebrate Pathology, 73, 1, 120-128.
- Kung, S. P. and Gaugler, R., 1990. Soil type and entomopathogenic nematode persistence, Journal of Invertebrate Pathology, 55, 401-406.

- 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.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K. and Vail, P. 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? Biological Control, 21, 3, 230-248.
- Lee, M.M., Sicard, M., Skeie, M. and Stock, S.P., 2009. *Steinernema boemarei* n. sp (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from southern France, Systematic Parasitology, 72, 2, 127-141.
- Lengyel, K., Lang, E., Fodor, A., Szallas, E., Schumann, P. and Stackebrandt, E. 2005. Description of four novel species of *Xenorhabdus*, family Enterobacteriaceae: *Xenorhabdus budapestensis* sp nov., *Xenorhabdus ehlersii* sp nov., *Xenorhabdus innexi* sp nov., and *Xenorhabdus szentirmaii* sp nov. Systematic and Applied Microbiology, 28, 2, 115-122.
- Lewis E. E., Shapiro-Ilan D. I. and McCoy C., 2002. Development rates in entomopathogenic nematodes: infected hosts vs. aqueous suspension. Journal of Nematology, 34 4, 340-342.
- Lewis, E. E., Campbell, J., Griffin, C., Kaya, H. and Peters, A., 2006. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes, Biological Control, 38, 66-79.
- Liu, J., Poinar, G.O. and Berry, R.E. 2000. Control of insect pests with entomopathogenic nematodes: The impact of molecular biology and phylogenetic reconstruction, Annual Review of Entomology, 4, 5, 287-306.
- Lopez-Nunez, J.C., Plichta, K., Gongora-Botero, C.E. and Stock, S.P., 2008. A new entomopathogenic nematode, *Steinernema colombiense* n. sp (Nematoda : Steinernematidae), from Colombia, Nematology, 10, 561-574.
- Lorio L.U., Mora M. and Stock S.P., 2005. First Record of Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Costa Rica, Journal of Invertebrate Pathology, 88, 226-231.
- Malan, A.P., Nguyen, K.B., De Waal, J.Y. and Tiedt, L., 2008. *Heterorhabditis safricana* n. sp (Rhabditida : Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa, Nematology, 10, 381-396.
- Mamiya, Y., 1988. *Steinernema kushidai* n-sp (Nematoda, Steinernematidae) associated with Scarabaeid beetle larvae from Shizuoka, Japan, Applied Entomology and Zoology, 23, 3, 313-320.
- Midituri J.S. Waeyenberge L. and Moens M., 1997. Natural Distribution of Entomopathogenic Nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) in Belgian Soils, Russian Journal of Nematology, 5, 55-65.

- Molyneux, A. S., 1995. Survival of infective juveniles of *Heterorhabditis* s, and *Steinernema* s (Nematoda: Rhabditida) at various temperatures and their subsequent infectivity for insects, Revue Nematol., 8, 165-170.
- Molyneux, A. S., 1986. *Heterorhabditis* s and *Steinernema* (*Neoplectana*) spp: temperature, and aspects of behavior and infectivity, Exp. Parasitol., 62, 169-180.
- Mráček, Z., Becvar, S. and Kindlan, P., 1999. Survey of entomopathogenic nematodes from the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) in the Czech Republic, Folia Parasitologica, 46, 145-148.
- Mráček, Z. and Becvar, S., 2000. Insect aggregations and entomopathogenic nematode occurrence, Nematology, 2, 297-301.
- Mráček, Z., Hernandez, E.A. and Boemare, N.E., 1994. *Steinernema cubana* sp-n (Nematoda, Rhabditida, Steinernematidae) and the preliminary characterization of its associated bacterium, Journal of Invertebrate Pathology, 64, 2, 123-129.
- Mráček, Z., Liu, Q.Z. and Nguyen, K.B., 2001. *Steinernema xueshanense* n. sp (Rhabditida, Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematode from the province of Yunnan, southeast Tibetan Mts., China, Journal of Invertebrate Pathology, 102, 1, 69-78.
- Mráček, Z., Nguyen, K.B., Tailliez, P., Boemare, N. and Chen, S.L., 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, 3, 157-169.
- Mráček, Z., Sturhan, D. and Reid, A. 2003. *Steinernema weiseri* n. sp (Rhabditida, Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Europe, Systematic Parasitology, 56, 1, 37-47.
- Nagarkatti, S., Muza, A.J., Saunders, M.C. and Tobin, P.C., 2002. Role of the egg parasitoid *Trichogramma minutum* in biological control of the grape berry moth, *Endopiza viteana*, Biocontrol, 47, 4, 373-385.
- Nguyen, K.B. and Duncan, L.W., 2002. *Steinernema diaprepesi* n. sp (Rhabditida : Steinernematidae), a parasite of the citrus root weevil *Diaprepes abbreviatus* (L) (Coleoptera : Curculionidae), Journal of Nematology, 34, 2, 159-170.
- Nguyen, K.B., Ginarte, C.M.A., Leite, L.G., dos Santos, J.M. and Harakava, R., 2010. *Steinernema brazilense* n. sp (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Mato Grosso, Brazil, Journal of Invertebrate Pathology, 103, 1, 8-20.
- Nguyen, K.B., Gozel, U., Koppenhofer, H.S. and Adams, B.J, 2006. *Heterorhabditis floridensis* n. sp (Rhabditida : Heterorhabditidae) from Florida, Zootaxa, 11, 77, 1-19.

- Nguyen, K.B., Malan, A.P. and Gozel, U., 2006. *Steinernema khoisanae* n. sp (Rhabditida : Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa, Nematology, 8, 157-175.
- Nguyen, K.B., Puza, V. and Mracek, Z., 2008. *Steinernema cholashanense* n. sp (Rhabditida, Steinernematidae) a new species of entomopathogenic nematode from the province of Sichuan, Chola Shan Mountains, China, Journal of Invertebrate Pathology, 97, 3, 251-264.
- Nguyen, K.B., Qiu, L.H, Zhou, Y. and Pang, Y., 2006. *Steinernema leizhouense* sp n. (Nematoda : Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from southern China. Russian Journal Of Nematology, 14, 2, 101-118.
- Nguyen, K.B., Shapiro-Ilan, D.I. and Bata, G.NM., 2008. *Heterorhabditis georgiana* n. sp (Rhabditida : Heterorhabditidae) from Georgia, USA, Nematology, 10, 433-448.
- Nguyen, K.B., Shapiro-Ilan, D.I., Stuart, R.J., McCoy, C.W., James, R.R. and Adams, B.J., 2004. *Heterorhabditis mexicana* n. sp (Rhabditida : Heterorhabditidae) from Tamaulipas, Mexico, and morphological studies of the bursa of *Heterorhabditis*, Nematology, 6, 231-244.
- Nguyen, K.B. and Smart, G.C., 1992. *Steinernema neocurtillis* sp (rhabditida, steinernematidae) and a key to species of the genus *Steinernema*, Journal of Nematology, 24, 4, 463-477.
- Nguyen, K.B., Stuart, R.J., Andalo, V., Gozel, U. and Rogers, M.E., 2007. *Steinernema texanum* n. sp (Rhabditida : Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Texas, USA. Nematology, 9, 379-396.
- Onstad, D.W., Guse, C.A., Porter, P., Buschman, L.L., Higgins, R.A., Sloderbeck, P.E., Peairs, F.B. and Cronholm, G.B., 2002. Modeling the development of resistance by stalk-boring lepidopteran insects (Crambidae) in areas with transgenic corn and frequent insecticide use, Journal of Economic Entomology, 95, 5, 1033-1043.
- Owuama, C.I., 2001. Entomopathogenic symbiotic bacteria, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* of nematodes, World Journal of Microbiology & Biotechnology, 17, 5, 505-515.
- Ozer N., Keskin, N. and Kırbas, Z., 1995. Occurrence of Entomopathogenic Nematodes (*Steinernematidae*, *Heterorhabditidae*) in Turkey, Nematologica, 41, 639-640.
- Parkman, J.P., Frank, J.H., Nguyen, K.B. and Smart, G.C., 1994. Inoculative release of *Steinernema scapterisci* (rhabditida, steinernematidae) to suppress pest Mole Crickets (Orthoptera, Gryllotalpidae) on golf-courses, Environmental Entomology, 23, 5, 1331-1337.
- Parkman, J.P., Hudson, W.G., Frank, J.H., Nguyen, K.B. and Smart, G.C., 1993. Establishment and persistence of *Steinernema scapterisci* (Rhabditida,

