

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TRABZON YÖRESİNDEN ENTOMOPATOJEN NEMATODLARIN
İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE *MELOLONTHA MELOLONTHA*
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep ERBAŞ

AĞUSTOS 2012

TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TRABZON YÖRESİNDEN ENTOMOPATOJEN NEMATODLARIN
İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE *MELOLONTHA MELOLONTHA*
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Zeynep ERBAŞ

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

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 24/07/2012
Tezin Savunma Tarihi : 13/08/2012**

Tez Danışmanı : Doç. Dr. İsmail DEMİR

Trabzon 2012

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalında

Zeynep ERBAŞ tarafından hazırlanan

**TRABZON YÖRESİNDEN ENTOMOPATOJEN NEMATODLARIN
İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE *MELOLONTHA MELOLONTHA*
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 24/07/2012 gün ve 1467 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Üye : Doç. Dr. İsmail DEMİR

Üye : Prof. Dr. Mahmut EROĞLU

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Trabzon Yöresiden Entomopatojen Nematodların İzolasyonu, Karakterizasyonu ve *Melolontha melolontha* Üzerindeki İnsektisidal Etkilerinin 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 sayın Doç. Dr. İsmail DEMİR’e, çalışmam boyunca değerli fikirlerini ve yardımlarını benden esirgemeyen ve imkânları doğrultusunda her konuda yanımda bulunan sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, gerek laboratuvar, gerek nematod konusunda hiçbir bilgisini ve yardımını esirgemeyen sayın Arş. Gör. Hüseyin YILMAZ’a ve sayın Prof. Dr. Selçuk HAZİR’a ve tez jüri üyeliğini üstlenen sayın Prof. Dr. Mahmut EROĞLU’na teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım sayın Doç. Dr. Kazım SEZEN ve sayın Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’na, laboratuvar arkadaşlarıma, tez süresi boyunca laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığı’na, bana her zaman destek olan ve tez çalışmalarım ve tez yazımında desteğini hep yanımda bulduğum sayın Miraç BAYRAMOĞLU’na ve bana her zaman inanan ve varlıkları ile her zaman güç veren, benden hiçbir imkanlarını esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Zeynep ERBAŞ

Trabzon 2012

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Trabzon Yöresinden Entomopatojen Nematodların İzolasyonu, Karakterizasyonu ve *Melolontha melolontha* Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. İsmail DEMİR’in 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. 24/07/2012

Zeynep ERBAŞ

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 (EPN).....	3
1.2.1. Entomopatojen Nematodların Morfolojisi ve Sistematığı.....	5
1.2.1.1. Heterorhabditidae	6
1.2.1.2. Steinernematidae	8
1.2.2. Entomopatojen Nematodların Biyolojisi ve Hayat Döngüsü	11
1.2.3. Entomopatojen Nematodların Coğrafik Yayılışı.....	15
1.2.4. Entomopatojen Nematodların Ekolojisi	15
1.2.4.1. Entomopatojen Nematodları Etkileyen Faktörler.....	16
1.2.4.1.1. Abiyotik Faktörler	16
1.2.4.1.2. Biyotik Faktörler	18
1.3. Entomopatojen Nematodlarla Simbiyotik Olarak Yaşayan Bakteriler.....	19
1.3.1. Entomopatojen Nematodlarla, Simbiyotik Bakterilerilerin İlişkisi.....	19
1.3.2. Entomopatojen Nematod-Bakteri Kompleksinin Hayat Döngüsü	22
1.4. Adi Mayıs Böceği, <i>Melolontha melolontha</i> (Coleoptera: Scarabaeidae).....	26
1.4.1. Adi Mayıs Böceği'nin Biyolojisi.....	26
1.4.2. Adi Mayıs Böceği'nin Mücadelesi	28
1.5. Tezin Amacı	29
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	30

2.1.	<i>Galleria mellonella</i> L. (Lepidoptera, Pyralidae)'nin Laboratuvar Ortamında Beslenmesi	30
2.2.	Toprak Örneklerinin Alınması	31
2.3.	Topraktan Entomopatojen Nematodların İzolasyonu.....	32
2.4.	Entomopatojen Nematodların White Tuzaktan Toplanması ve Yıkılması	33
2.5.	Entomopatojen Nematodların Depolanması.....	34
2.6.	Entomopatojen Nematodların Tür Teşhislerinin Yapılması.....	34
2.6.1.	Morfometrik Özelliklerin Belirlenmesi	34
2.6.2.	Moleküler Özelliklerin Belirlenmesi	35
2.6.2.1.	DNA İzolasyonu	35
2.6.2.2.	PCR ile rRNA ITS Bölgesinin Çoğaltılması	36
2.6.2.3.	PCR Ürünlerinin Klonlanması ve DNA Analizi	37
2.6.2.4.	DNA Dizi Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Filogenetik Analiz	37
2.7.	Entomopatojen Nematodlarla Simbiyotik Olarak İlişkili Bakterilerin Tanımlanması.....	37
2.7.1.	Simbiyotik Bakterilerin İzolasyonu.....	37
2.7.2.	Simbiyotik Bakterilerin Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi	38
2.7.2.1.	Simbiyotik Bakterilerden DNA İzolasyonu	38
2.7.2.2.	Simbiyotik Bakterilerin 16S rRNA Gen Bölgelerinin Çoğaltılması	38
2.8.	Entomopatojen Nematodların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi.....	39
2.8.1.	<i>Melolontha melolontha</i> (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae) Larvalarının Toplanması.....	39
2.8.2.	Entomopatojen Nematodların <i>Melolontha melolontha</i> (Coleoptera: Scarabaeidae) Üzerindeki İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi	40
2.8.3.	Entomopatojen Nematodların (ZET09, ZET31 ve ZET35) Saksı Denemelerinde <i>Melolontha melolontha</i> (Coleoptera: Scarabaeidae) Üzerindeki İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi.....	41
3.	BULGULAR	42
3.1.	Toprak Örneklerinin Toplanması ve Entomopatojen Nematodların İzolasyonu.....	42
3.2.	İzolatların Tür Teşhisleri	43
3.2.1.	Morfometrik Tanımlama	43
3.2.2.	Moleküler Tanımlama	47
3.2.2.1.	Entomopatojen Nematodların ITS Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması.....	47
3.2.2.2.	Entomopatojen Nematodların DNA Dizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	48
3.3.	Filogenetik Analiz	48

3.4.	Entomopatojen Nematodlarla Simbiyotik Olarak İlişkili Bakterilerin Özellikleri.....	50
3.4.1.	Simbiyotik Bakterilerin Moleküler Özellikleri.....	50
3.5.	Entomopatojen Nematodların İnsektisidal Etkileri	52
3.5.1.	Kum Denemeleri.....	52
3.5.2.	Saksı Denemeleri.....	56
4.	TARTIŞMA.....	59
5.	SONUÇLAR.....	68
6.	ÖNERİLER	70
7.	KAYNAKLAR.....	71
8.	EKLER	88

ÖZGEÇMİŞ

Yüksek Lisans

ÖZET

TRABZON YÖRESİNDEN ENTOMOPATOJEN NEMATODLARIN İZOLASYONU,
KARAKTERİZASYONU VE *MELOLONTHA MELOLONTHA* (COLEOPTERA:
SCARABAEİDAE) ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Zeynep ERBAŞ

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilimdalı
Danışman: Doç. Dr. İsmail DEMİR
2012, 87 Sayfa, 10 Sayfa Ek

Bu çalışmada, Trabzon ili ve ilçelerindeki tarım arazilerinden entomopatojen nematod izolasyonu, karakterizasyonu ve *Melolontha melolontha* üzerinde insektisidal etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla alınan 77 toprak örneğinden 7 tane entomopatojen nematod izolasyonu gerçekleştirildi (%9,09). Yapılan morfolojik ve morfometrik çalışmalara göre, izolatların tamamının *Heterorhabditis* ve *Steinernema* cinsine ait olduğu tespit edildi. İzolatların moleküler tanımlanmaları, 18S-28S nükleer rDNA'daki ITS bölgelerinin dizin analizleri yapılarak gerçekleştirildi. Çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre izolatların beş tanesinin *Heterorhabditis bacteriophora* (ZET02, ZET04, ZET09, ZET28, ZET35) ve iki tanesinin de *Steinernema feltiae* (ZET31, ZET76) olduğu belirlendi. Çalışmaya göre *H. bacteriophora* ve *S. feltiae* bölgedeki en yaygın türler oldukları tespit edildi. İzolatların *M. melolontha* üzerindeki insektisidal aktiviteleri farklı sıcaklık (15 °C ve 25 °C) ve konsantrasyonlarda (500, 1000 ve 2000 İJ/ml) test edildi. Test sonuçlarına göre izolatların 25 °C'deki aktivitelerinin 15 °C'dekine göre daha yüksek olduğu belirlendi. En yüksek konsantrasyonundaki kum denemeleri sonucunda, on günlük test süresinde 5. günde ZET09 ve ZET35 izolatlarının 25 °C'de *M. melolontha* üzerinde %100'lük etki gösterdikleri kaydedildi. Bu izolatların ZET09 ve ZET35 numaralı izolatların ise saksı denemelerinde kullanılan tüm larvaları öldürdüğü ve *M. melolontha* ile mücadelede iyi bir potansiyele sahip olduğu tespit edildi.

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

Master Thesis

SUMMARY

ISOLATION OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES FROM VICINITY OF
TRABZON, THEIR CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF THE
ACTIVITY ON THE *MELOLONTHA MELOLONTHA*(COLEOPTERA:
SCARABAEİDAE)

Zeynep ERBAŞ

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Doç. Dr. İsmail DEMİR
2012, 87 Pages, 10 Pages Appendix

In this study, we aimed to survey entomopathogenic nematode from various agricultural regions in the province of Trabzon and its districts, seventy seven soil samples were collected from 15 distinct geographic areas. Out of 77 soil samples collected from the region, seven were positive for EPNs (9,09%). According to the morphological and morphometric studies, it was determined that all of the samples were in *Steinernema* and *Heterorhabditis* genus. Their molecular characterization was performed by sequence analysing of ITS regions in 18S-28S nuclear rDNA. The samples were identified as *Heterorhabditis bacteriophora* (ZET02, ZET04, ZET09, ZET28 and ZET35) and *Steinernema feltiae* (ZET31 and ZET76). Among these isolates, *S. feltiae* and *H. bacteriophora* are the most frequently distributed species in the region. The mortality rate at 25 °C was greater than 15 °C at the all tests, approximately. The efficacy of all isolates was tested on *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabidea) larvae at different concentrations (500, 1000 and 2000 infective juveniles IJs/ml). The highest mortality rate was obtained as 100% from ZET09 and ZET35 at 25±1 °C. As a result of pot experiment, it was shown that isolates ZET09 and ZET35 have a good potential for controlling the damage of *M. melolontha*.

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

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Entomopatojen nematodların morfolojik yapıları	5
Şekil 2. Entomopatojen nematodların hayat döngüsü	12
Şekil 3. Entomopatojen nematod tarafından enfekte olmuş <i>Galleria mellonella</i> larvası	14
Şekil 4. Simbiyotik bakterilerin nematod vücudundaki lokalizasyonu	22
Şekil 5. Entomopatojen nematod-simbiyotik bakteri hayat döngüsünün şematik gösterimi	23
Şekil 6. <i>Xenorhabdus nematophilla</i> türü bakterilerde Faz I ve Faz II evrelerinin elektron mikroskop görüntüleri	25
Şekil 7. Adi Mayıs böceği (<i>Melolontha melolontha</i> (L.))	28
Şekil 8. Son evre <i>Galleria mellonella</i> larvaları	31
Şekil 9. Trabzon ili ve ilçelerinden nematod izolasyonu için alınan toprak örneklerinin yerleri.....	32
Şekil 10. Enfekte böceklerden White Tuzak yöntemiyle entomopatojen nematodların izolasyonu	33
Şekil 11. 18S-28S nükleer ribozomal DNA (rDNA)'nın Internal Transcribed Sequenced (ITS) bölgesi.....	36
Şekil 12. Nematod ile enfekte olan larvalardan simbiyotik bakteri izolasyonu	38
Şekil 13. İzolatların <i>Melolontha melolontha</i> üzerindeki kum denemeleri.....	40
Şekil 14. İzolatların saksı denemeleri.....	41
Şekil 15. Nematod izolasyonu yapılan örnekleme noktaları	42
Şekil 16. <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (ZET35) İJ ve erkek bireylerine ait morfolojik görüntüler	44
Şekil 17. <i>Steinernema feltiae</i> (ZET31) İJ'lerine ait morfolojik görüntüler	44
Şekil 18. Entomopatojen nematodların rRNA ITS böğelerinin PCR ile çoğaltılmaları.....	47
Şekil 19. Türü tespit edilen <i>Heterorhabditis</i> cinsine ait entomopatojen nematodların ITS dizilerine göre filogenetik ilişkileri	49

Şekil 20.	Türü tespit edilen <i>Steinernema</i> cinsine ait entomopatojen nematodların ITS dizilerine göre filogenetik ilişkileri	50
Şekil 21.	Entomopatojen nematodlarla simbiyotik yaşayan bakterilerin 16S rRNA gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılması.....	51
Şekil 22.	İzolatların larva başına 500 İJ/ml oranında infektif juvenillerinin 15 °C’de <i>M. melolontha</i> (Coleoptera: Scarabeidae) üzerindeki etkileri	53
Şekil 23.	İzolatların larva başına 1000 İJ/ml oranında infektif juvenillerinin 15 °C’de <i>M. melolontha</i> (Coleoptera: Scarabeidae) üzerindeki etkileri	53
Şekil 24.	İzolatların larva başına 2000 İJ/ml oranında infektif juvenillerinin 15 °C’de <i>M. melolontha</i> (Coleoptera: Scarabeidae) üzerindeki etkileri.....	54
Şekil 25.	İzolatların larva başına 500 İJ/ml oranında infektif juvenillerinin 25 °C’de <i>M. melolontha</i> (Coleoptera: Scarabeidae) üzerindeki etkileri	54
Şekil 26.	İzolatların larva başına 1000 İJ/ml oranında infektif juvenillerinin 25 °C’de <i>M. melolontha</i> (Coleoptera: Scarabeidae) üzerindeki etkileri.....	55
Şekil 27.	İzolatların larva başına 2000 İJ/ml oranında infektif juvenillerinin 25 °C’de <i>M. melolontha</i> (Coleoptera: Scarabeidae) üzerindeki etkileri.....	55
Şekil 28.	Kum denemleri sonucu enfekte olan <i>M. melolontha</i> larvaları.....	56
Şekil 29.	Üç izolatın (1000 İJ/ml) saksı denemelerinde <i>M. melolontha</i> larvaları üzerindeki etkiler	57
Şekil 30.	Saksı denemeleri sonucu nematod uygulanan grubun ve kontrol grubunun karşılaştırılması.....	58
Şekil 31.	Saksı denemelerinde nematod uygulanan grubun ve kontrol grubunun köklerinin karşılaştırılması	58
Şekil 32.	<i>H. bacteriophora</i> (ZET35) izolatının enfekte ettiği <i>M. melolontha</i> larvaları..	59

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. <i>Heterorhabditis</i> cinsi içinde yer alan türler.....	7
Tablo 2. <i>Steinernema</i> cinsi içinde yer alan türler	9
Tablo 3. Simbiyotik bakterilerin taksonomik durumu ve ilişkili oldukları EPN türleri.....	21
Tablo 4. EPN ve simbiyotik bakteri ilişkisindeki hayat döngüsü	26
Tablo 5. Entomopatojen nematodların izole edildiği örnekleme noktalarının koordinatları ve özellikleri.....	43
Tablo 6. İzolatların infektif juvenil bireylerinin morfometrik ölçümleri	45
Tablo 7. İzole edilen entomopatojen nematodlardan erkek bireylerin morfometrik ölçümleri.....	46
Tablo 8. İzolatların rRNA ITS bölgesi dizi analizine göre tür tayinleri.....	48
Tablo 9. İzole edilen entomopatojen nematodlarla simbiyotik yaşayan bakterilerin rRNA gen dizilerinin benzerlik oranları	52

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

EPN	: Entomopatojen nematod
İJs	: İnfektif jüvenil nematodlar
µm	: Mikrometre
ml	: Mililitre
J1	: 1. evre infektif jüvenil
J2	: 2. evre infektif jüvenil
J3	: 3. evre infektif jüvenil
J4	: 4. evre infektif jüvenil
UV	: Ultraviyole
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
MEGA	: Molecular Evolutionary Genetics Analysis

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 (İmmaraju vd., 1992; Nagarkatti vd., 2002; Onstad vd., 2002). Böceklerde direnç oluşması, bu böceklere karşı daha fazla kimyasal kullanımına sebep olmuştur. Bu kimyasal maddelerin yapılarının bozulmaması, etkilerinin doğada uzun yıllar kalması ve bunun sonucunda canlılarda kalıcı yıkımlara neden olması, zamanla bunların kullanımlarının azaltılması sonucunu doğurmuştur. Ayrıca, bu maddeler zararlı böcekleri öldürmekle birlikte hedef dışı birçok yararlı böcek ve predatör böcek gruplarını da etkilemektedir (Delbeke vd., 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 organizmaları baskı altına alabilmek ve popülasyonlarını kontrol edebilmek ya da çok düşük seviyelerde tutabilmek amacıyla zararlılara karşı yararlıların kullanılmasıdır. Bu yararlı gruplar arasında kendine üst sıralarda yer bulan entomopatojen nematodların son yıllarda önemli canlılar olduğu ve biyolojik mücadele programları kapsamında mutlaka kullanılması gerektiği anlaşılmıştır (Gaugler, 2002; Grewal vd., 2005).

Kınkanatlı takımından Scarabaeidae türlerinin birçoğu, tarım ve orman zararlısı olup, vücut şekilleri ve yaşam biçimleri de oldukça farklıdır. Larvalar bitki köklerini kemirerek, delip geçerek beslenmektedir. Kendilerine özgü bir şekilde yığın oluşturarak büyük zararlara neden olurlar. Erginler ise meyve ve orman ağaçlarının yapraklarıyla beslenir. Bu grupta yer alan zararlıların başında Adi Mayıs böceği (*Melolontha melolontha* (L.)), Coleoptera: Scarabaeidae) gelir. Değişik ülkelerde 60 kadar bitkide zarar yaptığı bilinen bu böcek ülkemizde de çok yaygındır. Larvalar fidan, tahıl, ot ve diğer tarım ürünlerinin köklerini kemirerek, sararmalarına ve kurumalarına yol açar. Ülkemizde elma, armut, ayva, şeftali, erik ve kiraz ağaçlarıyla fındık ve çayda da zarar yapan bu böceğin larvaları köklerle ergini

ise Nisan ve Mayıs aylarında bitkilerin yaprakları ile beslenir. Zararlıının biyolojisi dikkate alındığında entomopatojen nematodların zararlı ile mücadelede etkili olabileceği düşünülmektedir.

Tabiatta böceklerin hastalanmasına ve ölümlerine neden olan pek çok virüs, bakteri, protozoan, fungus ve nematod türü mevcuttur. Bu mikroorganizmalar böceklerde hastalık oluşturdıkları 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).

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 zararlılarla mücadelede entomopatojen nematod türlerinin 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 kullanılabilecekleri gerçeğini ortaya çıkarmıştır (Kaya, 1985; Klein, 1990; Wouts, 1991; Georgis ve Manweiler, 1994; Shapiro-Ilan vd., 2002).

Türkiye, Avrupa ile Asya arasında yer almış olması nedeniyle her iki kıtanın yapısından etkilenecek kendine özgü bir ekolojik yapı kazanmıştır. Bulunduğu konum nedeniyle uzun yıllar boyunca pek çok bitki ve hayvan türü için geçiş bölgesi olmuştur. Ülkemizin 784560 km² yüz ölçümü olmasına rağmen, sıcak Akdeniz ikliminden soğuk karasal iklime, yüksek dağlık bölgelerden geniş ovalara kadar birçok farklı özellikte bölgeye sahiptir. Buna karşı Türkiye'de entomopatojen nematodların dağılımı ile ilgili çok az çalışma yapılmıştır. Oysa Türkiye'de bulunacak yeni nematod izolatlarının biyolojik çeşitliliğe ve biyolojik mücadele uygulamalarına katkısı büyük olacaktır.

1.2. Entomopatojen Nematodlar (EPN)

Steiner, 1923 yılında Almanya’da testere sineğini *Neodiprion* sp. (Hymenoptera: Diprionidae)’yi enfekte eden ilk entomopatojen nematod türü *Steinernema kraussei* (*Aplectana kraussei*)’yi tanımlamıştır. Glaser ise 1931 yılında Amerika’da *Popillia 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 (Glaser, 1932; Glaser ve Farrel, 1935).

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).

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 vd., 1983; Kaya, 1985; Bedding, 1990).

Günümüzdeki çalışmalar, zararlı böceklerin biyolojik mücadelelerinde kullanılma potansiyeli taşımaları bakımından 8 familya üzerinde yoğunlaşmıştır. Bunlar; Mermithidae, Tetradonematidae, 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).

Yapılan son taksonomik çalışmalara göre Steinernematidae familyasında *Steinernema* cinsine ait 63 tür, aynı familyanın diğer bir cinsi olan *Neosteinerinema*’ya ait sadece *N. longicurvicauda* türü tanımlanmıştır (Adams vd., 2006) .

Heterorhabditidae familyasında da *Heterorhabditis* (18 tür) ve *Heterorhabditoides* (1 tür) olmak üzere iki cins içerisinde toplam 19 tür tanımlanmıştır (Mráček vd., 2006;

Uribe-Lorio vd., 2007; Zhang vd., 2008; Lee vd., 2009; Stock vd., 2009). Bununla birlikte, *H. brevicaudis* ve *H. poinari* türleri moleküler ve çapraz hibritleme verilerinin yetersiz oluşu ile morfolojik teşhislerinin tamamlanamamasından dolayı tanımlanamayan türler olarak kalmışlardır (Adams vd., 2006).

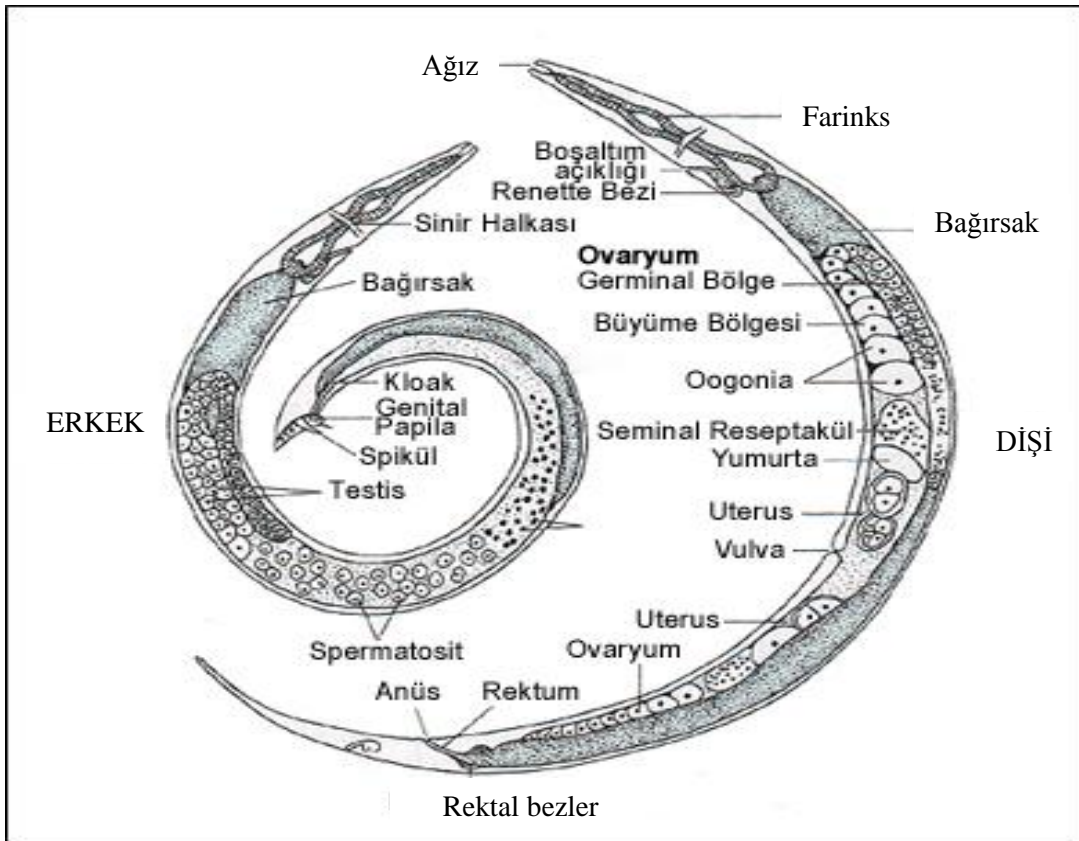
Ancak, dünyanın pek çok ülkesinde yeni nematod tür ve izolatlarını bulmaya yönelik çalışmalar hızla devam etmektedir. Son 30 yılda entomopatojen nematodlar üzerinde yapılan çalışmalar daha çok sistematik konular üzerinde yoğunlaşmıştır. Son 10 - 15 yıllık bir sürede ise bu nematodların kitlesel üretimleri ve ticari formülasyonları yapılarak alan uygulamalarına başlanmıştır (Adams vd., 2006). Bugün, 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, turuncgiller yetiştirme alanlarında kullanılabileceği yapılan araştırmalarla gösterilmiştir.

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 belirlenmiştir (Duchaud vd., 2003).

EPN'ler, çevresel yönden güvenilir olmaları, laboratuarda çok miktarda üretilibilmeleri ve püskürtme yöntemiyle veya sulama sistemiyle kolayca uygulanabilir olmaları sayesinde mükemmel bir mücadele etmeni özelliğindedirler (Liu vd., 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 vd., 2002).

1.2.1. Entomopatojen Nematodların Morfolojisi ve Sistematığı

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 iki familya mevcuttur. Bunlar Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarıdır. Bu familyaların tüm üyelerinin böcekleri öldürücü etkisi vardır ve bunlar 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 üyelerinde spiküle yardımcı olarak 'bursa' adı verilen yapılar bulunur (Şekil 1).



Şekil 1. Entomopatojen nematodların morfolojik yapıları (URL-1, 2012).

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

Phylum: Nematoda

Class: Chromadorea

Ordo: Rhabditida

Sub-ordo: Rhabditina

Infra-ordo: Rhabditomorpha

Super-familya: Strongyloidea

Familya: Heterorhabditidae

Genus: *Heterorhabditis*

Genus: *Heterorhabditoides*

Sub-ordo: Tylenchina

Infra-ordo: Panagrolaimomorpha

Super-familya: Strongyloidoidea

Familya: Steinernematidae

Genus: *Steinernema*

Genus: *Neosteinernema*

1.2.1.1. 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 1). *Heterorhabditoides* cinsi ise 2008 yılında tanımlanmıştır ve *H. chongmingensis* olarak isimlendirilen tek türle temsil edilir (Zhang vd., 2008).

Tablo 1. *Heterorhabditis* cinsi içinde yer alan türler

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

* Orjiinal tanımlamayı gösteren çalışmadaki eksiklikler nedeniyle sistematik pozisyonu tartışmalıdır.

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. Ovotestis 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).

Erkeklerde, hafifçe vücudun ventraline kıvrılmış olan spikül, çift ve ayırır. 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).

1.2.1.2. Steinernematidae

Bu familyanın sistematikteki 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 2'de verilmiştir. *Neosteinerema* cinsi *N. longicurvicauda* isimli tek türle temsil edilir.

Tablo 2. *Steinernema* cinsi içinde yer alan türler

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

Tablo 2'in devamı

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

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 papilla veya labial papillaların hemen yanına yerleşmiş papilla benzeri yapılarla çevrelenmiştir. Dört tane sefalik papillaya sahiptir. Amphidler küçüktür.

Stoma ie 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 ayırıcıdır. 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 (Poinar, 1975; Adams ve Nguyen, 2002).

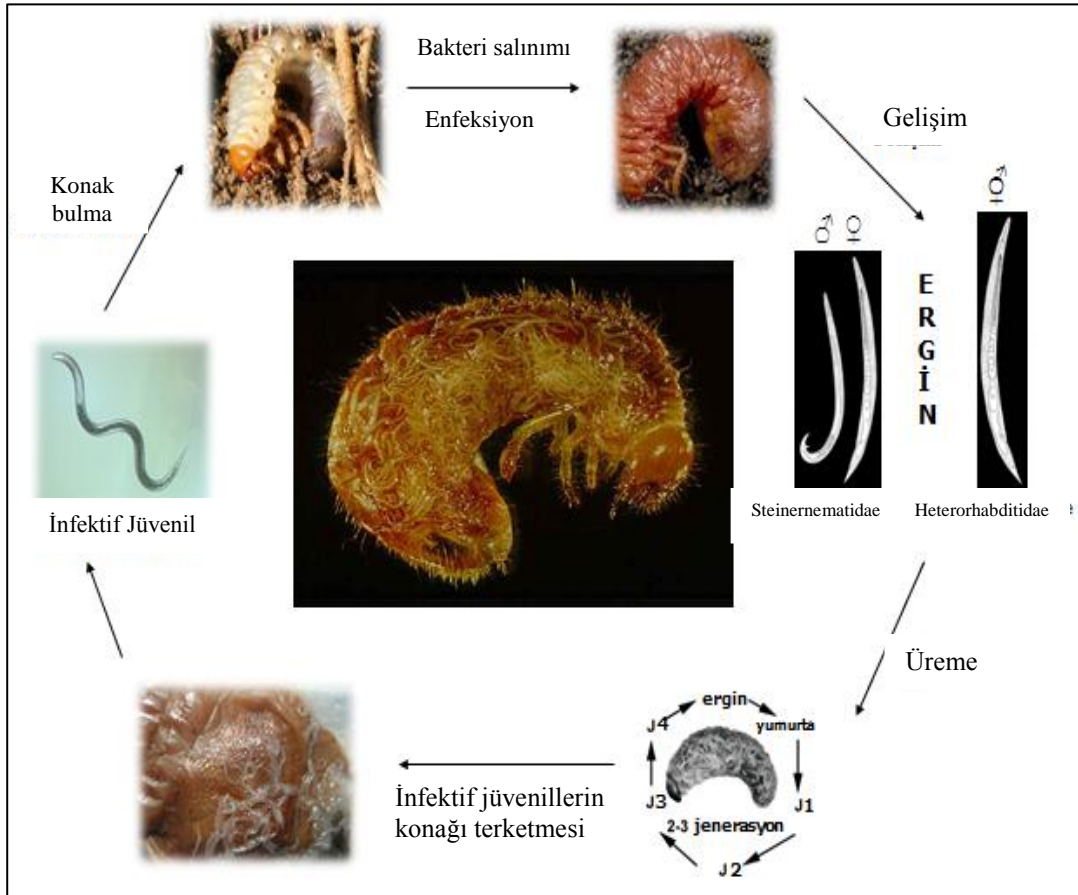
İnfektif juvenillerde (üçüncü evre infektif juvenil = İJs) stoma ie ökükdür. Vücut incedir ve bazı durumlarda ikinci evre juvenil evreden kalma kutikula kılıfı taşıyabilir. Vücudun lateralinde özel çiftler oluşturabilen çizgiler bulunur ve salgı kesesi belirgindir. Kuyruk, konoid veya filiformdur. Fazmidler kuyruğun ortasına yerleşmiştir ve bazen kolaylıkla görülemeyebilir (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 Neelson, 1996; Boemare, 2002; Campbell vd., 2003). Bu parazitler, Enterobacteriaceae familyasına ait bakterilerle mutualistik bir ilişkiye sahiptir. Steinernematidler, *Xenorhabdus* cinsine ait bakterilerle heterorhabditidler ise *Photorhabdus* cinsi bakterilerle mutualistik ilişki içindedirler. Üçüncü evre infektif juveniller (İJ) beslenmeyen ve serbest yaşayan tek evredir (Adams ve Nguyen, 2002; Stuart vd., 2006). Bunlar gelişimleri durmuş, böcek kadavrası dışındaki ekstrem koşullara karşı uzun süre hayatta kalabilmeye yönelik morfolojik ve fizyolojik yönden adaptasyon gösteren 'dauer' juvenillerdir (Brown vd., 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 vd., 2005). Bu bakteriler

ürettikleri endo ve ekzotoksinler sayesinde konak böceği öldürür (Şekil 2). 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).



Şekil 2. Entomopatojen nematodların hayat döngüsü

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) dönüşür. 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).

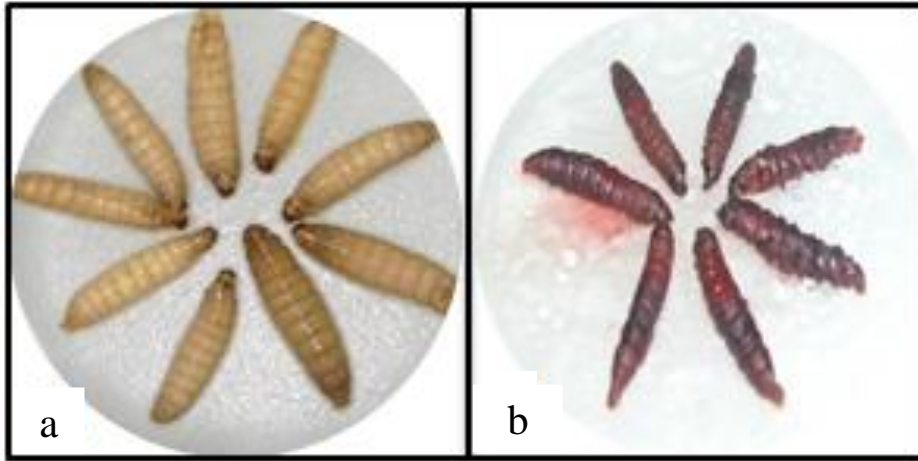
Kadavradaki kaynaklar bittiğinde J2 evresindeki juveniller beslenmeye son verip bir vezikül veya kese içine bakterilerini toplayıp infektif evreye dönüşür. Heterorhabditidler İJ evresinde hala J2 evresinde sahip oldukları kütikulayı barındırırlar. İnfektif juveniller, yeni bir konak bulmak için kadavrayı terk eder ve 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. Kahel-Raifer ve Glazer (2000) yaptıkları çalışmada bunların oranlarının besin miktarına göre değiştiğini tespit etmişlerdir. Yani eşey belirlenmesi çevresel faktörlere göre olmaktadır. Besin kalitesi ve miktarı azaldıkça hermafroditlerin oranı artmakta ve bunu ilk olarak 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 kütikulayı bir kılıf gibi taşırlar. Bu kılıf heterorhabditidleri kuraklık, don ve fungal patojenlere karşı korur (Timper ve Kaya, 1989; Campbell ve Gaugler, 1991; Wharton ve Surrey, 1994).

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 vd., 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 3). Kadavrada oluşan renk simbiyotik bakteri nedeniyledir. Heterorhabditlerle enfekte olan larvalar zamanla daha az yumuşar. Enfekte olan larvaların kutikulası ince ve içeriği gösteren bir yapıda olursa nematodlar dışarıdan bakıldığında kolaylıkla görülebilir. Entomopatojen nematodlarla enfekte olan kadvralar kokmaz ve parçalandıklarında bile kötü bir koku ortaya çıkarmaz. Enfekte olan larvaların dokuları normal yapılarını yitirir ve yumuşar ancak asla sıvı hale dönmez. Heterorhabditlerle enfekte olan kadvralarda vücut içeriği sakızimsı bir hal alır (Koppenhöfer, 2000).



Şekil 3. Entomopatojen nematod tarafından enfekte olmuş *Galleria mellonella* larvaları. a: *Steinernema* sp. b: *Heterorhabditis* sp., tarafından enfekte olmuş larvalar

1.2.3. Entomopatojen Nematodların Coğrafi Yayılışı

Entomopatojen nematodların Antraktika kıtası hariç tüm ekosistemlerde bulunduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda steinernematidlerin tür sayısının fazla olmasından dolayı heterorhabditilere kıyasla daha yaygın oldukları görölmektedir. Bu yeni türlerin Dünya üzerindeki yayılışı sadece bir ülke ile sınırlı görünmesine karşın, yeni sörvey 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 görölmektedir.

Dünya üzerinde yapılan birçok survey çalışması, entomopatojen nematodların farklı coğrafi alanlardaki elde edilme oranlarında önemli farklılıklar bulunduğunu göstermektedir. Örneğin lkemizde 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 vd., 1999; Griffin vd., 2000; Stock vd., 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 tanması gibi enfekte etme yönteminin anlaşılmasını gerektirir.

1.2.4.1 Entomopatojen Nematodları Etkileyen Faktörler

1.2.4.1.1 Abiyotik Faktörler

Entomopatojen nematodların varlığını pek çok abiyotik faktör etkilemektedir. Bu 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 yaratmaktadır (Stuart vd., 2006).

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

Nem, toprakta yaşayan nematodları etkileyen en önemli abiyotik faktördür. Karada yaşayan nematodlar hareket edebilmek için yeterli kalınlıkta ve devamlılıkta su filmine ihtiyaç duyarlar (Kung vd., 1991). 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 vd., 2006). pH değerinin 10'a ulaştığında steinernematidlerin 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 heterorhabditidlerde gözlenmemiştir (Glazer, 2002).

Entomopatojen nematodlar ve konak böcekleri poikilothermal (soğukkanlı) organizmalardır. Bu nedenle ortam sıcaklığı son derece önemlidir ve her iki organizmayı da etkilemektedir (Gouge vd., 1999). Sıcaklık, entomopatojen nematodların enfektivite, üreme, gelişme (Grewal vd., 1993; Jagdale ve Gordon, 1998; Jagdale vd., 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 vd., 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 5-15 °C arasında olduğu kaydedilmiş 37 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise genellikle ölüm gözlenmiştir (Koppenhöfer ve Kaya, 1999; Hazır, 2002; Stuart vd., 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 vd., 2006).