- Steinernematidae) in field populations of *Scapteriscus* spp mole crickets (Orthoptera, Gryllotalpidae), Journal of Entomological Science, 28, 2, 182-190.
- Peters, A. and Ehlers, R.U., 1997. Encapsulation of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* in *Tipula oleracea*. Journal of Invertebrate Pathology, 69, 3, 218-222.
- Peters, A., Gouge, D.H., Ehlers, R.U. and Hague, N.G.M., 1997. Avoidance of encapsulation by *Heterorhabditis* s infecting larvae of *Tipula oleracea*. Journal of Invertebrate Pathology, 70, 2, 161-164.
- Phan, K.L., Nguyen, N.C. and Moens, M. 2001. *Steinernema loci* sp n. and *Steinernema thanhi* sp n. (Rhabditida : Steinernematidae) from Vietnam, Nematology, 3, 503-514.
- Phan, K.L., Spiridonov, S.E., Subbotin, S.A. and Moens, M., 2006. Four new species of Steinemema Travassos, 1928 with short infective juveniles from Vietnam, Russian Journal of Nematology, 14, 1, 11-29.
- Phan, K.L., Subbotin, S.A., Nguyen, N.C. and Moens, M., 2003. *Heterorhabditis baujardi* sp n. (Rhabditida : Heterorhabditidae) from Vietnam and morphometric data for H-indica populations. Nematology, 5, 367-382.
- Phan, K.L., Tirry, L. and Moens, M. 2005. Pathogenic potential of six isolates of entomopathogenic nematodes (Rhabditida : Steinernematidae) from Vietnam, Biocontrol, 50, 3, 477-491.
- Phan, L.K., Subbotin, S.A., Waeyenberge, L. and Moens, M., 2005. A new entomopathogenic nematode, *Steinernema robustispiculum* n. sp (Rhabditida : Steinernematidae), from Chumomray National Park in Vietnam, Systematic Parasitology, 60, 1, 23-32.
- Phan, L.K., Takemoto, S. and Futai, K., 2006. *Steinernema ashiiuense* sp n. (Nematoda : Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Japan, Nematology, 8, 681-690.
- Plichta, K.L., Joyce, S.A., Clarke, D., Waterfield, N. and Stock, S.P., 2009. *Heterorhabditis gerrardi* n. sp (Nematoda: Heterorhabditidae): the hidden host of *Photorhabdus asymbiotica* (Enterobacteriaceae: gamma-Proteobacteria), Journal Of Helminthology, 83, 4, 309-320.
- Poinar, G. O., 1979. Nematodes for biological control of insects. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Poinar, G. O., 1993. Origins and phylogenetic relationships of the entomophilic rhabditids, *Heterorhabditis* and *Steinernema*. Fundam. Appl. Nematol., 16, 333-338.
- Poinar, G.O., 1975. Description and biology of a new insect parasitic Rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n-gen, n-sp (Rhabditida, Heterorhabditidae n-fam), Nematologica, 21, 4, 463-470.

- Poinar, G.O., Thomas, G.M. and Lighthart, B., 1990. Bioassay to determine the effect of commercial preparations of *Bacillus thuringiensis* on entomogenous rhabditoid nematodes, Agriculture Ecosystems & Environment, 30, 3, 4, 195-202.
- Qiu, L., Hu, X, Zhou, Y., Mei, S., Nguyen, K.B. and Pang, Y., 2005. *Steinernema akhursti* sp n. (Nematoda : Steinernematidae) from Yunnan, China. Journal Of Invertebrate Pathology, 90, 3, 151-160.
- Qiu, L., Yan, X., Zhou, Y., Nguyen, K.B. and Pang, Y., 2005. *Steinernema aciari* sp n. (Nematoda : Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Guangdong, China, Journal Of Invertebrate Pathology, 88, 1, 58-69.
- Qiu, L.H., Fang, Y.Y., Zhou, Y., Pang, Y. and Nguyen, K.B., 2004. *Steinernema guangdongense* sp n. (Nematoda : Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from southern China with a note on *S-serratum* (nomen nudum), Zootaxa, 704,1-20.
- Riveros, C.G.R., Doucet, M.E., Bertolotti, M.A. and Di Rienzo, J.A., 2007. Infection rate of different generations of infective juveniles (IJ) of *Steinernema rarum* (Doucet, 1986) Mamiya, 1988 (Steinernematidae, Rhabditida) from the province of Cordoba, Argentina, Nematology, 9, 903-905.
- Rosa J.S., Bonifassi E., Amaral J., Lacey L.A., Simoes N. and Laumond C., 2000. Natural Occurrence of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Steinernema, Heterorhabditis) in the Azores, Journal of Nematology, 32, 2, 215-222.
- Seinhorst, J.W., 1959. A Rapid Method for the Transfer of Nematodes From Fixative To Anhydrous Glycerin, Nematologica, 4, 1 , 67-69.
- Shamseldean, M.M., Abdelgawad, M.M. and Atwa, A.A., 1996. Evaluation of four entomopathogenic nematodes against *Spodoptera littoralis* (Lepid, Noctuidae) larvae under different temperatures. Anzeiger Fur Schadlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz, 69, 5, 111-113.
- Shapiron- Ilan, D. I., Gouge, D. H., Piggott, S. J. and Fife, J. P., 2006. Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control, Biological Control, 38, 124-133.
- Sicard, M., Ferdy, J.B, Pages, S., Le Brun, N., Godelle, B., Boemare, N. and Moullia, C., 2004. When mutualists are pathogens: an experimental study of the symbioses between *Steinernema* (entomopathogenic nematodes) and *Xenorhabdus* (bacteria), Journal of Evolutionary Biology, 17, 5, 985-993.
- Somasekhar, N., Grewal, P. S., De Nardo, E. A. B. and Stinner, B. R., 2002. Nontarget effects of entomopathogenic nematodes on the soil nematode community, Journal of Applied Ecology, 39, 735-744.
- Somvanshi, V.S., Lang, E., Ganguly, S., Swiderski, J., Saxena, A.K. and Stackebrandt, E., 2006. A novel species of *Xenorhabdus*, family Enterobacteriaceae: *Xenorhabdus*



*indica* sp nov., symbiotically associated with entomopathogenic nematode *Steinernema thermophilum* Ganguly and Singh, 2000, Systematic and Applied Microbiology, 29, 7, 519-525.

- Spiridonov, S.E., Reid, A.P., Podrucka, K., Subbotin, S.A. and Moens, M., 2004. Phylogenetic relationships within the genus *Steinernema* (Nematoda : Rhabditida) as inferred from analyses of sequences of the ITS1-5.8S-ITS2 region of rDNA and morphological features, Nematology, 6, 547-566.
- Spiridonov, S.E., Waeyenberge, L. and Moens, M., 2010. *Steinernema schliemanni* sp n. (Steinernematidae., Rhabditida) - a new species of steinernematids of the 'monticolum' group from Europe, Russian Journal of Nematology, 18, 2, 175-190.
- Steiner, W.A., 1996. Dispersal and host-finding ability of entomopathogenic nematodes at low temperatures, Nematologica, 42, 2, 243-261.
- Stock S.P. and Gress J.C., 2006. Diversity and Phylogenetic Relationships of Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from the Sky Islands of Southern Arizona, Journal of Invertebrate Pathology, 92, 66-72.
- Stock, S.P., 1997. *Heterorhabditis hepialius*, Stock Strong and Gardner, 1996 - A junior synonym of *H-marelatius*, Liu and Berry, 1996 (Rhabditida : Heterorhabditidae) with a redescription of the species, Nematologica, 43, 6, 455-463.
- Stock, S.P., 2005. Insect-parasitic nematodes: From lab curiosities to model organisms, Journal Of Invertebrate Pathology, 89, 1, 57-66.
- Stock, S.P., Choo, H.Y. and Kaya, H.K., 1997. Entomopathogenic nematode, *Steinernema monticolum* sp. n (Rhabditida: Steinernematidae) from Korea with a key to other species, Nematologica, 43, 1, 15-29.
- Stock, S.P., Choo, H.Y. and Kaya, H.K., 1997. First record of *Steinernema glaseri* Steiner, 1929 (Nematoda: Steinernematidae) in Asia, with notes on intraspecific variation, Nematologica, 43, 5, 377-381.
- Stock, S.P., Griffin, C.T. and Burnell, A.M., 2002. Morphological characterisation of three isolates of *Heterorhabditis* Poinar, 1976 from the 'Irish group' (Nematoda : Rhabditida : Heterorhabditidae) and additional evidence supporting their recognition as a distinct species, *H-downesi* n. sp., Systematic Parasitology, 51, 2, 95-106.
- 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., Heng, J., Hung, D.J., Reid, A.P., Shen, X. and Choo, H.Y., 2001. Redescription of *Steinernema longicaudum* Shen & Wang (Nematoda :

- Steinernematidae), geographic distribution and phenotypic variation between allopatric populations, Journal of Helminthology, 75, 1, 81-92.
- Stock, S.P. and Kaya, H.K., 1996. A multivariate analysis of morphometric characters of Heterorhabditis species (Nemata: Heterorhabditidae) and the role of morphometrics in the taxonomy of species of the genus, Journal of Parasitology, 82, 5 8, 806-813.
- Stock, S.P. and Koppenhofer, A.M., 2003. *Steinernema scarabaei* n. sp (Rhabditida : Steinernematidae), a natural pathogen of scarab beetle larvae (Coleoptera : Scarabaeidae) from New Jersey, USA, Nematology, 5, 191-204.
- Stock, S.P., Pryor, B.M. and Kaya, H.K., 1999. Distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in natural habitats in California, USA, Biodiversity and Conservation, 8, 4, 535-549.
- Stock, S.P., Rivera-Orduno, 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, 3, 175-184.
- Stock, S.P., Somsook, V. and Reid, A.P., 1998. *Steinernema siamkayai* n. sp. (Rhabditida : Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Thailand. Systematic Parasitology, 41, 2, 105-113.
- Stuart, R. J., Barbercheck, M. E., Grewal, P. S., Taylor, R. A. J., and Hoy, C. W., 2006. Population biology of entomopathogenic nematodes: Concepts, issues, and models, Biological Control, 38, 80-102.
- Sturhan, D. and Liskova, M., 1999. Occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes in the Slovak Republic, Nematology, 1, 273-277.
- Sturhan, D., Spiridonov, S.E. and Mracek, Z., 2005. *Steinernema silvaticum* sp n. (Rhabditida : Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Europe, Nematology, 7, 227-241.
- Susurluk, A., Dix, I., Stackebrandt, E., Strauch, W. S., and Ehlers, R.- U., 2001. Identification and ecological characterisation of three entomopathogenic nematode-bacterium complexes from Turkey, Nematology, 3, 8, 833- 841.
- Tarasco, E., Mracek, Z., Nguyen, K.B. and Triggiani, O., 2008. *Steinernema ichnusae* sp n. (Nematoda : Steinernematidae) a new entomopathogenic nematode from Sardinia Island (Italy), Journal Of Invertebrate Pathology, 99, 2, 173-185.
- Thurston, G. S., Ni, Y. and Kaya, H. K., 1994. Influence of salinity on survival and infectivity of entomopathogenic nematodes, Journal of Nematology, 26, 345-351.
- Timper, P. and Kaya, H.K., 1989. Role of the 2nd-stage cuticle of entomogenous nematodes in preventing infection by nematophagous fungi, Journal of Invertebrate Pathology, 54, 3, 314-321.

- Triggiani, O., Mracek, Z. and Reid, 2004. A., *Steinernema apuliae* sp n. (Rhabditida : Steinernematidae): a new entomopathogenic nematode from southern Italy, Zootaxa, 460, 1-12.
- 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, Systematic Parasitology, 68, 167-182.
- URL-1,  
<http://classes.seattleu.edu/biology/biol235/hodin/nematodePriapulidGroup/nematodes/formAndFunction.htm>, Entomopatogen nematodların morfolojik yapıları
- Van Luc, P., Nguyen, K.B., Reid, A.P. and Spiridonov, S.E., 2000. *Steinernema tami* sp n. (Rhabditida : Steinernematidae) from Cat Tien Forest, Vietnam, Russian Journal of Nematology, 8, 1, 33-43.
- Volgyi, A., Fodor, A., Szentirmai, A. and Forst, S., 1997. Phase variation in *Xenorhabdus nematophilus*. Applied and Environmental Microbiology, 64, 4, 1188-1193.
- Vrain, T.C., Wakarchuk, D.A. and Levesque, A.C., 1992. Hamilton, RI., Intraspecific rDNA Restriction-Fragment-Length-Polymorphism in the *Xiphinema americanum* group, Fundamental and Applied Nematology, 15, 6, 563-573.
- Walsh, K. T. and Webster, J. M., 2003. Interaction of microbial populations in *Steinernema* (Steinernematidae, Nematoda) infected *Galleria mellonella* larvae, Journal of Invertebrate Pathology, 83, 118-126.
- Waterhouse, D. F. and Norris, K. R., 1987. Biological control Pacific prospects. Avustralian Centre for Int. Agr. Research, 454.
- Wharton, D.A. and Surrey, M.R., 1994. Cold tolerance mechanisms of the infective larvae of the insect parasitic nematode, *Heterorhabditis-zealandica* poinar, Environmental Entomology, 23, 5, 1331-1337.
- Woodring, K. and H. Kaya. 1998. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: a handbook of biology and techniques. Arkansas Agricultural Experimental Station, Fayetteville, Arkansas, USA.
- Wouts W.M., 1991. *Steinernema* (Neoaplectana) and *Heterorhabditis* species. In: Nickle W.R. Ed., Manual of Agricultural Nematology, 855-897.
- Wouts, W.M., Mracek, Z., Gerdin, S. and Bedding, R.A., 1982. *Neoaplectana steiner*, 1929 a junior synonym of *Steinernema travassos*, 1927 (Nematoda, Rhabditida), Systematic Parasitology, 4, 2, 147-154.
- Wright, D. J., 2004. Osmoregulatory and Excretory Behaviour. In: Gaugler, R., and Bilgrami, A. L. (Ed.), *Nematode Behaviour*, 177-197, CABI, Wallingford, UK.

- Yilmaz, H., Waeyenberge, L., Demir, I., Moens, M. and Demirbag, Z., 2009. A new entomopathogenic nematode species for Turkey, *Heterorhabditis megidis* Poinar, Jackson & Klein 1987 (Rhabditida: Heterorhabditidae), Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 33, 4, 385-391.
- Yoshida, M., 2004. *Steinernema litorale* n. sp (Rhabditida : Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Japan, Nematology, 6, 819-838.
- Yoshida, M., Reid, A.P., Briscoe, B.R. and Hominick, W.M., 1998. Survey of entomopathogenic nematodes (Rhabditida : Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Japan, Fundamental and Applied Nematology, 21, 2, 185-198.
- Zhang, C.X., Liu, J.R., Xu, M.X., Sun, H., Yang, S.Y., An, X.H., Gao, G.F., Lin, M.S., Lai, R., He, Z.Y., Wu, Y.D. and Zhang, K.Y., 2008. *Heterorhabditidoides chongmingensis* gen. nov., sp nov (Rhabditida : Rhabditidae), a novel member of the entomopathogenic nematodes, Journal Of Invertebrate Pathology, 98, 2, 153-168.
- Zhou, X., Kaya, H. K., Heungens, K. and Goodrich-Blair, H., 2002. Response of ants to a deterrent factor(s) produced by the symbiotic bacteria of the entomopathogenic nematodes, Applied and Environmental Microbiology, 68, 6202-6209.