Üçüncü evre 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 yaşadıkları doğal toprak ortamının farklı olmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Wright, 2004). Yüksek konsantrasyonlardaki NaCl, KCl ve CaCl₂'ün *S. glaseri* türünün toprakta hareket yeteneğini, konağına yerleşip enfekte etmesini engellediği görülmüştür (Thurston

vd., 1994). CaCl_2 ve KCl 'ün *H. bacteriophora*'nın hayatta kalışı, enfeksiyonu ve topraktaki 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 vd., 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 vd., 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 vd., 2006; Kaya, 2002).

Entomopatojen nematodların varlığını ve devamlılığını etkileyen primer biyotik faktör, uygun konakların bulunmasıdır (Mráček vd., 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 predasyon (av-avcı ilişkisi) göstermesi, doğada bu organizmaların entomopatojen nematodlar üzerinde önemli bir etkiye sahip olduklarını kanıtlamaktadır (Stuart vd., 2006).

Böcek kadavrasıyla EPN'ler, çeşitli leş yiyicilerin predasyonuna (av-avcı ilişkisi) uğramaktadır (Stuart vd., 2006). Bununla birlikte, bazen konak kadavrasının kimi karınca türleri üzerinde uzaklaştırıcı bir etki oluşturup, entomopatojen nematod gelişimine koruyucu

bir olanak sağladığı bulunmuştur (Zhou vd., 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 vd., 2006). Bununla birlikte, entomopatojen nematod ve *B. thuringiensis*'in sinerjistik bir etki göstererek Scarabaeidae familyasına ait larvaların mortalitesini arttırdığı bilinmektedir (Koppenhöfer vd.,1999).

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 vd., 2006). Bu birliktelikten her iki organizma da birbirine ihtiyaç duymaktadır. Nematodun bakteriyeye 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 vd., 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 vd., 2006). Nematod ve simbiyotik bakterisi arasındaki monoksenik ilişki nematodun konak içinde üremesi esnasında bakterisinin ürettiği 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 3'te verilmiştir.

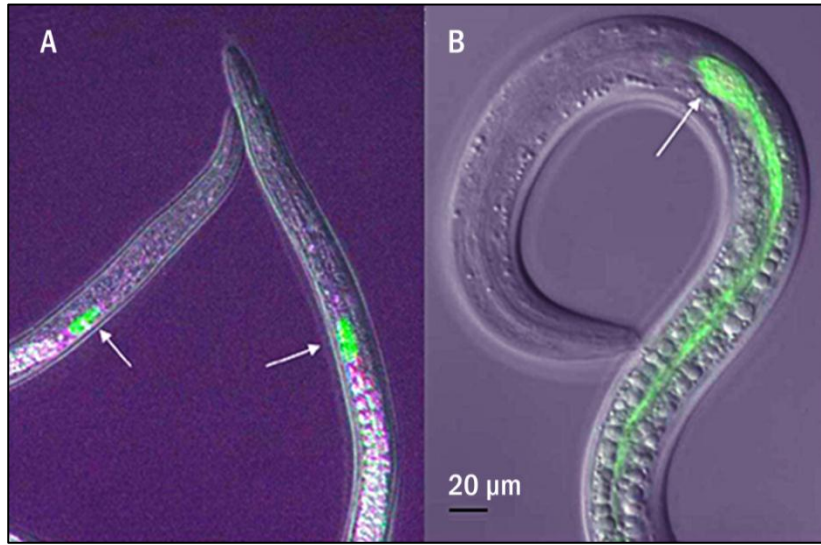
Tablo 3. Simbiyotik bakterilerin taksonomik durumu ve ilişkili oldukları EPN türleri

Simbiyotik Bakteri Türü	İlişki Olduğu EPN Türleri*
<i>Xenorhabdus 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. griffinia</i>	<i>S. hermaphroditum</i>
<i>X. hominickii</i>	<i>S. kari, 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>Photorhabdus. 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>Kayai</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>

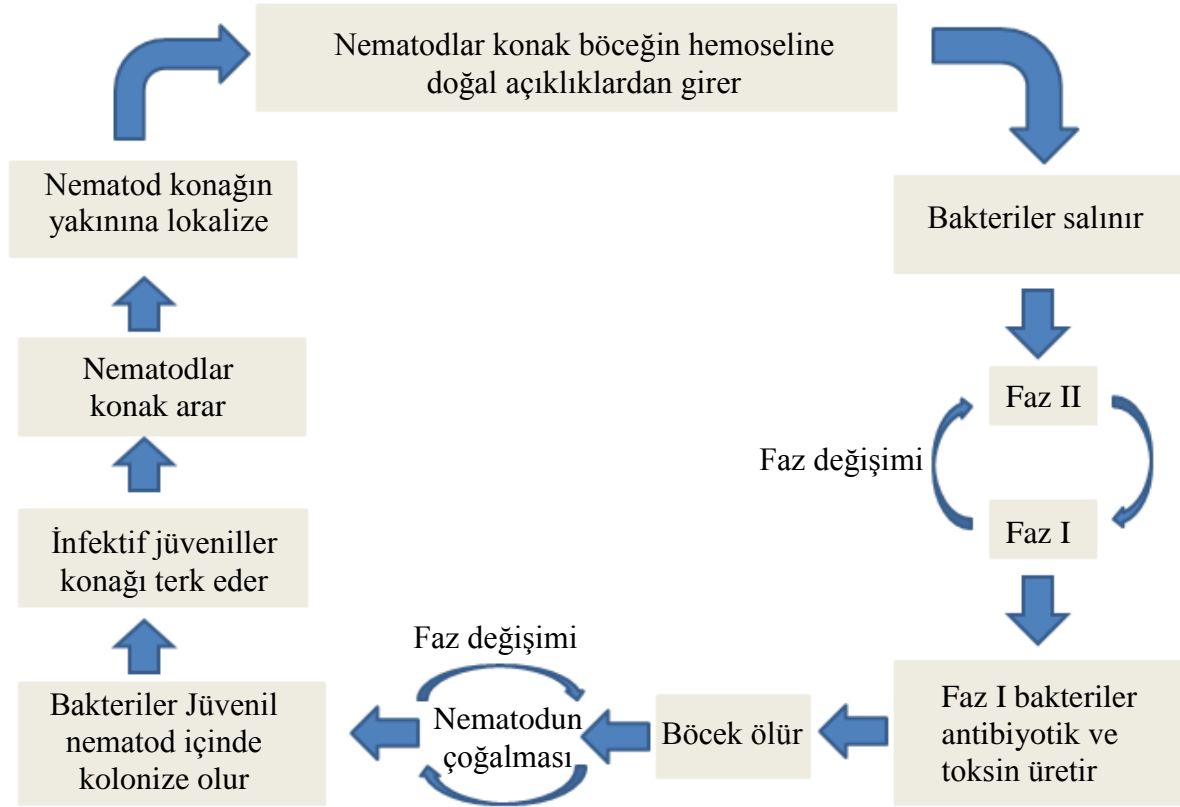
* Referanslar: Akhurst, 1983; Boemare ve Akhurst, 1988; Boemare vd., 1993; Brunel vd., 1997; Fischer-Le Saux vd., 1998, 1999; Hazır vd., 2004; Sicard vd., 2004; Lengyel vd., 2005; Adams vd., 2006; Somvanshi vd., 2006.

1.3.2. Entomopatojen Nematod-Bakteri Kompleksinin Hayat Döngüsü

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 4) (Forst vd., 1997). İnfektif juvenil nematodlar 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 5) (Burnell ve Stock, 2000). *Steinernema* cinsi nematodlar *Xenorhabdus* cinsi bakterilerle (Thomas ve Poinar, 1979), *Heterorhabditis* cinsi nematodlar *Photorhabdus* cinsi bakterilerle (Boemore vd., 1993) simbiyotik olarak ilişkilidir.



Şekil 4. 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 vd., 2006).



Şekil 5. Entomopatojen nematod-simbiyotik bakteri hayat döngüsünün şematik gösterimi (Owuama, 2001).

Foretik ilişki, bir organizmanın yeni bir besin ortamına ve habitata ulaştığında konukçusunu terk etmesi olayına denir. İnfektif juveniller toprakta serbest halde yaşarken, simbiyotik olarak ilişkili oldukları bakterilerle foretik ilişki içerisinde. Bu foretik ilişki sırasında nematod bağırsağındaki bakteriler, dış çevreden korunurlar ve nematod bakteriyi başka bir konağa taşımak için bir vektör gibi görev yapar (Ciche vd., 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).

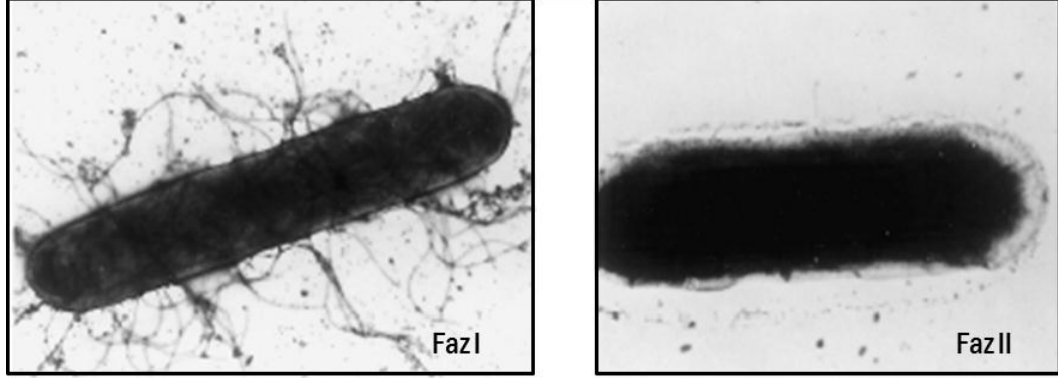
Böceklerin immün sistemi humoral ve hücrel faktörlerin integrasyonu ile oluşur. Sistem nematodları elimine etmek için ise kapsül içerisine alma davranışı gösterir. Bunu melanizasyon izler. Ancak, nematodlar da bu savunma sistemine karşı kendilerini

koruyacak özellikler geliştirmişlerdir. Buna enkapsülasyon adı verilmektedir. Bu durum tam bilinmemekle birlikte, nematod kutikülünün yapı ve kimyasıyla ilgili olabileceği düşünülmektedir (Koppenhöfer, 2000). *S. glaseri*, *Popillia japonica* larvasında tanınıp kapsül içerisine alınmasına rağmen, bu kapsülün içinden kaçıp kurtulabilmektedir (Wang vd., 1995). Bir başka çalışmada ise *Heterorhabditis* infektif juvenillerinin penetrasyon esnasında J2 kutikülünü 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 homoseline 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 vd., 2006). Nematod ve bakteri beraberce konağın immün sistemini etkisiz hale getirir. 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 hücrelerinin, *Galleria mellonella* ve *Mveuca sexta* gibi duyarlı böcek türlerinin homoseline enjekte edilmesi, bu böceklerin hızlı bir şekilde ölmesi için yeterlidir (Poinar ve Thomas, 1967; Forst vd., 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 enfekte konağı saprofitik mikroorganizmalar, bakteriyovor nematodlar ve ayrıştırıcı böcekler gibi organizmaların istilasından korumak için antibiyotik ve antifungal bileşikler üretirler (Boemare vd., 1996).

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 6) (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 yapıları kristal proteinler üretirler. Fazlar arasındaki patojenite farklılığı farklı konaklar üzerinde test edilmiştir (Volgyi vd., 1998). Bazı çalışmalar bunun her zaman geçerli olmadığını belirtse de (Ehlers vd., 1990; Volgyi vd., 1998) genel görüş faz-I bakterilerinin *in vitro* nematod üretiminde faz-II'lere göre daha etkili oldukları yönündedir (Akhurst ve Boemare, 1990; Boemare vd., 1996; Forst vd., 1997). Faz-II formu bakterilerin bu

simbiyotik ilişkiadaki rolü açık değildir. Faz değişiminin moleküler mekanizmaları yönetildiği düşünülmektedir (Tablo 4) (Burnell ve Stock, 2000).



Şekil 6. *Xenorhabdus nematophilla* türü bakterilerde Faz I ve Faz II evrelerinin elektron mikroskop görüntüleri

Xenorhabdus ve *Photorhabdus* bakterileri şimdiye kadar topraktan hiç izole edilememiştir. Nematod olmaksızın toprak ortamında hayatta kalamayacakları düşünülmektedir. Morgan vd. (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.

Xenorhabdus ve *Photorhabdus* 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.

Tablo 4. EPN ve simbiyotik bakteri ilişkisindeki hayat döngüsü

Evre	Nematod	Bakteri
I	Toprakta yaşayan infektif juvenil nematodlar konak böceğin açıklıklarından içeri girer.	Bakteriler EPN'nin bağırsağında bulunur.
II (Erken)	EPN'ler böceğin hemoselinde gelişmeye başlar. Dişi ve erkek EPN'ler oluşur.	EPN'lerde bulunan bakteriler böceğin hemolenfine salınır. Bakteri tarafından virülans faktörleri üretilir. Sonuçta böcek ölür.
II (Geç)	EPN'ler çoğalır.	Bakteriler durgun faza geçer. Bakteri tarafından antibiyotik, ekzoenzim ve kristal proteinleri üretilir.
III	Yeni infektif juveniller gelişir.	Bakterileri infektif juvenillerin bağırsağında kolonize olur.

1.4. Adi Mayıs Böceği, *Melolontha melolontha* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae)

Adi Mayıs böceği (*Melolontha melolontha*), tüm dünyada en önemli toprak altı zararlılarından birisidir. Şişman, beyaz ve kavisli bir yapıya sahip yaklaşık 46 mm uzunluğunda larvalar toprakta yaşar ve köklerde ciddi zararlara sebep olurlar. Erginler ise yaprak ve çiçekler ile beslenerek ağaçlara zarar verirler. Fakat erginlerin ağaçlara verdiği zarar çok ciddi değildir. Ancak larvalar, yaşamak için toprak altında köklerle beslenerek ot, tahıl, patates ve çilek gibi diğer tarımsal ürünlere karşı ciddi zarar teşkil etmektedir. Larva meyve bahçelerinde, park alanlarında ve fidanlıklarda da zararlı olmaktadır. Ergin böcek haline geçmeden önce 3-4 yıl boyunca yeraltında beslenir. Larva ile mücadele toprak altında yaşadığından dolayı oldukça zordur.

1.4.1. Adi Mayıs Böceğinin Biyolojisi

Adi Mayıs böceği (*M. melolontha*) Scarabaeidae familyasına ait bir türdür. Ergin böcekler 25-30 mm uzunluğunda, siyah başlı, sırt bölgesi kahverengi kısa tüylerle kaplı, kanat durumu kızıllımsı kahve ya da uzunlamasına çizgili kanat örtüsüne sahiptir (Şekil 7a,b). Son segmentler erkeklerde daha çok gelişmiştir. Ergin Nisan ve Mayıs aylarında görülür, gün batımında beslenmek için orman alanları ya da izole edildikleri ağaçların

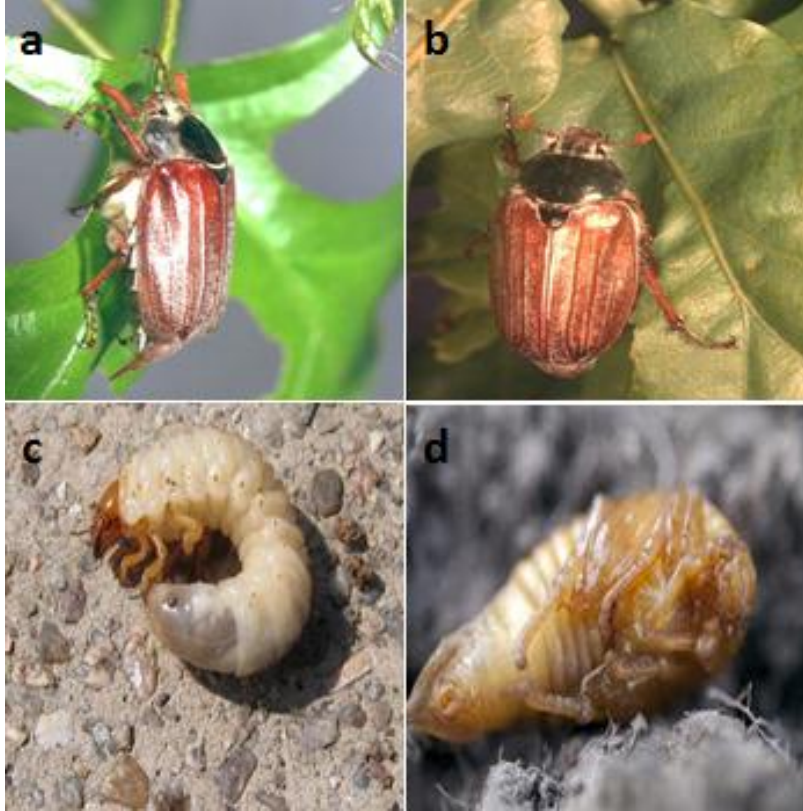
bulunduğu bölgelere uçar. Yaklaşık 10-15 gün beslendikten sonra olgunlaşan dişi, yumurta bırakmak için çayırlara doğru uçar. Her dişi 15-25 cm derinliğinde yumuşak toprağa yaklaşık 24 yumurta yığını bırakır. Çoğu dişi yumurta bıraktıktan sonra ölür fakat ikinci kez yumurta bırakmak için dişiler beslenir, bazı dişiler ise üçüncü kez yumurta bırakır. Ergin böcekler genellikle gece uçar ve sıkça yaz başında sıcak gecelerde ışık yanan pencerelere çarpar. Ergin böcek yapraklar ve çiçekler, yaprak döken ağaçlar, çalı ve diğer bitkiler ile beslenir. Fakat nadiren ciddi zarar verir. Özellikle tercih ettiği ağaç türleri bulunur.

Ağaç yapraklarıyla beslendikten sonra dişiler açık alanlara uçar. Kolayca kazabilecekleri yumuşak toprakta kolay bulunmayacak yerler kazar ve yumurtaları bırakır. Larvalar yaklaşık 4-6 hafta sonra çıkmaya başlar. Çok kuru ya da çok ıslak topraklarda yumurtalar gelişmemektedir (su içeriği %10-20'den az). Yumurtanın gelişmesi için uygun sıcaklık 18 °C'dir.

Larvalar, güçlü çeneye, uzun, tüylü, iyi gelişmiş sarı bacaklara, beyazımsı kavisli gövdeye ve büyük bir başa sahiptir (Şekil 7c). Larvanın gelişmesi 3-4 yıl sürer ve kışı toprak altında derin yuvalarda geçirir. Kuluçka döneminden sonra Haziran ve Temmuz sonunda genç larva küçük kökleri kemirmeye başlar. Her gün yatay olarak yaklaşık 30 cm mesafede hareket eder. Soğuk kış döneminde kendisini yere gömer ve kışı orada geçirir. Doğu Avrupa'nın belirli bölgelerinde gelişim süresi 4 yıl olabilmektedir. Canlı kalabilmek için ot, tahıl gibi diğer birçok üründe toprak altında özellikle köklerde ciddi zarar vermektedir. Üç larval evreye sahiptir (L₁, L₂ ve L₃). Birinci evre larva yumurtadan 15 °C'de 49 gün sonra, 20 °C'de 32 gün sonra ve 25 °C'de 19 gün sonra çıkar ve çoğunlukla 42 gün sonra alanda olur. Çok fazla ıslak ya da çok fazla sıcak yaz günleri yumurtalarda yüksek ölüm oranına neden olur. Larvalardaki gelişim hızı sıcaklığa bağlıdır.

İlk evre larvaların verdiği hasar sadece m² başına 1000 larva gibi aşırı yoğunlukta olduğu zaman fark edilir. İkinci evre larva 4-6 hafta boyunca bir sonraki beslenme dönemi olan Ağustos-Eylül sonunda görünür. Bundan sonra toprak altında kışı geçirir. Devamındaki baharda Nisan ayında toprak sıcaklığı (30 cm derinlikte) 7 °C'yi aştığı zaman ikinci evre larvalar Mayıs ve Haziran ayının sonuna kadar köklerle beslenir ve gelişir. Larva ağırlığı 0,15- 0,8 g artar. İkinci yıl boyunca larva son derece oburdur. Sonbaharda üçüncü evre larva görünmeye başlar, ağırlığı 3,8 g artar ve beslenmeden dolayı zarar daha fazla olur. Bundan sonra ikinci kışı geçirmek için toprakta derinlere iner. Takip eden baharda larva beslenmesi Haziran sonunda pupa evresine girene kadar tekrar başlar.

Pupa evresi 15-100 cm derinlikte küçük bir hücrede Haziran ayında gerçekleşir (Şekil 7d). Toprak ve iklim tipine bağlı olarak çoğunlukla 30-40 cm derinlikte pupa süresi 25 °C’de 25 gün, 12 °C’de 100 gün arasında gerçekleşir. Genç ergin böcekler Ağustos ve Eylül aylarında görünür. Fakat bu böcek üçüncü bir kışlama dönemi geçirdikten sonra gelecek baharda Ağustos ayına kadar aktif değildir.



Şekil 7. Adi Mayıs böceği (*Melolontha melolontha* (L.)). a: Erkek ergin böcek; b: Dişi ergin böcek; c: Larva; d: Pupa

1.4.2. Adi Mayıs Böceğinin Mücadelesi

Ağaçlar üzerinde beslenen yetişkin böceklerle kimyasal ilaç kullanılarak mücadele edilmektedir. Ancak, erginlerin ölmesi toprak altındaki larvaların kontrolünü sağlamada etkili olmadığı için mücadele için garantili değildir. Ayrıca, ağaçlara püskürtülen kimyasal ilacın çevre üzerindeki etkisi oldukça yüksektir.

Entomopatojen nematod böcek grubunun çeşitli türlerini öldürme yeteneğine sahiptir ve toprakta aktif bir şekilde yayılmaktadır. Fakat, böcek grubunun çoğuna karşı etkinliği düşüktür (Gerristen vd., 1998). Özellikle *Phyllopertha horticola*'nın mücadelesinde *H.*

bacteriophora oldukça başarılıdır. Ancak, Peters (2000) *M. melolontha*'nın nematodlarla alan mücadelesinin ekonomik olmadığını belirtmiştir. *Steinernema glaseri* suşlarının *M. melolontha* üzerinde oldukça iyi sonuçlar gösterdiği bilinmektedir (Berner vd., 2001). Berner ve arkadaşları (2002) *H. bacteriophora* ile 1 milyon/m² konsantrasyonunda yapılan uygulamada %65 oranında zararlı sayısının azaltılabileceğini tespit ettiler. Peters (2004), *Steinernema scarabaei*'nin *M. melolontha* üzerinde laboratuvar denemelerinde oldukça etkili olduğunu gösterdi.

1.5. Tezin Amacı

Günümüzde zararlılarla mücadelede özellikle 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 Trabzon ili ve ilçelerindeki tarım arazilerinden entomopatojen nematod izole edilmesi, bunların karakterizasyonlarının gerçekleştirilmesi ve *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae) üzerindeki insektisidal etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu sayede bölgenin önemli toprak altı zararlılarından biri olan *M. melolontha*'ya karşı etkili ve güvenilir bir yerel biyolojik mücadele etmeninin tespit edilmesi hedeflenmiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

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

Entomopatojen nematodların topraktan izole edilmesinde kullanılan en yaygın ve geçerli yöntem, EPN'lara duyarlı bir konağı toprak içerisinde bekleterek konağın nematod tarafından infekte olmasını sağlamaktır. Büyük bal mumu güvesi, *Galleria mellonella* son dönem larvaları (Şekil 8), topraktan EPN'ları izole etmek için kullanılan, en uygun konukçular olarak bilinmektedir (Bedding ve Akhurst, 1975). EPN ile ilgili yapılan birçok çalışmada araştırmacıların gerek başarısı, gerekse uygulama kolaylığı ve yaygınlığı açısından bu yöntemi tercih ettikleri gözlenmektedir (Nguyen ve Smart, 1992; Steiner, 1996; Mracek vd., 1999; Stock vd., 1999; Griffin vd., 2000; Malan vd., 2008; Nguyen vd., 2008).

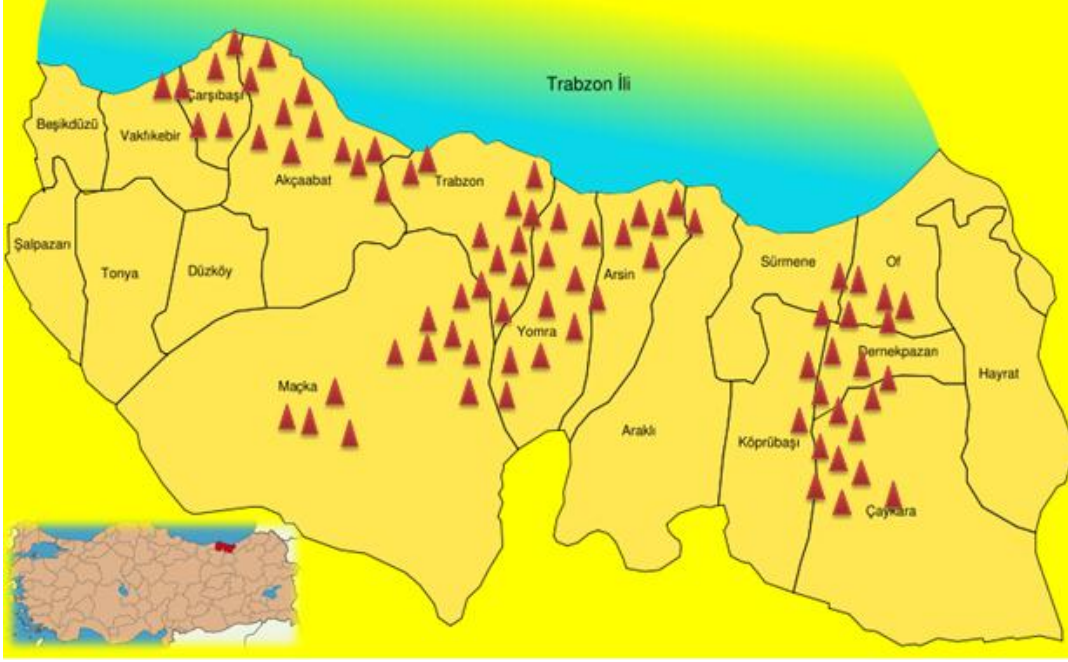
Büyük bal mum güvesinin laboratuvar ortamında çoğaltılması Gouge (1997)'nin değiştirilen yöntemine göre gerçekleştirildi. Primer kültür olarak larvalar, Trabzon'un Of ilçesindeki arıcılardan temin edildi. Böcek kültürleri, plastik kaplar (15 × 8,5 × 6 cm) içerisinde 25-28 °C sıcaklıkta yapay besinle 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. Besinleri haftalık olarak yenilenen larvalar 30-45 gün sonunda son evreye ulaşınca kaplardan alındı. Bu larvalar, gelişimlerini durdurmak, ağ ve pupa oluşturmalarını engellemek için bir süzgeç içinde 55-58 °C'deki su banyosunda 10-15 saniye tutuldu. Bu işlemten hemen sonra oda sıcaklığındaki su içerisinde 10 saniye tutularak larvaların ölmesi engellendi.



Şekil 8. Son evre *Galleria mellonella* larvaları

2.2. Toprak Örneklerinin Alınması

Toprak örneklemelemleri 2010 yılında Nisan ve Eylül ayları arasında toplandı. Trabzon ili ve ilçelerinde bulunan tarım yapılan arazilerden çeşitli lokalite ve yüksekliklerden rastgele yerlerden 77 toprak örneği alındı (Şekil 9). Örnekler, toprağın üst yüzeyi temizlendikten sonra 20 cm derinliğe kadar kazılarak alındı (Sturhan ve Liskova, 1999). Her 100 m²'lik alan içinden 3-8 toprak örneği olacak şekilde toprak alındı ve iyice karıştırıldı. Örnek alınan lokaliteler arasında arazinin durumuna göre 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.



Şekil 9. Trabzon ili ve ilçelerinden nematod izolasyonu için alınan toprak örneklerinin yerleri

2.3. Toprakta Entomopatojen Nematodların İzolasyonu

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

Ölü böceklerden, enfeksiyon özelliğine sahip juvenil nematodları izole etmek için White Tuzak 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 10). 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 10. Enfekte böceklerden White Tuzak (White, 1927) yöntemiyle entemopatojen nematodların izolasyonu

2.4. Entomopatojen Nematodların White Tuzaktan 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. White tuzaktan elde edilen EPN larvalarının (Şekil 10) yüzey sterilizasyonlarının yapılması için bir cam beher içerisine alınarak üzerleri saf su ile dolduruldu. Bu şekilde beherlerde bekletilen nematodların bir süre sonra tabana çökmesi sağlandı ve böylece üstteki su uzaklaştırılarak aynı behere yeniden saf su ilave edildi ve bu işlem 3-4 kez tekrarlandıktan sonra nematodlar 250 ml hacimli flasklarda 10 °C'de muhafaza edildi (Koppenhöfer ve Kaya, 1999). Daha sonra elde edilen nematodların EPN olduklarını kesinleştirmek için bu nematodlara sağlıklı *G. mellonella* larvaları üzerinde tekrar infektivite testi uygulandı. Böylece, topraktaki olası diğer EPN olmayan Rhabditidler ile karışmaları önleildi. Elde edilen EPN'ların kültürleri laboratuarda *G. mellonella*'nın son dönem larvaları üzerinde devam etmektedir.

2.5. Entomopatojen Nematodların Depolanması

Nematod kültürleri hücre kültür flaskları içerisinde 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).

2.6. Entomopatojen Nematodların Tür Teşhislerinin Yapılması

Günümüzde EPN’ların tür teşhisleri için morfometrik ölçümler, DNA düzeyinde moleküler analizler ve Scanning Elektron Mikroskop (SEM) ile elde edilen detaylı morfolojik görüntüler birlikte kullanılmaktadır (Hominick vd., 1996; Burnell ve Stock, 2000; Stock ve Gress, 2006; Nguyen vd., 2007). Bu çalışmada morfometrik ölçümlerden ve moleküler analizlerden faydalanıldı.

2.6.1. Morfometrik Özelliklerin Belirlenmesi

Entomopatojen nematodların morfolojik ve morfometrik olarak incelenmesi için her bir izolatın erkek ve infektif juvenil bireylerinden kalıcı preparatlar hazırlandı. Bu amaçla, *G. mellonella* son evre larvaları nematodlarla enfekte edildi. Enfeksiyondan 4-8 gün sonra ölü larvaların stereo mikroskop altında diseksiyonu yapıldı. İnfektif juvenil ve erkek nematodlar kadavralardan toplandı ve beher içerisinde üç kere çöktürülüp yıkandı. Nematodlar, içerisinde 1 ml Ringer solüsyonu bulunan tüplere aktarıldı. Tüpler 60 °C’ye ayarlanmış sıcak su içerisinde 1-2 dk bekletildi ve ölmeleri sağlandı. Daha sonra 60 °C’deki TAF (Triethanolamine Formalin) solüsyonundan 1 ml alınarak Ringer içerisindeki nematodların bulunduğu tüplere eklendi ve bir gece boyunca fikse edildi. Ertesi gün üzerlerindeki Ringer ve TAF karışımı uzaklaştırıldı. Nematodların bulunduğu tüplere saf TAF solüsyonu ilave edildi ve bir gece bekletildi. Daha sonra TAF solüsyonu pipetle uzaklaştırıldı ve üzerlerine Solüsyon I (%20’si %95’lik etanol, %1’i gliserin ve %79’u distile su) ilave edildi. TAF solüsyonu Solüsyon I’in yapısını bozduğundan dolayı nematodların çöktükten sonra aynı işlem iki kere yapıldı. Nematodlar Solüsyon I ile dolu

cam kaplara aktarıldı ve üzerleri lam veya cam kullanılarak kapatıldı. İçerisinde %70'lik alkol bulunan büyük bir petri içerisinde nematodların bulunduğu cam kaplar konuldu ve petrinin üzeri örtüldü. Bir gece beklettikten sonra cam kaplardaki Solusyon I pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Cam kaplara Solusyon II (%5'i gliserin ve %95'i %95'lik etanol) ilave edildi. Cam kapların üzeri yarıya kadar açık kalacak şekilde lam veya cam ile kapatıldı. Alkol bulunmayan bir petri içerisinde konuldu ve 40 °C'lik bir etüvde 3 saat boyunca bekletildi. Belli zaman aralıklarında cam kaplar kontrol edilerek Solusyon II azalan kaplara ekleme yapıldı. Bu işlemlerden sonra fikse edilen nematodlar Seinhorst (1959)'a göre gliserol içine alınarak kalıcı preparatlar oluşturuldu.

Nematodları morfolojik ve morfometrik olarak tanımlamak için Steinernematid ve Heterorhabditid izolatlarından 20'şer birinci jenerasyon erkek ve infektif juvenil bireylerinden hazırlanan preparatlar Leica IM-50 bilgisayarlı ölçüm modülü kullanılarak incelendi.

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

2.6.2. Moleküler Özelliklerin Belirlenmesi

2.6.2.1. DNA İzolasyonu

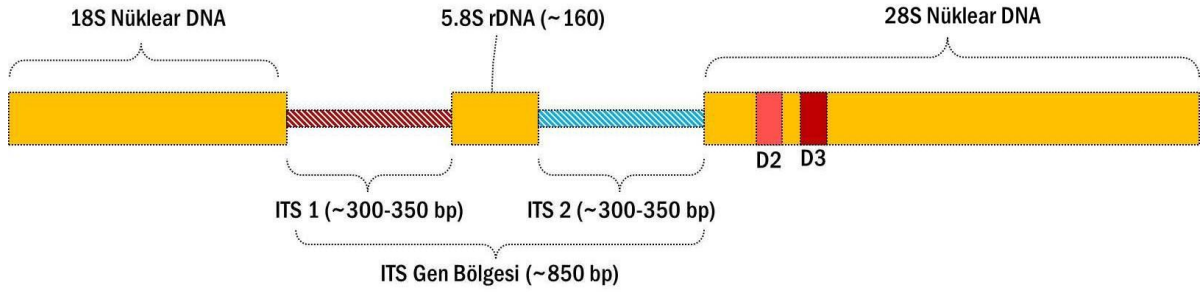
Her izolatın sadece bir dişi veya juvenil bireyinden DNA izolasyonu Joyce ve arkadaşlarına (1994) göre değiştirilerek yapıldı. Her izolat için bir örnek 10 µl worm lizis tamponu (500 mM KCl, 100 mM Tris-Cl pH 8,3, 15 mM MgCl₂, 100 mM DTT, %4,5 Tween 20, %0,1 jelatin) içinde parçalandı. Hazırlanan homojenat, içinde 10 µl ddH₂O ve 2 µl proteinaz K (600 µg/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 dk santrifüj edildikten sonra DNA'nın bulunduğu süpernatant alınarak -20 °C'de muhafaza edildi. İzole edilen DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu spektrofotometrede ölçüldü.

2.6.2.2. PCR ile rRNA ITS Bölgesinin Çoğaltılması

18S ve 28S rRNA alt üniteleri arasında kalan ITS1, 5.8S ve ITS2 bölgelerinin (Şekil 11) PCR ile çoğaltılması için ileri primer olarak 18S (5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3') ve geri primer olarak 28S (5'-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3') kullanıldı (Vrain vd., 1992).

PCR reaksiyonu için 5 µl DNA süspansiyonu, 5 µl (10X) PCR tamponu, 2 µl MgCl₂ (10 mM), 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 H₂O ile son hacim 50 µl'ye tamamlandı. PCR koşulları 94 °C'de 6 dk denatürasyondan sonra 94 °C'de 1 dakika, 55 °C'de 2 dk ve 72 °C'de 2 dk şeklinde 35 döngü tamamlandı. Son olarak 72 °C'de 10 dakika bekletilerek eksik kalan reaksiyonların tamamlanması sağlandı (Phan vd., 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 vd., 2005). Geri kalan PCR ürünleri Promega Wizard SV Gel ve PCR Clean-Up System kiti ile saflaştırıldı.



Şekil 11. 18S-28S nüklear ribozomal DNA (rDNA)'ın Internal Transcribed Sequence (ITS) bölgesi

2.6.2.3. PCR Ürünlerinin Klonlanması ve DNA Analizi

PCR ürünleri pGEM-T Easy vektörüne aktarıldıktan sonra *Escherichia coli* DH 10 β 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 vd., 2004b).

2.6.2.4. DNA Dizi Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Filogenetik Analiz

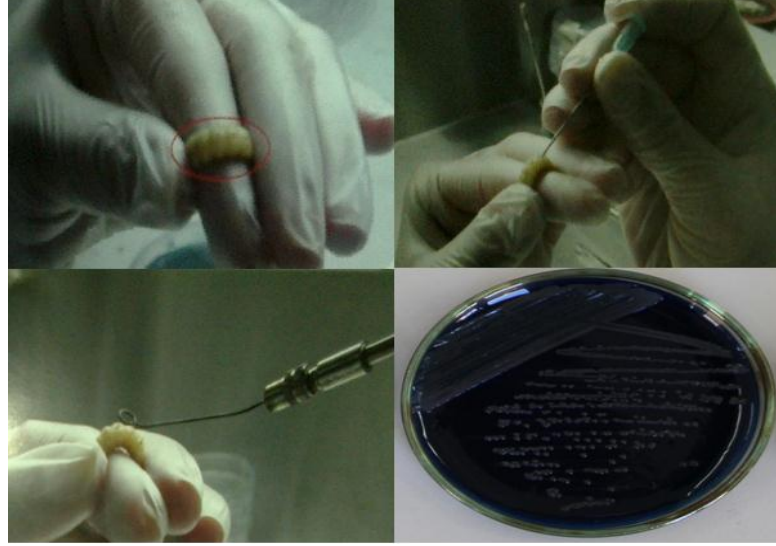
DNA dizi sonuçları Clustal X programında eşleştirilerek baz dizileri, izolatlar arası, tür içi ve türler arası seviyede karşılaştırıldı. Eşleştirilmeler GeneDoc programında düzenlendi. Filogenetik ilişkiler BioEdit ve MEGA 5.05 programları kullanılarak belirlendi ve Bootstrap ağaçlar oluşturuldu.