## 8. EKLER

### EK 1.

```

TAGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAGCTAATATTTTCCTTTTTAATCAAGTTTTCG
CTGTTTCGTTTCTAAGCTTTAACTTGATCTCTAACGGCTTTGAAAGGTTTCTACAGATGTT
TGGAGCAGTTGTATGAGCGTGACTGTGCTGATGAACATTGTACATTGTTATCTAAGCGTT
TCGATGTTTCTAGAATGCTTAGTGATGAGAATTAAGAGGTCTGCTGACTCGCCATTCTT
TGATTGCTAACAAAAACGTTTTGTTTCGATAAATTGTGTCACCTCGTTGATGCATTTTTTAA
TTATCAAGTCTTATCGGTGGATCACTCGGTTTCGTAGGTCGATGAAAAACGGGGCAAAAAC
CGTTATTTGGCGTGAATTGCAGACATATTGAGCGCTAAAATTTTGAACGCAAATGGCACT
AACAGGTTTTTATCTGTTAGTATGTTCAATTGAGGGTCTTTTGACTAGAATCTGGCAATC
GGCTGTGATTGCTTTTTTCGGTAAGCTACTTTGCTTTTGTGAAGTACCTTTTCGGTATGGC
TATTTGATTGTCTAATGGATGTCTGGCTAGCTGTTTCTTTGCTAGACGTCTGCAATCATT
TGGCATTGCGTAGTGTGTTGATTAATGGTTTAGCGCGTTTCTTGCTAACTGACTTTTACAC
AAGCAAGTGTAATACGTTTCTTAAAGTCAGCTCATTAATCAATGTGGTTTTCTGACTTGA
NTTTGTTCGGTCAATTGTGCTATGCTCTGCTAATCTTTCGAACCTAGACTCCA

```

Ek 1. Şekil 1. 10 numaralı izolata ait rRNA ITS bölgesi dizin analizi (772 bp.)

```

TAGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAGCTAATATTTTCCTTTTTAATCAAGTTTTCG
CTGTTTCGTTTCTAAGCTTTAACTTGATCTCTAACGGCTTTGAAAGGTTTCTACAGATGTT
TGGAGCAGTTGTATGAGCGTGACTGTGCTGATGAACATTGTACATTGTTATCTAAGCGTT
TCGATGTTTCTAGAATGCTTAGTGATGAGAATTAAGAGGTCTGCTGACTCGCCATTCTT
TGATTGCTAACAAAAACGTTTTGTTTCGATAAATTGTGTCACCTCGTTGATGCATTTTTTAA
TTATCAAGTCTTATCGGTGGATCACTCGGTTTCGTAGGTCGATGAAAAACGGGGCAAAAAC
CGTTATTTGGCGTGAATTGCAGACATATTGAGCGCTAAAATTTTGAACGCAAATGGCACT
AACAGGTTTTTATCTGTTAGTATGTTCAATTGAGGGTCTTTTGACTAGAATCTGGCAATC
GGCTGTGATTGCTTTTTTCGGTAAGCTACTTTGCTTTTGTGAAGTACCTTTTCGGTATGGC
TATTTGATTGTCTAATGGATGTCTGGCTAGCTGTTTCTTTGCTAGACGTCTGCAATCATT
TGGCATTGCGTAGTGTGTTGATTAATGGTTTAGCGCGTTTCTTGCTAACTGACTTTTACAC
AAGCAAGTGTAATACGTTTCTTAAAGTCAGCTCATTAATCAATGTGGTTTTCTGACTTGA
NTTTGTTCGGTCAATTGTGCTATGCTCTGCTAATCTTTCGAACCTAGACTCCA

```

Ek 1. Şekil 2. 61 numaralı izolata ait rRNA ITS bölgesi dizin analizi (772 bp.)

```

TGATTCTTTGGAAC TTTGGCTTGATCTGTGAGTGTGGCTGCATGTGGGAGTGGCCTTGGT
CTGTCTCCTTGCACACCTTGCTTGTGTAGCACCTTTGAGTGTCCGAGCATTGGTCTGGC
GGCTTTGTGCGACCGCAAGCCCTTTAATGTGGCAACAGGACTTTTTTTTTTTTTTTTTGN
GTANTGCGGAAGGATCATTATTGAGCTTATCCATTTACTTGGATTCAAATGAATCGAGCT
GAATTTTCGCTGTTTCGTTTCAAAGCGTTGTATTCTCTCAACTAACGGCTATGAATGGTTT
CTATAGGTGTCTGGAGCAGTTGTATGAGCGTGACTGTGGTGTATGGACATTTTGGTGGCTC
CTTAGTCGGGTCACTAGAAATTAAGAAGTCTGTTATGACTCGCCGTTCTTAAAAAACTTC
AATTAACGTTTGATCAATTTGACTGCACCAGCCGTAGGTGTACTTAAAGATTTATCAAGT
CTTGTCGGTGGATCACTCGGTTTCGTAGTTCGATGAAAAACGGGGCAAAAACCGTTATTTG
GCGTGAATTGCAGACATATTGAACGCTAAAATTTTGAACGCAAATGGCACTATCAGGTTT
ATATTTGTTAGTATGTTTGGTTGAGGGTCGATTAATTCGTAACCTGCAGTCTTCTGTGAC
TGTTTTTTTTGATTAGTTATTTGGTTTTTTTTATCGAGTACCTTTTTGGAATGTGAATTTGA
TTGTTTAAATTCGTTTCCCTAATCGAAACGAGCTATTTTTTATTTCTGTGCAATGTATTTT
TGGTGTTCGCGCTTTTTCTTGCCGACTGATTGGTACAACTTAACAGTTCGTATATTTT
TCAGAATTTTTTCAGAGGCCCTTACAATACATCACTTGACACAACACGTATCGTTTGTGCA
GGAATTGCGCAAGAAAGAACTTTCGTTTACGACCCCACTCCC

```

Ek 1. Şekil 3. 80 numaralı izolata ait rRNA ITS bölgesi dizin analizi (943 bp.)

```

GAGCTTATCCATTTACTTGGATTCAAATGAATCGAGCTGAATCTTTGCTGTTTGTTCGA
AGCGATGTATTCTCTCAACTAACGGCTATGAAGGGTTTCTGTAGGTGTCTGGAGCAGTTG
TATGTGCGTGACTGTGGTGTATGGACATTTGAGTCTTCTGGAAGTAGAATTAAGAAGTC
TGATACGACTCGCCGTTCTTAAAAAACTTCAATTAACGTTTGAACAATTTGACTGCACCA
GCCGTAGGTGTAATTAAGATTTATCAAGTCTTGTCGGTGGATCACTCGGTTTCGTAGTTC
GATGAAAAACGGGGCAAAAACCGTTATTTGGCGTGAATTGCAGACATATTGAACGCTAAA
ATTTTGAACGCAAATGGCACTATCAGGTTTATATCTGTTAGTATGTTTGGTTGAGGGTCG
ATTAATTCGTAACCTGCAGTCCGCCGTGACTGTTCTTTCGATCAGCTACTTGATCTGCAT
TGCTGATCGAGTACCTGTTTGGTATGTAACTTTTGATAGTCTAATTCGTTTCTTAATGT
AACGAGCTATCTTTGAATTCTGTGCGTTGTATCTTTGGTGTTCGCGCGGTTTCTTGCCG
ACTGAATTGTACGGACGTAACAGTACGTATATGCTTCAATTTATTTCAGATGCCCTAAGGT
TACATCACTCGACACAACACGTTTTCGTTTGTGAATAATTGCGCAAGAAAGAACTTTTC
GTTTTACGACCTCAACTCAAGCAAGACTATCCGCTGACTTATAACCC

```

Ek 1. Şekil 4. 81 numaralı izolata ait rRNA ITS bölgesi dizin analizi (767 bp.)

```

TGATTCTTTGGAACCTTTGGCTTGATCTGTGAGTGTGGCTGCATGTGGGAGTGGCCTTGGT
CTGTCTCCTTGCACACCTTGCTTGTGTAGCACCTTTGAGTGTCCGAGCATTGGTCTGGC
GGCTTTGTGCGACCGCAAGCCCTTTAATGTGGCAACAGGACTTTTTTTTTTTTTTTTTGN
GTANTGCGGAAGGATCATTATTGAGCTTATCCATTTACTTGGATTCAAATGAATCGAGCT
GAATTTTCGCTGTTTCGTTTCAAAGCGTTGTATTCTCTCAACTAACGGCTATGAATGGTTT
CTATAGGTGTCTGGAGCAGTTGTATGAGCGTGACTGTGGTGTGGACATTTTGGTGGCTC
CTTAGTTCGGGTCACTAGAAATTAAGAAGTCTGTTATGACTCGCCGTTCTTAAAAAACTTC
AATTAACGTTTGATCAATTTGACTGCACCAGCCGTAGGTGTACTTAAAGATTTATCAAGT
CTTGTCGGTGGATCACTCGGTTTCGTAGTTCGATGAAAAACGGGGCAAAAACCGTTATTTG
GCGTGAATTGCAGACATATTGAACGCTAAAATTTTGAACGCAAATGGCACTATCAGGTTT
ATATTTGTTAGTATGTTTGGTTGAGGGTCGATTAATTCGTAACCTGCAGTCTTCTGTGAC
TGTTTTTTTTGATTAGTTATTTGGTTTTTTTTATCGAGTACCTTTTTTGAATGTGAATTTGA
TTGTTTAAATTCGTTTCCCTAATCGAAACGAGCTATTTTTTATTTCTGTGCAATGTATTTT
TGGTGTTCGCGCTTTTTCTTGCCGACTGATTGGTACAACTTAACAGTTCGTATATTTT
TCAGAATTTTTTCAGAGGCCCTTACAATACATCACTTGACACAACACGTATCGTTTGTGCA
GGAATTGCGCAAGAAAGAACTTTCGTTTACGACCCCACTCCC

```

Ek 1. Şekil 5. 83 numaralı izolata ait rRNA ITS bölgesi dizin analizi (943 bp.)

```

TAGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAGCTAATATTTTCCTTTTTAATCAAGTTTTTCG
CTGTTTCGTTTCTAAGCTTTAACTTGATCTCTAACGGCTTTGAAAGGTTTCTACAGATGTT
TGGAGCAGTTGTATGAGCGTGACTGTGCTGATGAACATTGTACATTGTTATCTAAGCGTT
TCGATGTTTCTAGAATGCTTAGTGATGAGAATTAAGAGGTCTGCTGACTCGCCATTCTT
TGATTGCTAACAAAAACGTTTTGTTTCGATAAATGTGTCACTCGTTGATGCATTTTTTAA
TTATCAAGTCTTATCGGTGGATCACTCGGTTTCGTAGGTCGATGAAAAACGGGGCAAAAAC
CGTTATTTGGCGTGAATTGCAGACATATTGAGCGCTAAAATTTTGAACGCAAATGGCACT
AACAGGTTTTTATCTGTTAGTATGTTCAATTGAGGGTCTTTTTGACTAGAATCTGGCAATC
GGCTGTGATTGCTTTTTTCGGTAAGCTACTTTGCTTTTTGTGAAGTACCTTTTCGGTATGGC
TATTTGATTGTCTAATGGATGTCTGGCTAGCTGTTTCTTTGCTAGACGTCTGCAATCATT
TGGCATTGCGTAGTGTTTGATTAATGGTTTAGCGCGTTTCTTGCTAACTGACTTTTACAC
AAGCAAGTGAATACGTTTCTTAAAGTCAGCTCATTAATCAATGTGGTTTTCTGACTTGA
NTTTGTGCGTCAATTGTGCTATGCTCTGCTAATCTTTCGAACCTAGACTCCA

```

Ek 1. Şekil 6. 85 numaralı izolata ait rRNA ITS bölgesi dizin analizi (772 bp.)

```

CAAGCCCTTTAATGTGGCAACAGGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTGNGTANTGCGGAAGGAT
CATTATTGAGCTTATCCATTTACTTGGATTCAAATGAATCGAGCTGAATTTTCGCTGTTT
GTTTCAAAGCGTTGTATTCTCTCAACTAACGGCTATGAATGGTTTCTATAGGTGTCTGGA
GCAGTTGTATGAGCGTGACTGTGGTGTATGGACATTTTGGTGGCTCCTTAGTCGGGTCACT
AGAATTAAGAAGTCTGTTATGACTCGCCGTTCTTAAAAAACTTCAATTAACGTTTGATC
AATTTGACTGCACCAGCCGTAGGTGTACTTAAAGATTTATCAAGTCTTGTTCGGTGGATCA
CTCGGTTTCGTAGTTTCGATGAAAAACGGGGCAAAAACCGTTATTTGGCGTGAATTGCAGAC
ATATTGAACGCTAAAATTTGAACGCAAATGGCACTATCAGGTTTATATTTGTTAGTATG
TTTGGTTGAGGGTTCGATTAATTCGTAACCTGCAGTCTTCTGTGACTGTTTTTTTGATTAG
TTATTTGGTTTTTTTTATCGAGTACCTTTTTGGAATGTGAATTTGATTGTTAATTCGTTT
CCCTAATCGAAACGAGCTATTTTTTATTTCTGTGCAATGTATTTTTTGGTGTTCGGCGTT
TTTCTTGCCGACTGATTGGTACAACTTAACAGTTCGTATATTTTTTCAGAATTTTTTCAGA
GGCCCTTACAATACATCACTTGACACAACACGTATCGTTTGTTCGAGGAATTGCGCAAGAA
AG

```

Ek 1. Şekil 7. 90 numaralı izolata ait rRNA ITS bölgesi dizin analizi (782 bp.)

```

GAGTTGTAAAACGGAAAGTTTTTTTTCTTGGGCCATTTCTTGACAAACGGATACGTGGT
GGTGTCAAAGGGTTGTATTGGAAGGGCCTTTGGAAAATTTGAAAAATATAGGAATTGA
TAAGTTTGGTCCCATTCAGTTGGCCAAGAAAAACGCCGAAACCCCAAAAAATACCTTGCC
ACAGAAATAAAAAATAGGTTGGTTTCGATTAGGAAAAGAATTAGACCATTAAATTCGCCCT
TTCAAAAAGGTTCTTGATAAAAAAACCAAATAACTAATCGAAAAACAGGTCACAGCAGA
CTGCAGGTTACGAATTAATCGACCCTCAACCAAACATAACACTGCAGGTTACGAATTAAT
CGACCCTCAACCAAACATAGGTGCCATTTGGCGTTCAAAATTTTACGCGTTCAATATGTC
TGCAATTCACGCCCAAATAACGGTTTTTTGCCCGTTTTTTCATCGAACTAACGAACCGAAG
TGATCCACCGAACAAGACTTGATAAATCCTTTAAGTACACCTACGGCTGGTGCAGTCAA
TTGATCAAACGTTAATTGAAGTTTTTTAAGAACGGCGAGTCATAACAGAACTTCTTTAAT
TCTAGTGACCCGACTAAGGAGCCACAAAATGTCCATCACCACAGTCACGCTCATAAAC
TGCTCCAGACACCTATAGAAACCATTATAGCCGTTAGTTGAGAGAATACAACGCTTTGA
AACGAACAGCGAAAATTCAGCTCGATTCATTTGAATCCAAGTAAATGGATAAGCTCAA

```

Ek 1. Şekil 8. 93 numaralı izolata ait rRNA ITS bölgesi dizin analizi (778 bp.)



**EK 2.**

```
GAGGAAAGCTCAGCGTCGAAACCAAGTTGGCTAACGTTGACTTGGTGTGTGACGTATAG
AGGCGTTCATGTGCGGTTTGTGATAATGCGAATTTTCCTTTGACTAGGGATCCAAAGAG
GGTGCTAGACCCTTACGCATTGTTGACTTTTCGTACGCGTTCGTTTGATGGAGTAGGGTT
GTTTTGGATCGCAGCCCAAAGTAGGTGGTATACTTCATCTAAAGCTAAATACGACTACGA
ATCCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGTACTTTGAAGAGAGATCTTC
AAGAGGACGTGAAACCGGTAGGGTGAAGCAGATATAAGTTGACGAACGTGTGTTCGTATT
CAGAACTACAATTTGTGGTTTCCTTTTTACGATCGATGTGGGCTGGCGTCTTTGGTTAAC
TTAGTGTCTGGCGGCAATGGTGACCCTGCGGAGGGATACTCGGTTGTTCGTGCGATGCTTG
GTATGGCTAGAGGTTTCGCTGGTTTTAAAGTCATCGCGTTTATCTGACCCGTCTTGAAACA
CGGACCAAGGAGTGTACCGCTTACGCGAGTCTTAGAGTGTGTCAAACTTTGAGGCGTAA
CGAAAGTAAATGTGGATTTATTCAGTACTTGGGATACGTTGTCTTTTTTTGGATAGCGTT
GGACCATGGTTTTATCGTAAATCGCTTTCGATGCGGTGAAAATAGAGCGTAAGCGGTGCG
ACCCGAAAGATGGTGAACATGCCTGAGCAGGATGAAGCCGGAGGAAACTCTGGTGAAG
TCCGAAGCGGTTCTGACGTGCAAATCGATCGTCTGACTGGGTATAG
```