2.7. Entomopatojen Nematodlarla Simbiyotik Olarak İlişkili Bakterilerin Tanımlanması

2.7.1. 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 İJ/ 500 μ 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 petriler 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 vd., 1996). Mavi renkli koloniler dikkatlice seçilerek TSA (Tryptic Soy Agar) besiyerine ekim yapıldı. Bu şekilde saflaştırılan bakteriyel izolatlardan %20’lik gliserol

içinde stok kültürler oluşturuldu. Elde edilen bakteriyal izolatlar üzerinde yapılan tüm tanımlanma çalışmaları Faz-I bakteriler kullanılarak yapıldı.



Şekil 12. Nematod ile enfekte olan larvalardan simbiyotik bakteri izolasyonu

2.7.2. Simbiyotik Bakterilerin Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi

2.7.2.1. Simbiyotik Bakterilerden DNA İzolasyonu

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

2.7.2.2. 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 MgCl₂ (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 ddH₂O karıştırılarak, son hacim 50 µl'ye tamamlandı. PCR koşulları 95 °C'de 2 dk denatürasyondan sonra 40 döngü 94 °C'de 30 saniye, 55 °C'de 45 saniye ve 72 °C'de 1 dk 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 okutulmuş gen bölgesinin tüm dizisi elde edildi. DNA dizi sonuçları Chromas 14 programında birleştirildi ve gen bankasındaki verilerle karşılaştırıldı.

2.8. Entomopatojen Nematodların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

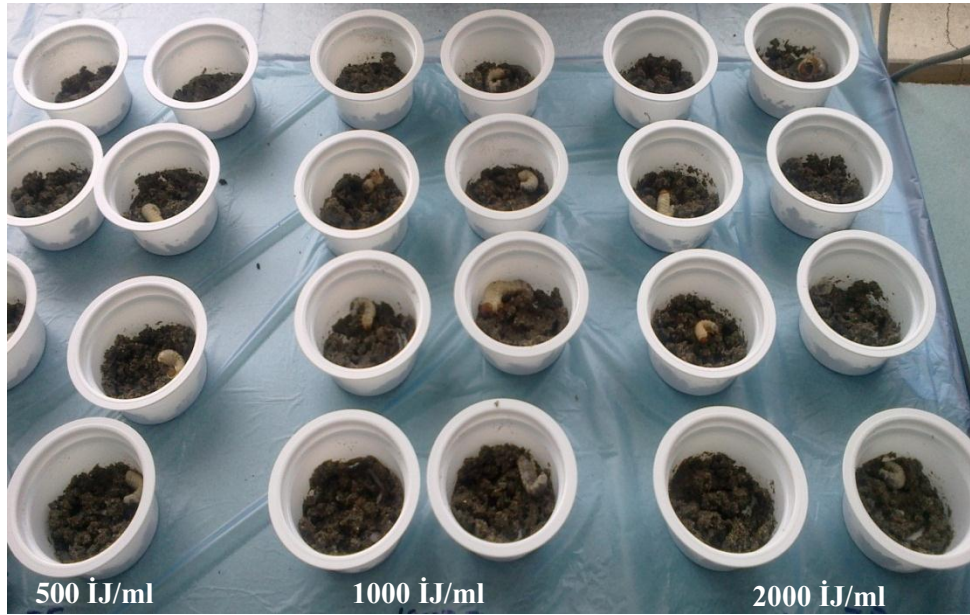
Entomopatojen nematodların Doğu Karadeniz Bölgesinde zarar oluşturan *Melolontha melolontha* üzerindeki insektisidal etkilerini belirlemek amacıyla kum ve saksı denemeleri yapıldı. Kum denemelerinde yüksek etki gösterdiği belirlenen üç izolatu *M. melolontha* üzerinde saksı denemeleri yapılarak insektisidal etkiler gözlemlendi. Bu zararlı belirlenirken özellikle hayat döngülerinin en az bir evresinde toprakla ilişkili olmasına dikkat edildi.

2.8.1. *Melolontha melolontha* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae) Larvalarının Toplanması

Deneylerde kullanılan *Melolontha melolontha* (Adi Mayıs Böceği) larvaları Trabzon ilindeki findık bahçelerinden toprak kazılarak toplandı. Plastik kaplar içerisinde laboratuara getirilen larvalar deneyler başlayıncaya kadar toprak içerisinde oda sıcaklığında tutuldu. Biyotest için kullanılan İJ nematodlar, *Galleria mellonella* larvalarında *in vivo* olarak çoğaltıldı ve depolandı. Kullanılan nematod kültürlerinin en fazla 3 haftalık olmasına dikkat edildi.

2.8.2. Entomopatojen Nematodların *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabeidae) Üzerindeki İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

Entomopatojen nematod izolatlarının *M. melolontha* üzerindeki insektisidal etkilerini belirlemek için yapılan biyotest çalışmaları Kaya ve Stock (1997) ve Ansari ve arkadaşlarının (2003) yöntemleri değiştirilerek gerçekleştirildi (Şekil 13). Bir nematod türü için biyotest çalışmaları plastik deney kaplarında yapıldı ve her bir izolat için üç farklı dozda üç tekrar ve bir kontrol kabı olmak üzere 72 larva kullanıldı. Her bir kaba (3,4 cm çapında) 10 gr otoklavlanmış kum dolduruldu. Üçlü grup için her birinin içerisine 500, 1000 ve 2000 İJ/ml olacak şekilde infektif juveniller eklendi. Kontrol grubu için ise her kaba sadece distile su ilave edildi. Daha sonra her bir kaba üçüncü evre birer *M. melolontha* larvası eklendi. İki set halinde hazırlanan düzenekten biri 25 °C'de, diğeri ise 15 °C'de karanlık ortamda 10 gün inkübe edildi. Deneyler üç tekrarlı olarak yapıldı. Sonuçlar günlük takip edildi. Ölü larvalar kaptan çıkartılarak Stereo mikroskop altında diseksiyon yapıldı ve ölümün nematod enfeksiyonundan olup olmadığı belirlendi.



Şekil 13. İzolatların *Melolontha melolontha* üzerindeki kum denemeleri

2.8.3. Entomopatojen Nematodların (ZET09, ZET31 ve ZET35) Saksı Denemelerinde *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabeidae) Üzerindeki İnsektisidal Etkileri

Kum denemeleri sonucunda *M. melolontha* üzerinde öldürücü etkisi yüksek olan ZET09, ZET31 ve ZET35 numaralı izolatlarının zararlı üzerindeki saksı denemeleri Laznik ve arkadaşlarının (2009) çalışmaları değiştirilerek yapıldı. Bu testler çilek fidelerinin dikildiği plastik saksılarda yapıldı (Şekil 14). Üç izolat için üçer saksı üç tekrarlı, kontrol grubu her tekrar için üç saksı olarak test edildi. Her bir saksıya 80 g toprak dolduruldu. Çilek fideleri plastik saksılara dikildi. Fidelerin canlı kalması için günlük sulama yapıldı. Fideler yeterince kök saldıktan sonra her saksıya beş adet üçüncü evre *M. melolontha* larvası bırakıldı. Larvaların toprak içerisine girmesi için yaklaşık 1 gün bekletildi, saksıların herbirine 1000 İJ/g toprak olacak şekilde entomopatojen nematod izolatları eklendi. Kontrol grubu için sadece su ilave edildi. Saksılar laboratuvar ortamında yaklaşık 25 °C’de muhavaza edildi. Fidelerin kurumaması için sulamalara devam edildi. Çalışma 20 gün boyunca takip edildi. Bu süre sonunda bütün çilek fideleri söküldü. Ölü çıkan larvalar White tuzağa alındı. Sökülen çilek fidelerinin kökleri yıkandı ve fotoğrafları çekildi.

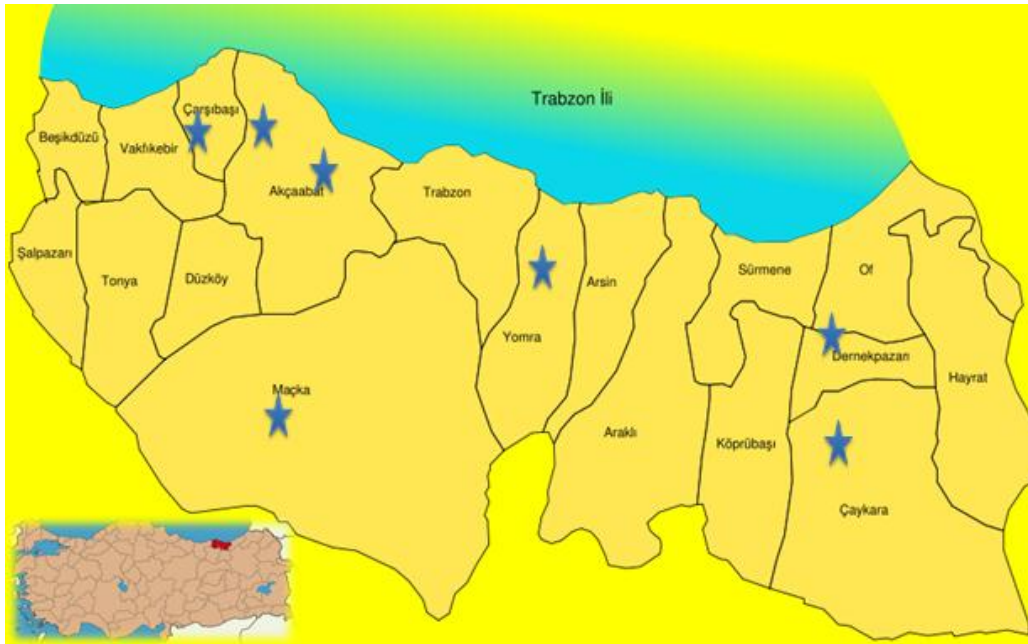


Şekil 14. İzolatların saksı denemeleri. ZET09: *H. bacteriophora*, ZET31: *S. feltiae*; ZET35: *H. bacteriophora*

3. BULGULAR

3.1. Toprak Örneklerinin Toplanması ve Entomopatojen Nematodların İzolasyonu

Trabzon ili ve ilçelerindeki farklı tarım arazilerinden rastgele olarak seçilen 77 istasyondan *Galleria* tuzak yöntemiyle 7 entomopatojen nematod izolasyonu gerçekleştirildi (Şekil 15). İzolatlar izolasyon sırasına göre ZET02, ZET04, ZET09, ZET28, ZET31, ZET35 ve ZET76 olarak numaralandırıldı, kültürleri oluşturuldu ve stokları yapıldı. Nematod izolasyonu yapılan örnekleme noktalarının koordinatları ve özellikleri Tablo 6'da verilmektedir.



Şekil 15. Nematod izolasyonu yapılan örnekleme noktaları

Tablo 5. Entomopatojen nematodların izole edildiği örnekleme noktalarının koordinatları ve özellikleri

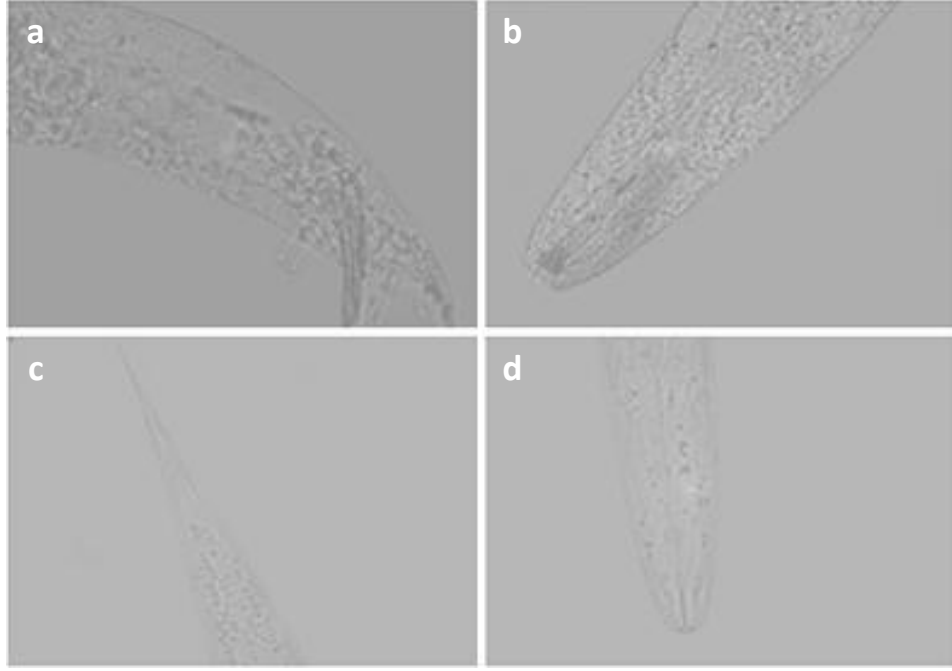
İzolot numarası	Örnek Koordinat*	Deniz Seviyesinden Yüksekliği (m.)
ZET02	N 40° 56' E 39° 45'	89
ZET04	N 40° 50' E 39° 41'	156
ZET09	N 40° 40' E 39° 39'	364
ZET28	N 40° 39' E 39° 40'	404
ZET31	N 40° 39' E 39° 40'	384
ZET35	N 40° 37' E 39° 41'	365
ZET76	N 40° 38' E 39° 39'	1234

*(N: Kuzey enlemi, E: Doğu boylamı)

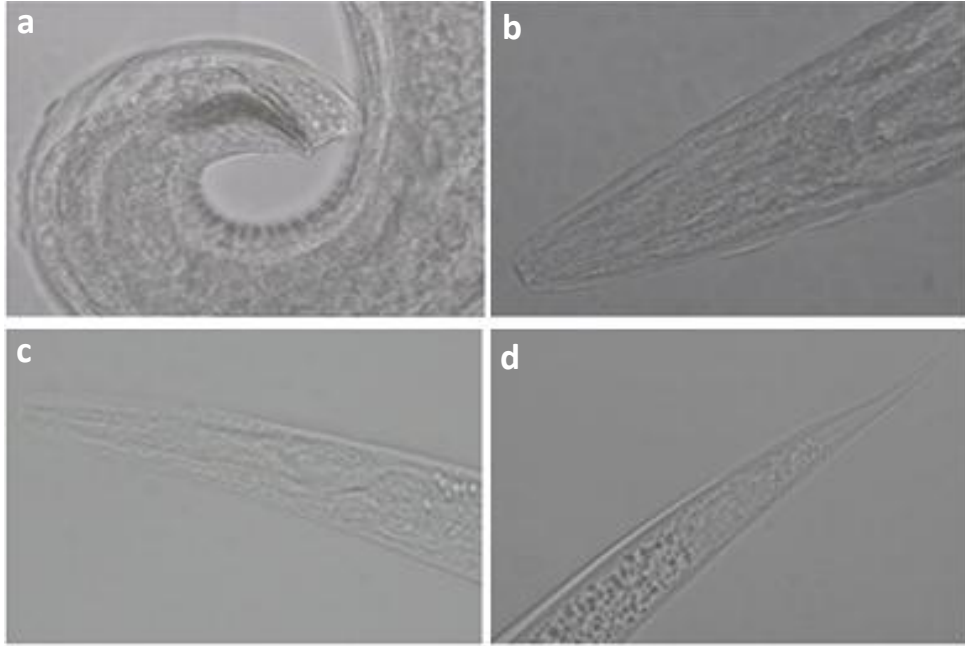
3.2. İzolatların Tür Teşhisleri

3.2.1. Morfometrik Tanımlama

Çalışmada izole edilen entomopatojen nematodun her birine ait 20'şer infektif juvenil ve erkek bireylerinin morfolojik ve morfometrik ölçümleri yapıldı. İzolatlara ait morfolojik değişkenlerin fotoğrafları Şekil 16, Şekil 17 ve Şekil 18'de gösterilmektedir. Ölçümlere ait veriler Tablo 8 ve Tablo 9'da yer almaktadır.



Şekil 16. *Heterorhabditis bacteriophora* (ZET35) erkek bireylere ve İJ'lere ait morfolojik görüntüler. a: Erkeğin kuyruk kısmı; b: Erkeğin baş kısmı; c: İJ'in kuyruk kısmı; d: İJ'in baş kısmı



Şekil 17. *Steinernema feltiae* (ZET31) erkek bireylere ve İJ'lere ait morfolojik görüntüler. a: Erkeğin kuyruk kısmı; b: Erkeğin baş kısmı; c: İJ'in baş kısmı; d: İJ'in kuyruk kısmı

Tablo 6. İzolatların infektif juvenil bireylerinin morfometrik ölçümleri

İJ	ZET02	ZET04	ZET09	ZET28	ZET31	ZET35	ZET76
n	20	20	20	20	20	20	20
L	(587-621) 590±21	(601-643) 626,83±25,4	(599-621) 609,85±19,9	(540,62-599,7) 567,72±19,2	(846,9-944,4) 896,8±33,1	(568,4-601,8) 575,43±20,1	(685,1-868,2) 800,3±46,5
EP	(90-107) 97±5	(89,64-105,36) 96,8±4,9	(89,72-114,71) 99,19±5,1	(90,21-108,52) 99,76±4,8	(49-112,8) 62,6±17	(88,64-107,71) 98,9±5,1	(47,9-64,4) 56,1±4,2
NR	(74,02-87,64) 83,63±4,3	(78,26-90,64) 85,45±5,2	(82,72-93,82) 88,63±4,3	(81,14-92,2) 87,27±3,3	(68,5-118,2) 104,7±13,7	(82,72-93,82) 88,63±4,3	(89,9-117,7) 100,2±7,2
ES	(125,4-130,2) 127,73±3,8	(116,83-130,1) 126,4±3,5	(125,4-133,4) 127,73±4,2	(116,52-129) 122,86±3,2	(117,4-148) 134,9±8,5	(125,4-133,4) 127,73±4,2	(108,8-138,1) 126±8,6
T	(80,37-94,63) 87,61±3,2	(81,48-95,83) 86,05±3,4	(84,38-98,63) 89,68±2,9	(82,02-92,85) 86,92±3,07	(50,3-62,3) 55,5± 3,5	(80,37-94,63) 87,61±2,9	(50,5-83,2) 71±9
W	(21,5-26,47) 24,7±2,3	(20,89-25,49) 22,9±2,3	(23,14-27,84) 25,4±2,1	(20-24,51) 22,68±1,38	(25,7-36) 30,8±3,3	(21,5-25,43) 23,2±2,01	(20,4-74) 28,5±11,2
ABW	(12,82-18,81) 15,59±1,9	(11,56-18,97) 14,9±2	(10,08-20,27) 16,21±1,7	(11,95-19,13) 15,47±2,07	(13,9-17,8) 16±1,3	(12,82-18,81) 15,59±1,9	(11,1-16,9) 14,5±1,7
a	(21,73-25,61) 21,92±2,1	(22,53-26,81) 23,46±2,1	(21,65-28,51) 25,06±2,1	(22,91-27,8) 25,03±2,07	(25,8-34,2) 29,4±3	(24,73-30,01) 27,6±2,3	(9,9-37,2) 30,1±5,9
b	(4,55-5,32) 4,79±0,2	(4,23-5,76) 4,98±0,2	(4,21-5,10) 4,78±0,2	(4,31-5,08) 4,62±0,2	(6-7,8) 6,7±0,5	(4,55-5,42) 4,38±0,3	(5-7,2) 6,4±0,5
c	(6,54- 7,64) 6,84±0,4	(6- 7,4) 6,64±0,3	(5,57- 7,86) 6,74±0,4	(5,99-7,17) 6,53±0,3	(13,8-18,7) 16,2±1,3	(6,54- 7,64) 6,84±0,4	(9,8-15,9) 11,4±1,5
D	(73,83-89,75) 83,25±4,1	(74,61-90,04) 84,87±4,5	(72,56-88,23) 84,36±4,1	(74,19-89,63) 81,19±4,6	(38,2-78,4) 46,4±11,1	(75,83-90,03) 83,25±4,3	(37,3-51,8) 44,7±3,9
E	(24,47-30,73) 26,59±2,2	(22,53-30,07) 27,19±2,1	(22,07-28,79) 25,17±2,1	(21,54-29,11) 26,09±2,06	(94,3-199,2) 112,8±29,4	(23,47-30,73) 26,59±2,1	(62,6-115,7) 80,2±12,2

* (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, n: örnek sayısı).

Tablo 7. İzole edilen entomopatojen nematodlardan erkek bireylerin morfometrik ölçümleri

Erkek Birey	ZET02	ZET04	ZET09	ZET28	ZET31	ZET35	ZET76
n	20	20	20	20	20	20	20
L	(564,7-657,5) 603,2±26,6	(534,7-647,5) 591,2±21,6	(571,7-667,5) 623,2±25,6	(564,7-657,5) 603,2±26,6	(1208-1740) 1431,5±133,2	(534,7-647,5) 591,2±21,6	(1280-1547) 1405,2±82
EP	(99,6-126,8) 116,9±3,5	(91,6-121,7) 114,9±3,6	(94,7-119,8) 113,5±3,5	(99,6-126,8) 116,9±3,5	(84,9-92,4) 87,2±2,1	(91,6-121,7) 114,9±3,6	(89,1-105,8) 98,5±5,1
NR	(87,4-98,5) 91,4±3,3	(84,4-96,5) 89,4±3,1	(85,7-97,4) 92,7±3,3	(87,4-98,5) 91,4±3,3	(118,3-138,6) 130,1±5,6	(84,4-96,5) 89,4±3,1	(111,4-137) 127,7±6,7
ES	(117,4-147,5) 130,1±4,5	(112,41-46,1) 129,2±5,2	(121,4-148,5) 132,5±4,5	(117,4-147,5) 130,1±4,5	(151,1-160,1) 155,9±2,4	(112,41-46,1) 129,2±5,2	(132,5-165,5) 152±8,6
T	(84,1-118,3) 99,6±4,2	(86,1-120,3) 101,2±4,2	(85,3-115,6) 97,9±4,1	(84,1-118,3) 99,6±4,2	(24,1-38,8) 31±3,9	(86,1-120,3) 101,2±4,2	(26,7-37,8) 30,8±3,5
M	-	-	-	-	-	-	(3,7-5,1) 4,2±0,6
W	(21,7-32,9) 25,3±4,0	(20,8-34,7) 26,6±4,1	(21,6-33,4) 26,8±3,1	(21,7-32,9) 25,3±4,0	(85,6-106,6) 96,8±7,4	(20,8-34,7) 26,6±4,1	(90,7-111) 98,6±6,3
ABW	(28,4-32,82) 30,54±2,3	(29,85-33,3) 31,25±2,3	(28,9-33,22) 31,09±2,5	(28,4-32,82) 30,54±2,3	(36,4-48,4) 41±3,2	(29,85-33,3) 31,25±2,3	(31,9-43,1) 37,4±3,4
SL	(37,2-44,1) 39,65±1,5	(36,2-45,1) 40,15±1,9	(37,1-43,3) 39,76±1,5	(37,2-44,1) 39,65±1,5	(65,9-78,3) 71,6±3,5	(36,2-45,1) 40,15±1,9	(71,3-81,5) 76,8±3,3
GL	(18,9-26,8) 22,7±1,5	(17,6-27,8) 21,2±1,5	(17,4-25,3) 21,2±1,5	(18,9-26,8) 22,7±1,5	(46,3-54,3) 49,6±2,5	(17,6-27,8) 21,2±1,5	(44-52,1) 47,4±2,4
a	(16,1-30,7) 24,3±1,1	(17,1-31,6) 25,6±1,1	(16,8-31,2) 24,9±1,1	(16,1-30,7) 24,3±1,1	(12,3-16,7) 14,9±1,5	(17,1-31,6) 25,6±1,1	(11,7-16,7) 14,3±1
b	(3,5-5,6) 4,8±1	(3,9-5,3) 4,6±1	(3,7-5,4) 4,7±1,1	(3,5-5,6) 4,8±1	(7,8-11,3) 9,2±0,9	(3,9-5,3) 4,6±1	(8,5-10,1) 9,3±0,5
c	(6,1-7,5) 6,8±0,5	(5,7-6,9) 6,1±0,5	(5,9-6,8) 6,1±0,5	(6,1-7,5) 6,8±0,5	(35,4-56) 46,6±4,9	(5,7-6,9) 6,1±0,5	(34,6-55) 46,2±5,6
D	(75,7-92,1) 85,7±1,2	(76,1-91,8) 82,1±1,2	(75,5-91,6) 84,8±1,5	(75,7-92,1) 85,7±1,2	(53,1-59,3) 56±1,9	(76,1-91,8) 82,1±1,2	(60,2-71,2) 64,9±3,2
E	(109,4-132,6) 118,6±1,5	(105,4-133,6) 113,6±1,5	(104,3-133,2) 118,6±1,5	(109,4-132,6) 118,6±1,5	(230,9-352,7) 285,7±35,8	(105,4-133,6) 113,6±1,5	(235,6-377,4) 323,8±38,1

* (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, n: örnek sayısı).

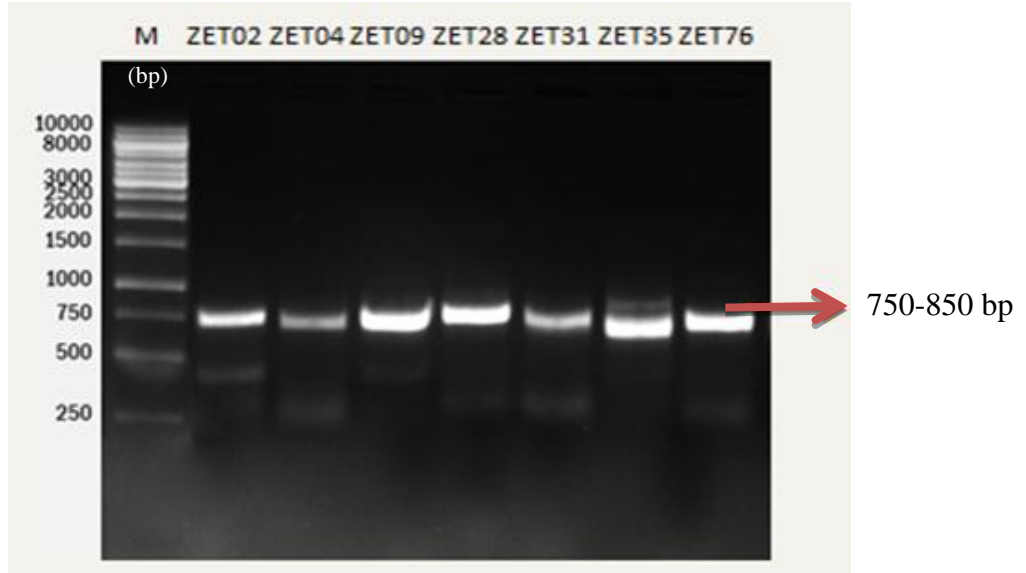
3.2.2. Moleküler Tanımlama

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

3.2.2.1. 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 18).

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. Farklı noktalardan izole edilen 8 entomopatojen nematodun rRNA ITS bölgesinin DNA sıraları Ek 1'de görülmektedir.



Şekil 18. Entomopatojen nematodların rRNA ITS bölgelerinin PCR ile çoğaltılmaları. %1'lik agaroz jel elektroforez, M: moleküler işareti (1 kb), üst sıradaki rakamlar izolat numaralarını göstermektedir

3.2.2.2. Entomopatojen Nematodların DNA Dizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Farklı noktalardan izole edilen 7 entomopatojen nematodun rRNA ITS bölgesinin DNA dizin analizi sonrasında, baz sıraları NCBI Gen Bank'taki verilerle karşılaştırıldı. Blast sonucuna göre 7 nematodun türleri moleküler düzeyde tespit edildi (Tablo 8). Bu sonuçlara göre ZET02, ZET04, ZET09, ZET28 ve ZET35 numaralı izolatların *Heterorhabditis bacteriophora*, ZET31 ve ZET76 numaralı izolatların ise *Steinernema feltiae* olduğu belirlendi.

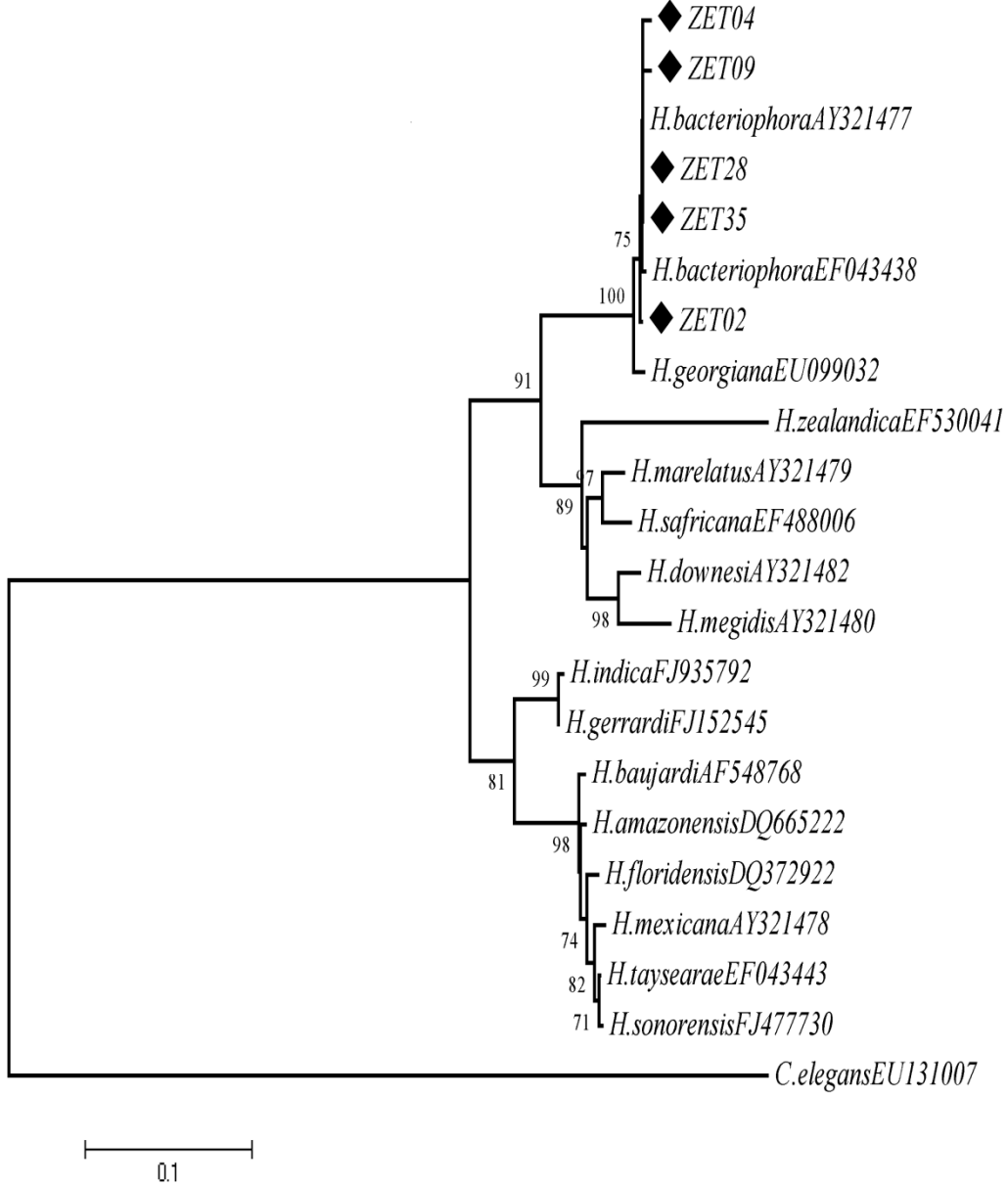
Tablo 8. İzolatların rRNA ITS bölgesi dizi analizlerine göre tür tayinleri

İzolat numarası	Tür adı	ITS Bölgelerine göre	
		Büyüklik	Benzerlik oranı
ZET02	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	902 bp	%99
ZET04	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	882 bp	%99
ZET09	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	748 bp	%99
ZET28	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	799 bp	%99
ZET31	<i>Steinernema feltiae</i>	735 bp	%99
ZET35	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	889 bp	%99
ZET76	<i>Steinernema feltiae</i>	929 bp	%99

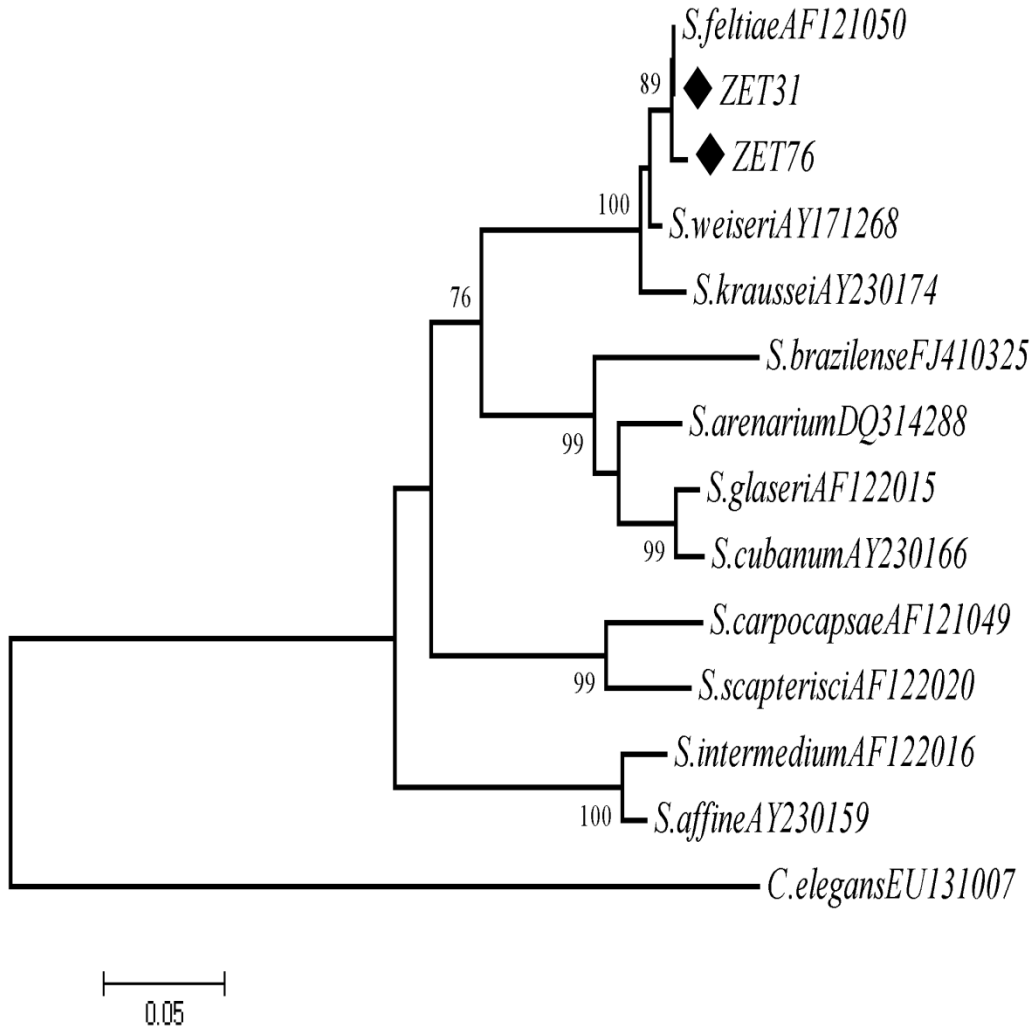
3.3. Filogenetik Analiz

DNA dizi analizleri yapılan, entomopatojen nematodların rRNA ITS gen bölgeleri esas alınarak MEGA 5.05 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) Filogenetik Ağaç Programı ile tespit edilen türlerin birbirleri arasındaki akrabalık dereceleri belirlendi. *Heterorhabditis* türleri *Caenorhabditis elegans*'ın dış grup olarak kullanıldığı ağaç çiziminde beş izolatın da *H. bacteriophora* olduğu gözlemlendi. Ayrıca, bu beş izolatın birbirlerinden farklı olduğu ve birbirlerinin suşları oldukları tespit edildi. ZET02 ve ZET04

numaralı izolatların diğerlerinden daha uzak olduğu belirlendi (Şekil 19). Aynı şekilde iki izolatın da *S. feltiae* ile yakın ilişkili olduğu gözlemlendi. Bu iki izolatın da kendi aralarında farklılıkların olduğu ve birbirlerinin suşları oldukları belirlendi (Şekil 20).



Şekil 19. Türü tespit edilen *Heterorhabditis* cinsine ait entomopatojen nematodların ITS dizilerine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı. *C. elegans* EU131007 dış grup olarak kullanılmıştır. Seç-bağla (bootstrap) değerlerinin %70 ve yukarısı olanlar belirtilmiştir



Şekil 20. Türü tespit edilen *Steinernema* cinsine ait entomopatojen nematodların ITS dizilerine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı. *C. elegans* EU131007 dış grup olarak kullanılmıştır. Seç-bağla (bootstrap) değerlerinin %70 ve yukarısı olanlar belirtilmiştir

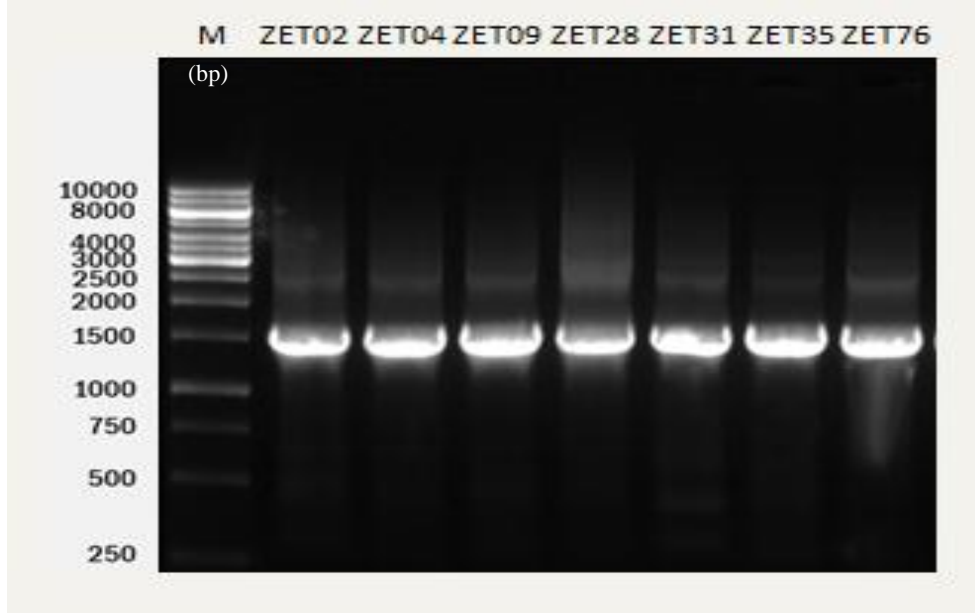
3.4. Entomopatojen Nematodlarla Simbiyotik Olarak İlişkili Bakterilerin Özellikleri

3.4.1. Simbiyotik Bakterilerin Moleküler Özellikleri

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

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 21).