**Ek 2. Şekil 1. 10 numaralı izolata ait rRNA D2D3 bölgesi dizin analizi (826 bp.)**

```
GGATTTTCCTTAGTAACTGCGAGTGAAACGGAAAGAGCTCAGCGTCGAAACCGTGTTGGCT
TTCGTTGACACGGTATTGTGACGTATAGAGGTGATCATGTGCGGTTTGTGGCTTTACGA
ATTTTCCTTTGACTAGGAATCCATAGCGGGTGCAAGACCCGTACGTATTGCCGGTTTTTCG
GTACGCGTTTATCTCTTGGAGTAGGGTTGTTTGAGATCGCAGCCCTAAGTAGGTGGTATA
GTTTCATCTAAAGCTAAATACGACTACGAATCCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAC
TTGCAAAGTACATTGAAGAGAGACTTCAAGAGGACGTGAAACCCGATAGGATGGAAGCAG
ATGAAGTTGACGAACGTGTGTTCGTATTCAAATCGCTGTCAGCGGTTTGTTTTTACGGCC
GATGTGGGCCGGCGGCTTAGGTCAATGCAACGCGTCTAGCGTCGATGGTGACCCTGCGGA
GGGACAATCAGTCGTCGTACGGTGCTTGGTATGGCTAAGGTTTCGGCGGTCTTAAAGTCA
GCGCCACATCTGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTGTAGCGTTTTCGCAAGTCTT
AGAGTGTATCGAACTTTGAGGCGTAACGAAAGTAAATGCAGTTTAATCTGCTGACTTGG
GATGCGTTGTCTCTTGTGGACGGCGCTGGACCAAGGTTTTATCGCGATCGCTTGC GGTC
GGTGAAAATAAGAGCGTAAACGGTTCGACCCGAAAGATGGTGAACATGCCTGAGCAGGA
TGAAGCCGGAGGAAACTCTGGTGAAGTCCGAAGCGGTTCTGACGTGCAAATCGATCGTC
TGACTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATCCA
```

**Ek 2. Şekil 2. 61 numaralı izolata ait rRNA D2D3 bölgesi dizin analizi (819 bp.)**

```

GGATTCCCTTAGTAACTGCGAGTGAAACGGAAAAGAGCTCAGCGTCGAAACCGTGTTGGC
TTTAGGTTGACACGGTATTGTACGTATAGAGGTGATCATGTGCGGTTTGCTGGCTTTAC
GAATTTCCCTTTGACTAGGAATCCATAGCGGGTGCAAGACCCGTTACGTAGTGCCGGTTTT
TCGTACGCGTTTATCTCTTGGAGTAGGGTTGTTTGAGATCGCAGCCCTAAGTAGGTGGTA
TAGTTCATGTAAAAGCTAAATACGACTAACGAATCCGATAGCAAACAAGTACCGTGAAGG
GAAAGATGCAAAGTACTTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGGACGTGAAACCGATAGGATGGAA
GCAGATGAAGTTGACGAACGTGTGTCGTATTCAAATCGCTGTCAGCGGTTTGATTTTTTA
CGGCCGATGTGGGCCGGCGGCATTATGGTCAAAGCAACGCGTCTAGCGTCGATGGTGACC
CTGCGGAGGGACAATCAGTCGTACGGTGCTTGGTATGGCTAAAGGTTTCGCCGGTCT
TAAAGTCAGCGCCTCATCTGACCCGCTTGAAAACACGGACCAAGGAGTGTAGCGTTTGC
GCAAGTCTTAGAGTGTATCGAAACTTTGAGGCGTAACGAAAGTAAATGCAGTTTAAATCTG
CTGACATTGGGATGCGTTGTCTCTTGTGGACGGCGCTGGACCAAGGTTTTATCGCGATCG
CTTGCGGTGCGGTGAAAATAGAGCGTAAACGGTGCGACCCGAAAGATGGTGAACATATGCC
TGAGCAGGATGAAGCCGGAGGAAACTCTGGTGGAAAGTCCGAAGCGGTTCTGACGTGCAA
TCGATCGTCTGACTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTATATC

```

Ek 2. Şekil 3. 80 numaralı izolata ait rRNA D2D3 bölgesi dizin analizi (880 bp.)

```

GGATTTCCCTTAGTAACTGCGAGTGAAACGGAAAGAGCTCAGCGTCGAAACCGTGTTGGCT
CTCGTTGACACGGTATTGTGACGTATAGAGGTGATCATGTGCGGTTTGCTGGCTTTACGA
ATTTCCCTTTGACTAGGAATCCATAGCGGGTGCGAAGACCCGTACGTATTGCCGACTTTCT
GTACGCGTTTATCTCTTGGAGTAGGGTTGTTTGAGATCGCAGCCCTAAGTAGGTGGTATA
CTTCATCTAAAGCTAAATACGACTACGAATCCGATAGCAAACAAGTATCCGTGAGGGAAA
GTTGACAAAGTACTTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGGACGTGAAACCGATAGGATGGAAGCA
GATGAAGTTGACGAACGTGTGTCGTATATCAGAATCGCTTTCAGCGGTTTGTTTTTACGG
CCGATGTGGGCTGGCGGCTTTGGTCAATGCAACGCGTCTAGCGTCGATGGTGACCCTGCG
GAGGGACAATCAATCGGCGTACGGTGCTTGGTATGGCTAAGAGTTTCGCCGGTCTTAAAG
TCAGCGCCTCATCTGACCCGCTTGAAAACACGGACCAAGGAGTGTAGCGTTTGCGCAAGT
CTTAGAGTGTATCGAAACTTTGAGGCGAAACGAAAGTAAATGCAGTTTAAATCTGCTGACT
TGGGATGCATTGTCTCTTGTGGACGGCGCTGGACCAAGGTTTTATCGCGATCGTTGCGG
TGCGGTGAAAATAGAGCGTAAACGGTGCGACCCGAAAGATGGTGAACATATGCCTGAGCAG
GATGAAGCCGGAGGAAACTCTGGTGGAAAGTCCGAAGCGGTTCTGACGTGCAAATCGATCG
TCTGACCTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATC

```

Ek 2. Şekil 4. 81 numaralı izolata ait rRNA D2D3 bölgesi dizin analizi (873 bp.)

```

TGAAACGGAAGAGCTCAGCGTCGAAACCGTGTTGGCTTTCGTTGACACGGTATTGTGACG
TATAGAGGTGATCATGTGCGGTTTGCTGGCTTTACGAATTTCCCTTTGACTAGGAATCCAT
AGCGGGTGCAAGACCCGTACGTATTGCCGGTTTTTCGTACGCGTTTTATCTCTTGGAGTAG
GGTTGTTTGAGATCGCAGCCCTAAGTAGGTGGTATACTTCATCTAAAGGTTAAATACGACT
ACGAATCCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGTACTTTGAAGAGAGAG
TTCAAGAGGACGTGAAACCGATAGGATGGAAGCAGATGAAGTTGACGAACGTGTGTGCGTA
TTCAAAATCGCTGTCAGCGGTTTGTTTTTTACGGCCGATGTGGGCCGGCGGCTTTGGTCAA
TGCAACGCGTCTAGCGTCGATGGTGACCCTGCGGAGGGACAATCAGTCGGCGTACGGTGC
TTGGTATGGCTAAGGTTTCGCCGGTCTTAAAGTCAGCGCCTCATCTGACCCGTCTTGAAA
GACGGACCAAGGAGTGTACCGTTTGCGCAAGTCTTAGAGTGTATCGAAACTTTGAGGCGT
AACGAAAGTAAATGCAGTTTTATCTGCTGACTTGGGATGCGTTGTCTCTTGTGGACGGCG
CTGGACCAAGTTTTATCGCGATCGCTTGC GG TGCGGTGAAAATAGAGCGTAAACGGTGC
GACCCGAAAGATGGTGAAC TATGCCTGAGCAGGATGAAGCCGGAGGAAACTCTGGTGGAA
GTCCGAAGCGGTTCTGACGTGCAAATCGATCGTCTGACTTGG