Şekil 21. Entomopatojen nematodlarla simbiyotik yaşayan bakterilerin 16S rRNA gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılması. %1'lik agaroz jel elektroforez, 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. Farklı noktalardan izole edilen 7 entomopatojen nematodun simbiyotik bakterileri 16S rRNA gen bölgesinin DNA dizin analizi tamamlandı (Ek 2).

Farklı noktalardan izole edilen 7 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, *H. bacteriophora* ile ilişkili *Photorhabdus luminescens* ve *S. feltie* ile ilişkili *Xenorhabdus bovineii* (Tablo 9) olarak belirlenmiştir.

Tablo 9. İzole edilen entomopatojen nematodlarla simbiyotik yaşayan bakterilerin rRNA gen dizilerinin benzerlik oranları

İzolat	Simbiyotik Bakteri	İzole edildiği Nematod	Büyükük	Benzerlik
ZET02	<i>P. luminescens</i>	<i>H. bacteriophora</i>	1365 bp	%99
ZET04	<i>P. luminescens</i>	<i>H. bacteriophora</i>	1278 bp	%99
ZET09	<i>P. luminescens</i>	<i>H. bacteriophora</i>	972 bp	%99
ZET28	<i>P. luminescens</i>	<i>H. bacteriophora</i>	1214 bp	%99
ZET31	<i>X. bovienii</i>	<i>S. feltiae</i>	1483 bp	%99
ZET35	<i>P. luminescens</i>	<i>H. bacteriophora</i>	1242 bp	%99
ZET76	<i>X. bovienii</i>	<i>S. feltiae</i>	1461 bp	%99

3.5. Entomopatojen Nematodların İnsektisidal Etkileri

3.5.1. Kum Denemeleri

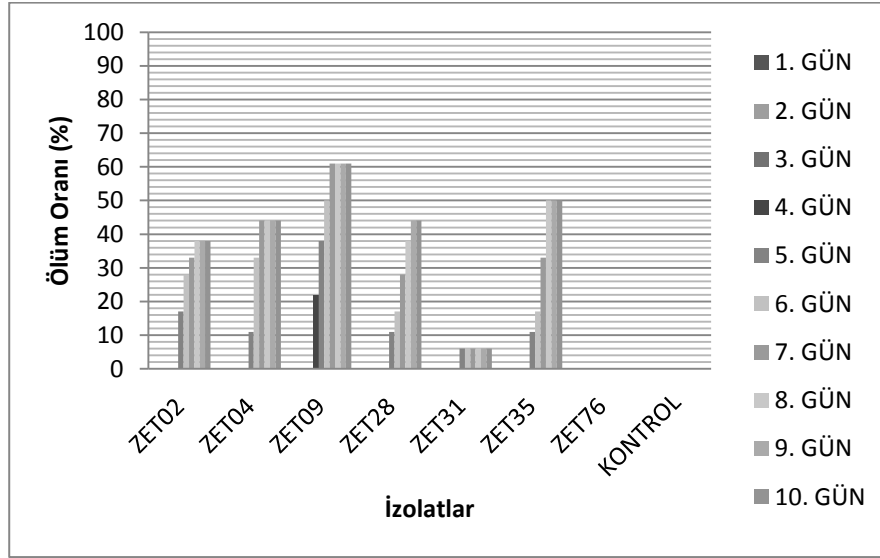
İzolatların *M. melolontha* üzerindeki etkileri 500, 1000 ve 2000 İJ/ml konsantrasyonlarında ve 15 ve 25 °C sıcaklıklarda gerçekleştirildi. Genel olarak 25 °C’de sağlanan ölüm etkisinin 15 °C’de sağlanandan daha yüksek olduğu tespit edildi.

M. melolontha üzerinde 15 °C’de 500, 1000 ve 2000 İJ/ml oranlarında ve kontrolle yapılan denemelerin sonuçları Şekil 22, 23 ve 24’de gösterilmiştir. 15 °C’de en yüksek insektisidal aktivite ZET09 izolatına ait 2000 İJ/ml dozunda %88 olarak belirlenmiştir.

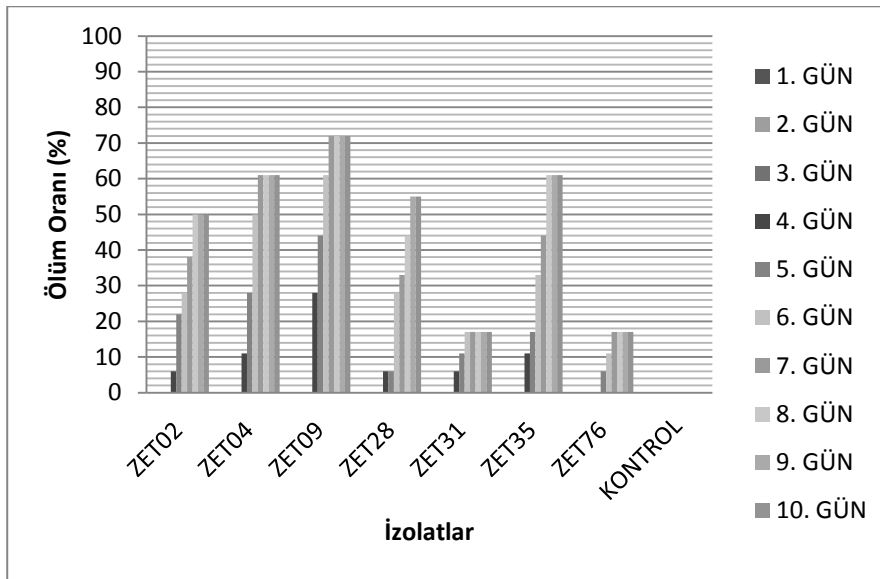
En düşük konsantrasyonda sağlanan en yüksek ölüm oranları ZET04, ZET09 ve ZET35 numaralı izolatlarda sırasıyla %66, %61 ve %66 şeklindedir. Test sonucunda 15 °C’de en yüksek ölüm oranı 2000 İJ/ml konsantrasyonunda %89 olarak enfeksiyondan yedi gün sonra ZET09 izolatından sağlandı. Bu çalışma ile birlikte 15 °C’de larva başına 500 İJ/ml konsantrasyonunda sağlanan ölüm oranları sırasıyla %38, 44, 61, 44, 6, 50 ve 0 olarak belirlendi. Aynı sıcaklıkta larva başına 1000 İJ/ml konsantrasyonunda elde edilen ölüm oranları %50, 61, 72, 55, 17, 61 ve 17 şeklinde iken 2000 İJ/ml konsantrasyonunda enfeksiyondan sekiz gün sonunda %11, 13, 89, 50, 22, 55 ve 22 olarak belirlendi (Şekil 22-24).

Yapılan çalışmalar sonunda 25 °C’de 2000 İJ/ml konsantrasyonunda sağlanan ölüm oranları ZET09 ve ZET35 numaralı izolatlarda enfeksiyondan altı gün sonra %100 olarak

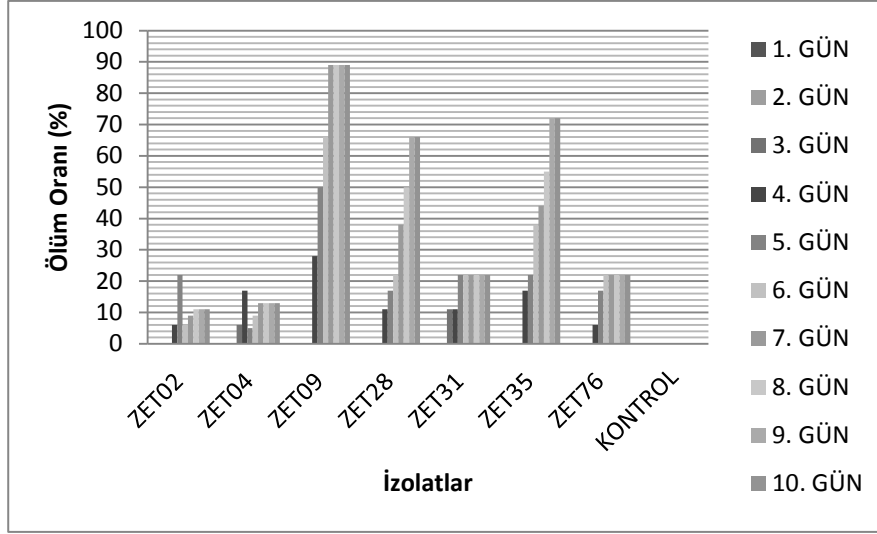
tespit edildi. En düşük konsantrasyonda ölüm oranları enfeksiyondan sekiz gün sonra sırasıyla %50, 66, 61, 55, 55, 66 ve 33 şeklinde belirlendi. Larva başına 1000 İJ/ml konsantrasyonunda ise aynı sürede sırasıyla %50, 77, 94, 61, 66, 83 ve 38 ölüm oranları sağlandı (Şekil 25-27). Kum denemeleri sonucu enfekte olan *M. melolontha* larvalarının görüntüleri Şekil 28’de verildi.



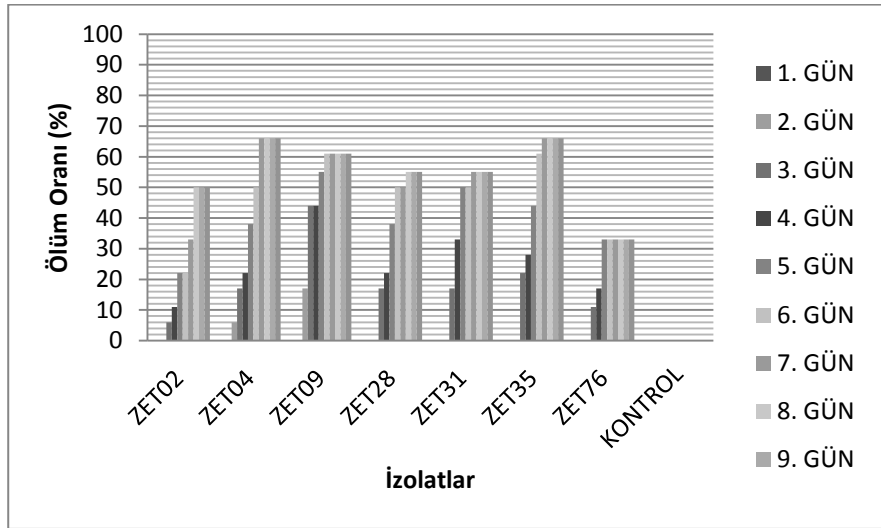
Şekil 22. İzolatların larva başına 500 İJ/ml oranında infektif juvenillerinin 15 °C’de *M. melolontha* (Coleoptera: Scarabeidae) üzerindeki etkileri



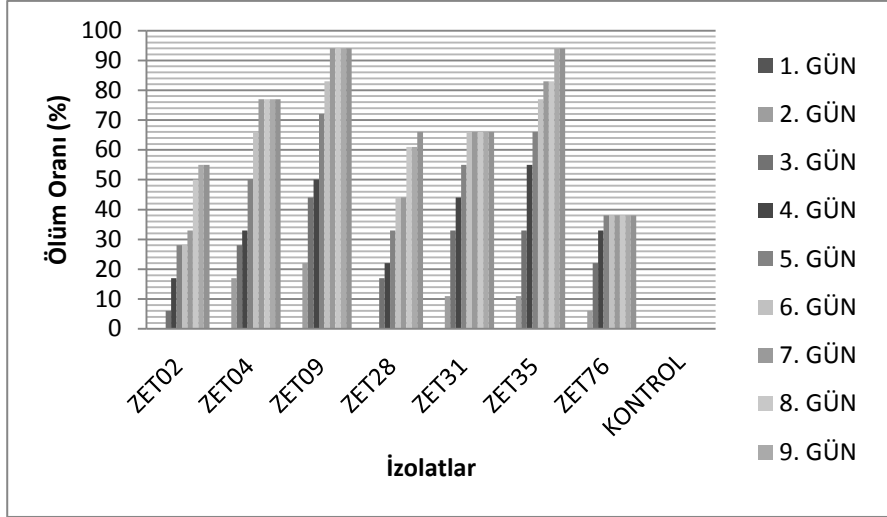
Şekil 23. İzolatların larva başına 1000 İJ/ml oranında infektif juvenillerinin 15 °C’de *M. melolontha* (Coleoptera: Scarabeidae) üzerindeki etkileri



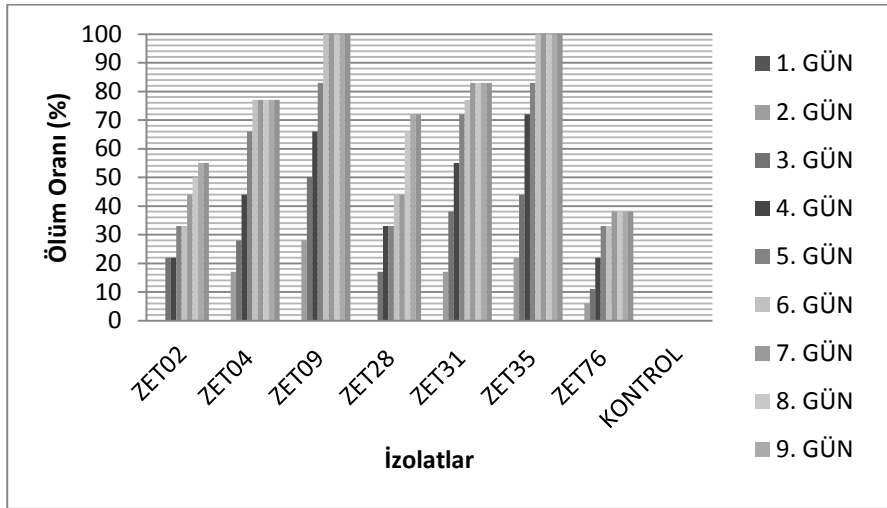
Şekil 24. İzolatların larva başına 2000 İJ/ml oranında infektif juvenillerinin 15 °C'de *M. melolontha* (Coleoptera: Scarabeidae) üzerindeki etkileri



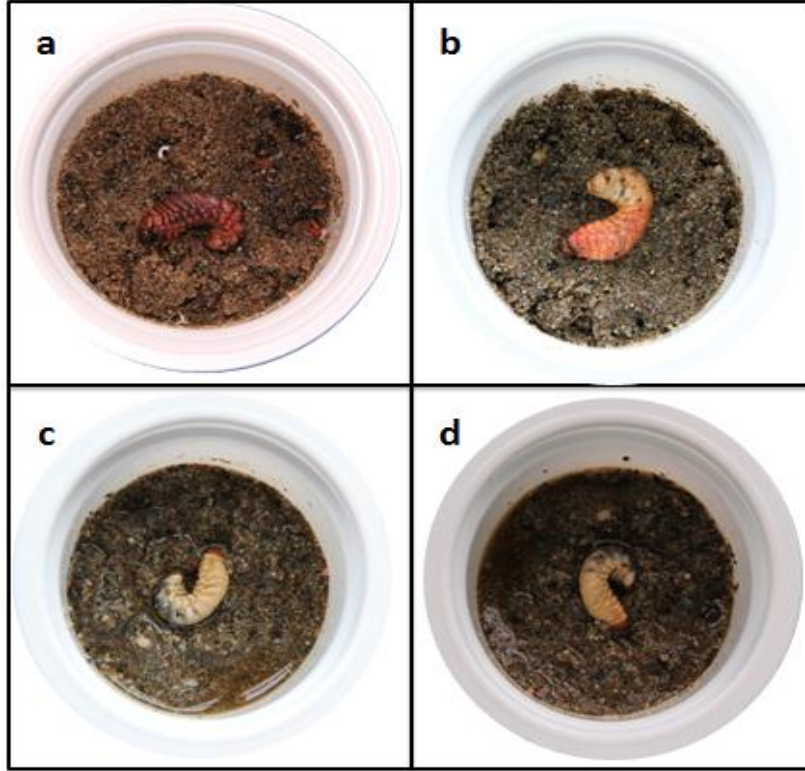
Şekil 25. İzolatların larva başına 500 İJ/ml oranında infektif juvenillerinin 25 °C'de *M. melolontha* (Coleoptera: Scarabeidae) üzerindeki etkileri



Şekil 26. İzolatların larva başına 1000 İJ/ml oranında infektif juvenillerinin 25 °C’de *M. melolontha* (Coleoptera: Scarabeidae) üzerindeki etkileri



Şekil 27 İzolatların larva başına 2000 İJ/ml oranında infektif juvenillerinin 25 °C’de *M. melolontha* (Coleoptera: Scarabeidae) üzerindeki etkileri

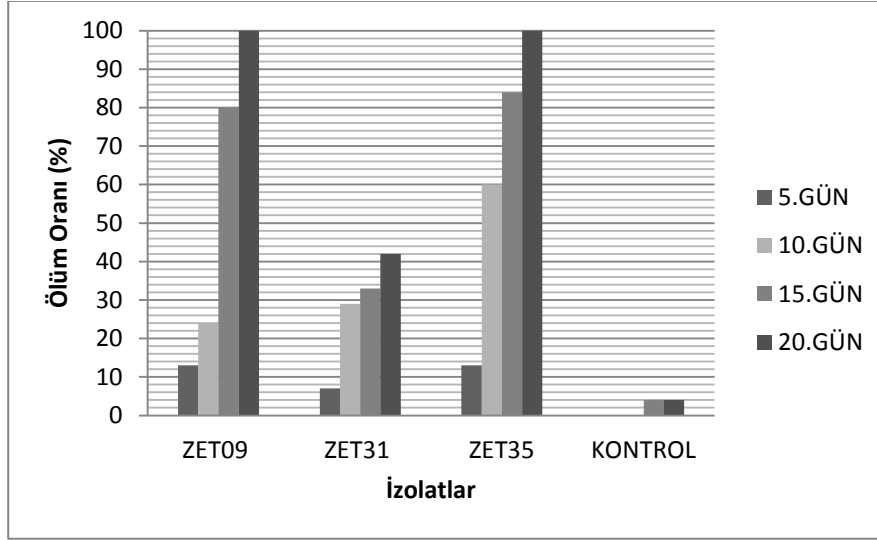


Şekil 28. Kum denemeleri sonucunda enfekte olan *M. melolontha* larvaları. a, b: *H. bacteriophora* (ZET02, ZET04, ZET09, ZET28, ZET35) ile enfeksiyon sonucunda kırmızı olan larvalar; c, d: *S. feltiae* (ZET31, ZET76) ile enfeksiyon sonucunda kahverengi olan larvalar