```

Ek 2. Şekil 5. 83 numaralı izolata ait rRNA D2D3 bölgesi dizin analizi (822 bp.)

```

AGCTCAGCGTCGAAACCGTGTTGGCTTTCGTTGACACGGTATTGTGACGTATAGAGGTGA
TCATGTGCGGTTTGCTGGCTTTACGAATTTCCCTTTGACTAGGAATCCATAGCGGGTGCAA
GACCCGTACGTATTGCCGGTTTTTCGTACGCGTTTATCTCTTGGAGTAGGGTTGTTTGAG
ATCGCAGCCCTAAGTAGGTGGTATACTTCATCTAAAGCTAAATACGACTACGAATCCGAT
AGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGTACTTTGATAGAGAGAGTTCAAGAGGA
CGTGAAACCGATAGGATGGAAGCAGATGAAGTTGACGAACGTGTGTGCGTATTCAAAATCG
CTGTCAGCGGTTTGTTTTTTACGGCCGATGTGGGCCGGCGGGCTTTGGTCAATGCAACGCG
TCTAGCGTCGATGGTGACCCTGCGGAGGGACAATCAGTCGGTGTACGGTGCTTGGTATGG
CTAAGGTTTCGCCGGTCTTAAAGTCAGCGCCTCATCTGACCCGTCTTGAAACACGGACCA
AGGAGTGTAGCGTTTGCGCAAGTCTTAGAGTGTATCGAAACTTTGAGGCGAAACGAAAGT
AAATGCAGTTTAAATCTGCTGACTTGGGATGCGTTGTCTCTTGTGGACGGCGCTGGACCAA
GGTTTTTATCGCGATCGCTTGC GG TGCGGTGAAAATAGAGCGTAAACGGTGC GACCCGAAA
GATGGTGAAC TATGCCTGAGCAGGATGAAGCCGGAGGAAACTCTGGTGGAAAGTCGGAAGC
GGTTCTGACGTGCAA

```

Ek 2. Şekil 6. 85 numaralı izolata ait rRNA D2D3 bölgesi dizin analizi (795 bp.)

```

GGATTTTCCTTAGTAACTGCGAGTGAAACGGAAAGAGCTCAGCGTCGAAACCGTGTTGGCT
TTCGTTGACACGGTATTGTGACGTATAGAGGTGATCATGTGCGGTTTGCTGGCTTTACGA
ATTTCCCTTTGACTAGGAATCCATAGCGGGTGCAAGACCCGTACGTATTGCCGGTTTTTCG
TACGCGTTTATCTCTTGGAGTAGGGTTGTTTGAGATCGCAGCCCTAAGTAGGTGGTATAC
TTCATCTAAAGCTAAATACGACTACGAATCCGATAGCAAACAAAGTACCGTGAGGGAAAG
TTGCAAAGTACTTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGGACGTGAAACCGATAGGATTGGAAGCAG
ATGAAGTTGACGAACGTGTGTCGTATTCAAATCGCTGTCAGCGGATTGTTTTTACGGCC
GATGTGGGCCGGCGGCTTTGGTCAATGCAACGCGTCTAGCGTCGATGGTGACCCTGCGGA
GGGACAATCAGTCGTCGTACGGTGCTTGGTATGGCTAAGGTTTCGCCGGTCTTAAAGTCA
GCGCCTCATCTGACCCGTCTTGAACACGGACCAAGGAGTGTAGCGTTTGCGCAAGTCTT
AGAGTGTATCGAAACTTTGAGGCGTAACGAAAGTAAATGCAGTTTAATCTGCACACTTGG
GATGCGTTGTCACTTGTGGACGGCGCTGGACCAAGGTTTTATCGCGATCGCTTGC GGTC
GGTGTAAATAGAGCGTAAACGGTGCGACCCGAAAGATGGTGAACATGCCTGAGCAGGAT
GAAGCCGGAGGAAACTCTGGTGGAAGTCCGAAGCGGTTCTGACGTGCAAATCGATCGTCT
GACTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATC

```

Ek 2. Şekil 7. 90 numaralı izolata ait rRNA D2D3 bölgesi dizin analizi (869 bp.)

```

TCCTTAGTAAAACGGCGAGTGAAACGGAAAGAGCTCAGCGTCGAAACCGTGTTGGCTTTC
GTTGACACGGTATTGTGACGTATAGAGGTGATCATGTGCGGTTTGCTGGCTTTACGAAGT
TCCTTTGACTAGGAGTCCATAGCGGGTGCAAGACCCGTACGTATTTGCCGGTTTTTCGTA
CGCGTTTATCTCTTGGAGTAGGGTTGTTTGAGATCGCAGCCCTAAGTAGGTGGTATACTT
CATCAAAGCTAAATACGACTACGAAATCCGATAGCAAACAACCACCGTGAGGGAACGTT
GCAAAGTACCTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGGACGTGAAACCGATAGGATGGAAGCAGATG
AAGTTGACGAACGTGTCTCGTAATCAAATCGCTGTCAGCGGTTTGTTTTTACGGCCG
ATGTGGGCCGGCGGCTTTGGTCAATGCAACGCGTCTAGCGTCGATGGTGACTCCTGCGGA
GGGGACAATCAGTCGGCGTACGGTGCTTGGTATGGCTAAGGGTTCGCCGGTCTTAAAGTC
AGCGCCTCATTTGACCCGTCTTGAACACGGACCAAGGAGTGTAGCGTTTGCGCAAGTCT
TAGAGTGTATCGAAACTTTGAGGCGTAACGAAAGTAAATGCAGTTTAATCTGCTGACTTG
GGATGCGTTGTCTTGTGGACGGCGCTGGACCAAGGTTTTATCGCGATCGCTTGC GGTC
CGGGAAAATAGAGCGAAACGTGCCAGGC

```

Ek 2. Şekil 8. 93 numaralı izolata ait rRNA D2D3 bölgesi dizin analizi (749 bp.)

**EK 3.**

```

TGAAGAGTTTTATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCG
GACGGTAACAGGAAACAGCTTGCTGTTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTC
TGGGGATCTGCCCGATGGAGGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATGACC
TCTTGGGAGTAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACGCCATCGGATGAACCCAGATGGGAT
TAGCTAGTAGGCGGGGTAATGGCCCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGAT
GACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
TATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGG
GTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGTAAGTCTGAACAGGGCTTACGATTGACG
TTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTG
CAAGCGTTAATCGGAACTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCAATTAAGTTGGATG
TGAAATCCCCGGGCTTAACCCGGGAACGGCATCCAAGACTGGTTGGGTAGAGTCTCGTAG
AGGGGGGTAGAATACCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTG
GCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGCTGTGCCCTTG
AGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT
TAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
TGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACAACCACGGAATCAGGCAGAGATGCCGGAG
TGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATG
TTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTGATGGTGG
GAACTCAACGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATC
ATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGAGAAGCGACC
TCGCGAGAGCAAGCGGAACTCATAAAGTCTGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCG
ACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGC
TTAACCTTCGGGGG

```

Ek 3. Şekil 1. 10 numaralı izolat ile simbiyotik yaşayan bakterilere ait 16 S rRNA bölgesi dizin analizi (1467 bp.)

```

GATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGGGAAGCTTG
CTTCCCCGCGGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTGCCCGATGGAGGG
GGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCAAAACCTCTGTGGAGTAAAGTGGGGGAC
CTTCGGGCCTCACGCCAATCGGATGAACCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATG
GCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCAGACTCCTACCCGGAGGGAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAG
CCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCG
GGGAGGAAGGCAACAGCGTAAATAGCGCTGTTGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACC
GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAC
TGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCAATTAAGTTAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACC
TGGGAACGGCATCTAAAACCTGGTTGACTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCACGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAAGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGAC
GAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGG
GTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTGAGGCGTGCTTCCGGAGCTA
ACGCGTTAAATCGTCCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGAC
GGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTYGATGCAACGCGAAGAACCTTAC
CTACTCTTGACATCCTCAGAATTTGCTGGAGACAGCGAAGTGCCTTCGGGAACTGAGAGA
CAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGAACTCAAGGGAGACTGCCG
GTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGC
TACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGAACT
CATAAAGTCTGTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCG
CTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC
CGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGGGGGCGCT
TACCACTTTGTGATTCATGACTGGG

```

Ek 3. Şekil 2. 61 numaralı izolat ile simbiyotik yaşayan bakterilere ait 16 S rRNA bölgesi dizin analizi (1370 bp.)

```

GATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGGGGAAGCTTG
CTTCCCCGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTGCCCGATGGAGGG
GGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAACCACTTCTGGAGTAAAGTGGGGGA
CCTTCGGGCCTCACGCCATCGGATGAACCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGGTGGGGTAAT
GGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAG
CCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTATAAGTACTTTTCAGC
GGGGAGGAAGGCAACAGCGTAAAAATAGCGCTGTTGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC
ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAAT
TACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCAATTAAGTTAGATGTGAAATCCCCGGGCTCA
AGGCTGGGAACGGCATCTAAAACCTGGTTGACTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCC
ACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCT
GGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGG
TAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTGAGGCGTGCTTCCGGAGC
TAACGCGTTAAATCGTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTG
ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTYGATGCAACGCGAAGAACCTT
ACCTACTCTTGACATCCTCAGAATTTGCTGGAGACAGCGAAGTGCCTTCGGGAAGTGAAGA
GACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGAAGTCAAGGGAGACTGC
CGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGG
GCTACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGAA
CTCATAAAGTCTGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCCGGAAT
CGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
CCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGGGGGCG
CTTACCCTTTGTGATTCATGACTGGGTGGCCG

```

Ek 3. Şekil 3. 80 numaralı izolat ile simbiyotik yaşayan bakterilere ait 16 S rRNA bölgesi dizin analizi (1474 bp.)

```

AGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGGGGAAGCTT
GCTTCCCCGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTGCCCGATGGAGG
GGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAACCTCTGTGGAGTAAAGTGGGGGA
CCTTCGGGCCTCACGCCATCGGATGAACCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATG
GCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGC
CTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGG
GGAGGAAGGCAACAGCGTAAATAGCGCTGTTGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCG
GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACT
GGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCAATTAAGTTAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCT
GGGAACGGCATCTAAAACCTGGTTGACTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATCCACGTG
TAGCGGAGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACG
AAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTC
CACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCGGGAGCTA
ACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGAC
GGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTA
CCTACTCTTGACATCCTCAGAATTTGCTGGAGACAGCGAAGTGCCTTCGGGAACCTGAGAG
ACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTTTAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGAACCTCAAGGGAGACTGC
CGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGG
GCTACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGAA
CTCATAAAGTCTGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGGGTCGGA
ATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC
CGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGGGGG
CGCTTACCACCTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTAGGGGAA
CCTTCCGGGGG

```

Ek 3. Şekil 4. 81 numaralı izolat ile simbiyotik yaşayan bakterilere ait 16 S rRNA bölgesi dizin analizi (1484 bp.)



GAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGA  
 GCGGCAGCGGGGGGAAGCTTGCTTCCCCGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCT  
 GGGGATCTGCCCCGATGGAGGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAACCT  
 CTGTGGAGTAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACGCCATCGGATGAACCCAGATGGGATT  
 AGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGAAG  
 ACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT  
 ATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGG  
 TTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGACGAAGGCAACAGCGTAAATAGCGTTGTTGATTGACGT  
 TACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGC  
 AAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCAATTAAGTTAGATGT  
 GAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGGCATCTAAAACCTGGTTGACTAGAGTCTCGTAGA  
 GGGGGGTACAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGG  
 CGAAGGCGGCCCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA  
 GGATTAGATACCCTGGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTT  
 GAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTAATCGGCCGCAA  
 GGTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT  
 CGATGCAACGCGAAGAACCCTTACTCTTGACATCCTCAGAATTTGCTGGAGACAGCG  
 AAGTGCCTTTCGGGAACTGAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGA  
 AATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTAATG  
 GTGGGAACCTCAAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGT  
 CATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGAGAAGC  
 GACCTCGCGAGAGCAAGCGGAACTCATAAAGTCTGTTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAA  
 CTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACG  
 TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGG  
 TAGCTTAACCTTCGGGGGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTA  
 ACAAGGTAACC

Ek 3. Şekil 5. 83 numaralı izolat ile simbiyotik yaşayan bakterilere ait 16 S rRNA bölgesi dizin analizi (1511 bp.)

```

TCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGGGGAAGC
TTGCTTCCCCGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTGCCCGATGGA
GGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAACCTCTGAGGAGTAAAGTCGGG
GACCTTCGGGCCTCACGCCATCGGATGAACCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAA
TGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCCAGACTCCTAGGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAA
GCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGTACTTTTCAGC
GGGGAGGAAGGCAACAGCGTAAATAGCGYTGTTGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCAC
CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTA
CTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCAATTAAGTTAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAAC
CTGGGAACGGCATCTAAACTGGTTGACTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCACG
TGTAGCGGTGAAATGGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGG
ACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGC
TAACGCGTTAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTG
ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCGACGCGAAGAACCTT
ACCTACTCTTGACATCCTCAGAATTTGCTGGAGACAGCGAAGTGCCTTCGGGAACTGAGA
GACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTG
GGAActCAAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAT
CATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGAGAAGCGAC
CTCGCGAGAGCAAGCGGAACTCATAAAGTCTGTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTC
GACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTT
CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAG
CTTAACCTTCGGGGGGCGCTTACCCTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACA
AGGGCCTTAATAGGCA

```

Ek 3. Şekil 6. 85 numaralı izolat ile simbiyotik yaşayan bakterilere ait 16 S rRNA bölgesi dizin analizi (1498 bp.)

GAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGA  
 GCGGCAGCGGGGGGAAGCTTGCTTCCCCGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCT  
 GGGGATCTGCCCCGATGGAGGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAACCT  
 CTGTGGAGTAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACGCCATCGGATGAACCCAGATGGGATT  
 AGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGAAG  
 ACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT  
 ATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGG  
 TTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGACGAAGGCAACAGCGTAAATAGCGTTGTTGATTGACGT  
 TACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGC  
 AAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCAATTAAGTTAGATGT  
 GAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGGCATCTAAAACCTGGTTGACTAGAGTCTCGTAGA  
 GGGGGGTACAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGG  
 CGAAGGCGGCCCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCCAAAGCGTGGGGAGCAAACA  
 GGATTAGATACCCTGGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTT  
 GAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTAATCGGCCGCAA  
 GGTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT  
 CGATGCAACGCGAAGAACCCTTACTCTGACATCCTCAGAATTTGCTGGAGACAGCGA  
 AGTGCCTTTCGGGAACCTGAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAA  
 ATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTAATGG  
 TGGGAACCTCAAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC  
 ATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGAGAAGCG  
 ACCTCGCGAGAGCAAGCGGAACCTCATAAAGTCTGTCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAAC  
 TCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGT  
 TCCCCGGCCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTGCAAAAGAAGTAGGT  
 AGCTTAACCTTCGGGGGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAA  
 CAAGGTAACCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTAGGACCGCAATATTGC

Ek 3. Şekil 7. 90 numaralı izolat ile simbiyotik yaşayan bakterilere ait 16 S rRNA bölgesi dizin analizi (1559 bp.)

```

CCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGG
GGAAGCTTGCTTCCCCGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTNCCC
GATGGAGGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAACCTCTGTGGAGTAAA
GTGGGGGACCTTCGGGCCTCACGCCATCGGATGAACCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTG
GGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG
GCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACT
TTCAGCGGGGAGGAACGCAACAGCGTAAATAGCGCTGTTGATTGACGTTACCCGCAGAAG
AAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG
GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCAATTAAGTTAGATGTTGAAAACCCCGG
GCTCAACCTGGGAACGGCATCTAAAACCTGGTTGACTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAA
TTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCC
CCCTGGACGAAGACTGACGCTCACCGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGAAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTT
CCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAA
TGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAA
CCAACCTTACCTACTCTTGACATCCTCAGAATTTGCTGGAGACAGCGAAGTGCCTTCGGG
AACTGAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTAA
TCCCCGAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGAACCTCAAGG
GAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTA
CGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGC
AAGCGGAACCTATAAAGTCTGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAA
GTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT
ACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCG
GGNNGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTA
ATATTTGGCCC

```

Ek 3. Şekil 8. 93 numaralı izolat ile simbiyotik yaşayan bakterilere ait 16 S rRNA bölgesi dizin analizi (1441 bp.)

## ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Elazığ'da doğdu. 1989-1994 yılları arasında Elazığ Namık Kemal İlkokulu'nda, ortaokulu 1994-1997 yılları arasında Elazığ Mezre Ortaokulu'nda, lise eğitimini 1997-2000 yılları arasında Elazığ Mehmet Akif Ersoy Lisesi'nde tamamladı. 2002-2003 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde lisans öğrenimine başladı. 2007 yılında mezun oldu. 2008-2009 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.