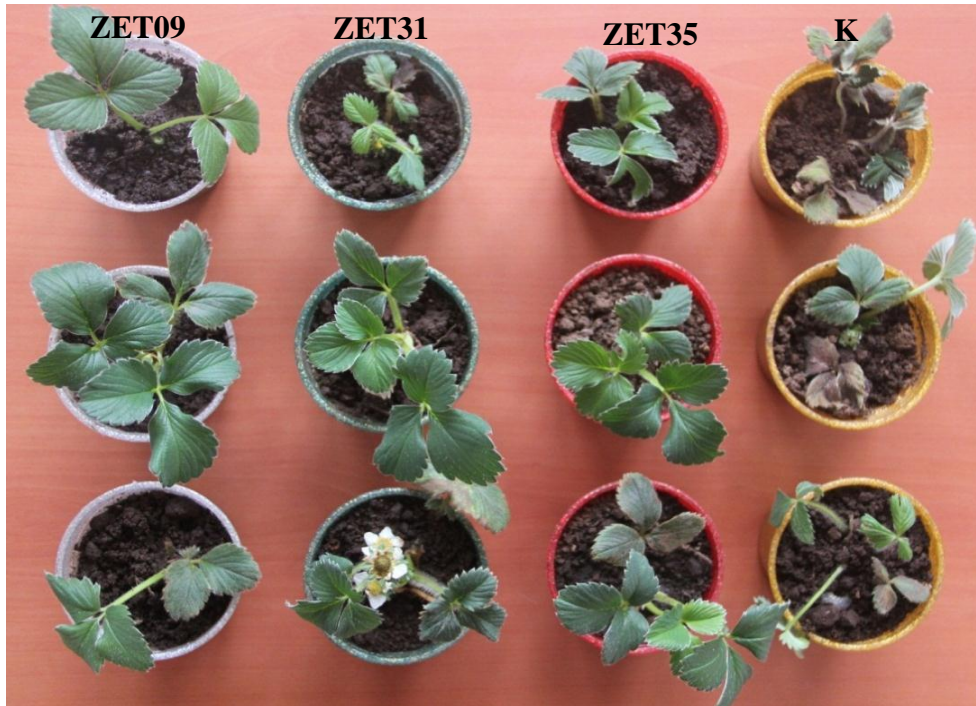
3.5.2. Saksı Denemeleri

Kum denemeleri sonucuna göre seçilen 3 izolatın *M. melolontha* üzerinde 25 °C’de, 1000 İJ/ml konsantrasyonunda yapılan saksı denemelerinin sonuçları Şekil 29’da verilmiştir. Doz denemelerinde yüksek etki gösteren ZET09 ve ZET35 (*H. bacteriophora*) izolatları saksı denemelerinde de yüksek ölüm oranı (%100) belirlenmiştir. ZET31 izolatı ise (*S. feltiae*) %58 etki göstermiştir. Saksı denemelerinde kontrol grubundaki çilek fideleri uygulamadan 20 gün sonra kururken, yüksek oranda etki gösteren ZET09 ve ZET35 numaralı izolatların uygulandığı saksılardaki çilek fidelerinin yaşamaya devam ettiği gözlemlendi. ZET31 numaralı izolatın uygulandığı saksılardaki fideler de ise kısmi ölümler ve fidelerde zayıflamalar tespit edildi (Şekil 30). Uygulama sonunda sökülen fidelerin kökleri incelendiğinde nematod böcek ilişkisi ve bu ilişkinin fideler üzerindeki etkileri de açık bir şekilde gözlemlendi (Şekil 31). Kontrol grubundaki fidelerin kökleri larvalar tarafından tamamen tüketilirken, ZET09 ve ZET35 numaralı izolatların uygulandığı fidelerin köklerinde herhangi bir tahribat meydana gelmediği tespit edildi. Nematod uygulanan

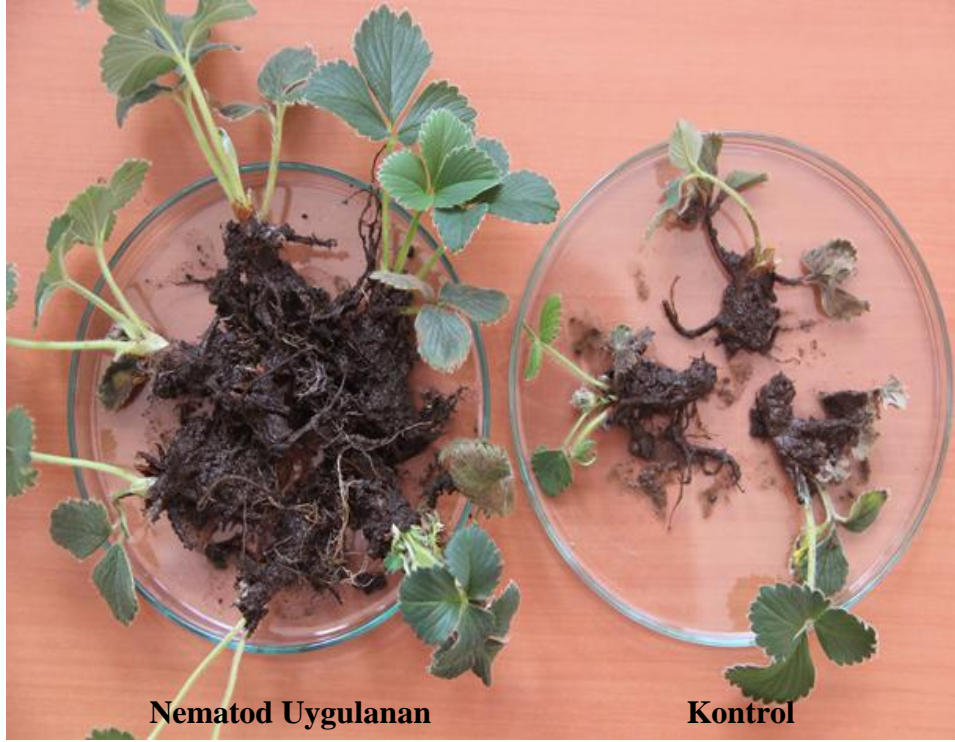
saksılardan çıkarılan ölü *M. melolontha* larvalarının ölüm şekilleri, ölümün nematodlardan kaynaklandığını ortaya koymuştur (Şekil 32.



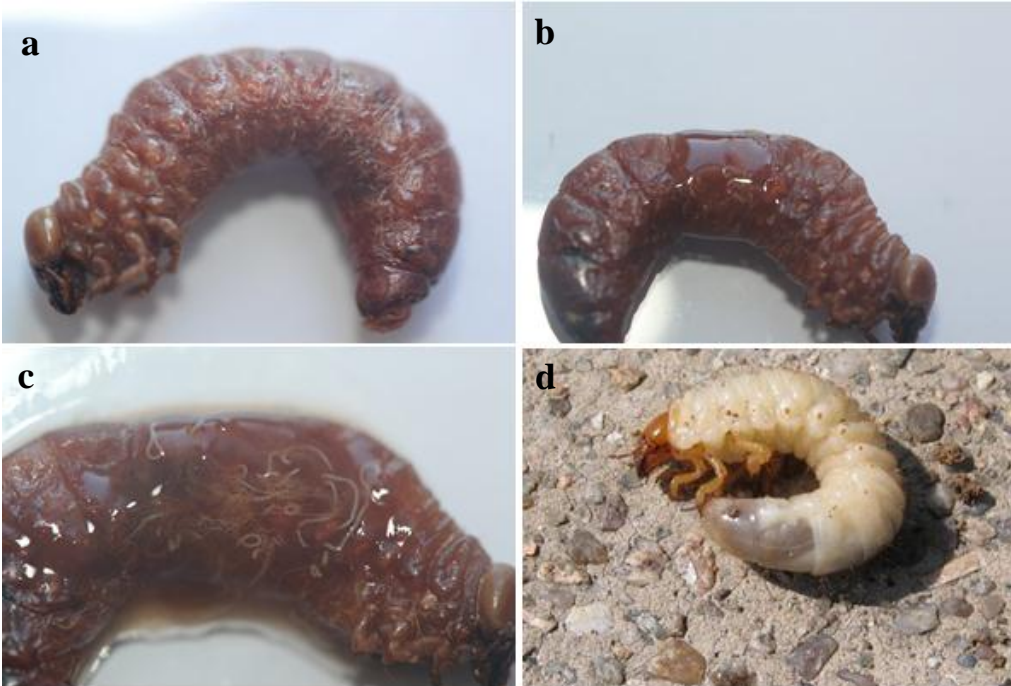
Şekil 29. Üç izolatın (1000 İJ/ml) saksı denemelerinde *M.melolontha* larvaları üzerindeki etkileri



Şekil 30. Saksı denemeleri sonucu nematod uygulanan grubun ve kontrol grubunun karşılaştırılması. ZET09: *H. bacteriophora*; ZET31: *S. feltiae*; ZET35: *H. bacteriophora*; K: Kontrol grubu



Şekil 31. Saksı denemelerinde nematod uygulanan ve uygulanmayan grupların köklerinin karşılaştırılması



Şekil 32. *H. bacteriophora* (ZET35) izolatının enfekte ettiği *M. melonantha* larvaları. a, b: Enfekte olan larvalar; c: Nematodun kadavra içindeki görüntüsü; d: Canlı larva

4. TARTIŞMA

21. yüzyılda zararlı böceklerle mücadelede, kimyasal ilaçların yerini biyolojik mücadele materyalleri almaktadır. Entomopatojen nematodların (Steinernematidae ve Heterorhabditidae) geniş bir konak dağılımına ve öldürücü özelliğe sahip olmaları onların potansiyel birer biyolojik mücadele etmeni olarak bu materyaller arasında düşünölmelerini sağlamıştır. Entomopatojen nematodlar kimyasal ve mikrobial insektisitlerin etkin olarak uygulanmalarının zor olduğu toprak ortamında bulunmaktadır. Toprak, kullanılan zararlı böcek predatörleri ve parazitleri için penetrasyonu engelleyici bir bariyer özelliği gösterir. Entomopatojen nematodların doğal yaşam ortamı toprak olduğu için böyle bir bariyer onlar için söz konusu değildir. Özellikle hayatlarının en az bir evresini toprakta geçiren zararlı böcek grupları üzerinde nematodların etkili olduğu bilinmektedir.

Bu tez kapsamında, Doğu Karadeniz Bölgesi Trabzon ili ve ilçelerinden alınan toprak örneklerinden elde edilen entomopatojen nematodları izole etmek, tanımlamak ve bölgede etkili önemli zararlılardan biri olan *Melolontha melolontha* üzerindeki insektisidal etkilerini belirlemek amaçlanmıştır. Böylece, özellikle tarım alanlarında zarar yapan böceklere karşı etkili ve güvenilir bir şekilde kullanılabilcek bir biyolojik mücadele etmeni tespit edilmesi hedeflenmiştir.

Yakın bir gelecekte bu nematodların uygulama alanlarının genişletilmesi ve etkinliklerinin daha da artırılması amacıyla çalışmalar sürdürölmektedir. Yeni nematod türleri ve izolatları bulunmakta, bunların gelişim aşamaları ve ekolojik özellikleri araştırılmaktadır. Bu patojenlerin hareketli olmaları, konağını aktif olarak aramaları, dar bir konak spektrumuna sahip olmaları ve uygun olmayan koşullara kolayca uyum sağlamaları gibi özellikleri ihtiva etmeleri, onları biyolojik mücadelede önemli bir etmen yapmaktadır. Bu sayede dünyada entomopatojen nematodlara olan ilgi artmakta ve mücadelede aktif olarak kullanılmaktadırlar.

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. Böylece belirli koşullarda ve

belirli zararlılara karşı yapılacak mücadelede en etkili ve uygun nematodu tespit etmek çalışmalarda esastır.

Çalışma genelinde Trabzon ili ve ilçelerinden rastgele belirlenen değişik habitatlardaki tarım alanlarından toprak örnekleri alındı. Alınan toprak örneklerinden entomopatojen nematodlar izole edildikten sonra bunların karakterizasyonları yapıldı ve *M. melolontha* üzerindeki insektisidal etkileri belirlendi.

Toplam 77 toprak örneğinden 7 tane entomopatojen nematod izole edildi. Böylece örneklerde ortaya çıkan izolasyon oranı %9'un üzerinde kaydedildi.

Dünyanın birçok yerinde yürütülen çeşitli çalışmalarda entomopatojen nematodların çalışılan toprak örneklerinde bulunma oranları İskoçya'da %2,2 (Boag vd., 1992), Türkiye'de %2 ve %4,72 (Hazır vd., 2003b; Özer vd., 1995), Portekiz'de %3,9 (Rosa vd., 2000), Kore'de %4,6 (Choo vd., 1995), İtalya'da %5 (Ehlers vd., 1991), Etiyopya'da %6,9 (Nguyen vd., 2004), Belçika'da %8,47 (Miduturi vd., 1997), Endonezya'da %11,7 (Griffin vd., 2000), Kosta Rika'da %20,5 (Lorio vd., 2005), Arizona'da %23,3 (Stock ve Gress, 2006), Amerika'da %26,3 (Stock vd., 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 vd., 1999).

Yapılan bu çalışmada alınan 77 toprak örneğinden izole edilen entomopatojen nematodların tamamı tarım alanlarından elde edildi. *Steinernema* türleri deniz seviyesinden ziyade daha çok yüksek bölgelerden izole edilirken, *Heterorhabditis* türleri hem deniz seviyesine yakın bölgelerden hem de daha yüksek bölgelerden de izole edilmiştir. Bu sonuçlar tüm dünyada olduğu gibi (Steiner, 1996) *Steinernema* türlerinin yükseklerde bulunduğunu göstermiştir. Ayrıca, *Heterorhabditis* türlerinin ise genelde daha sıcak alanlardan, tropik bölgelerden ve özellikle kıyıya yakın bölgelerden soğuk bölgelere kadar farklı kesimlerden elde edilen bir tür (Griffin vd., 1991; Hara vd., 1991; Hominick vd., 1996; Constant vd., 1998) olduğunu ortaya koymuştur.

Toprak örneklerinin alındığı bölgelerdeki rakımın türlerin dağılımında çok önemli olmadığı belirtilmektedir. *Steinernema* izolatlarının bir kısmı deniz seviyesinde bir kısmı da deniz seviyesinden daha yükseklerde, ormanlık alanlarda tespit edilirken, *Heterorhabditis* izolatları ise genelde deniz seviyesinde, sahil kenarlarında ve dere yataklarına yakın kumsal alanlarda tespit edilmektedir (Stock vd., 1999; Rosa vd., 2000).

Bu çalışmada alınan toprak örnekleri, deniz seviyesinden iç kesimlere kadar farklı yüksekliklerdeki farklı tarım alanlarından alındı. Bu çalışmalar sonucunda, deniz seviyesindeki entomopatojen nematod çeşitliliğinin yüksek rakıma gidildikçe arttığı gözlenmiştir. Bunun sebebi, deniz seviyesindeki alanlarda yerleşim yerleri olduğundan dolayı tür çeşitliliği için yaşam alanlarının kısıtlanması, tarım alanlarının yerleşim yerlerinde yok denecek kadar az olması ve çevre tahribatı olarak gösterilebilir. Aksine Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki zengin ekosistemin, tür çeşitliliği üzerinde olumlu etkisinin de olduğu düşünülmelidir.

Günümüzde ribozomal RNA üzerindeki ITS bölgeleri karşılaştırılarak tespit edilen 25.000 nematod türünün moleküler karakterizasyonları 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, 2004b).

Bu tez çalışmasında elde edilen 7 tane entomopatojen nematodun DNA izolasyonu yapıldıktan sonra ribozomal bölgelerde bulunan ve 18S, 5,8S ve 28S baz dizilerini içeren ITS gen bölgeleri uygun primerler ile çoğaltıldı. PCR ile çoğaltılan bu gen bölgelerinin yapılan dizi analizleri sonucunda tespit edilen 7 tane entomopatojen nematodun 5'inin *H. bacteriophora*, 2'sinin *S. feltiae* olduğu belirlendi.

Trabzon yöresindeki en yaygın entomopatojen nematod türlerinin *H. bacteriophora* ve *S. feltiae* olduğu tespit edilmiş ve 7 pozitif örneğin tamamını bu türler oluşturmuştur.

Türkiye'deki en yaygın entomopatojen nematod türü *S. feltiae*'dir ve bunu *H. bacteriophora* takip etmektedir. Bu iki entomopatojen nematod türü dünyadaki en yaygın türlerdir (Hominick vd., 1996). Örneğin *S. feltiae* Hawaii (A.B.D) gibi tropik bölgelerden, Avrupa'nın en soğuk iklimlerine kadar her yerden izole edilmiştir (Hominick vd., 1996). *S. feltiae* tropik bölgelerden de elde edilmiş olmasına rağmen, bu nematod türü soğuk iklim bölgelerine adapte olmuş bir tür olarak kabul edilmektedir (Wright, 1992). Hominick ve arkadaşlarının (1996) belirttiği gibi *S. feltiae*'nin küresel bir dağılım göstermesinin nedeni, bu türün ya etkin bir dağılım göstermesi ya da kıtalar ayrılmadan önce ortaya çıkmış tarihi bir tür olmasıdır.

Çalışmada tespit edilen türlerin ülkemizdeki ilk tespitleri 1995 yılında başlayan ve farklı bölgelerde yürütülen araştırmalarla olmuştur. Ülkemizde entomopatojen nematodlarla ilgili yapılan ilk çalışma Özer ve arkadaşlarının (1995) yapmış olduğu araştırmadır. Bu çalışma süresince aldıkları 106 toprak örneğinden 5 tane izolat 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 vd., 1996). Diğer dört *Steinernema* izolatu ise sadece cins düzeyinde tanımlanmıştır (Hazır vd., 2003b).

Kepenekçi ve arkadaşları 1999 yılında yaptıkları çalışmada Ekecik (Aksaray) kışlağında topladıkları kımıllarda *H. bacteriophora*'yı tespit ettiler. Susurluk vd., (2001), yürüttükleri çalışmada *H. bacteriophora* türüne ait entomopatojen nematodlar izole ettiler. Trabzon ilinin özellikle sahil yerlerinden alınan toprak örneklerinden *H. bacteriophora* izole edilmiş olması bu türün kıyıya yakın ve sıcak bölgelere adapte bir tür olduğunu bir kez daha göstermektedir.

S. feltiae türü dünyadaki en yaygın entomopatojen nematod türü olarak kabul edilmektedir. Türkiye'den ilk izole edilen entomopatojen nematod türü de *S. feltiae*'dir (Özer vd., 1995). Hazır ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan çalışmada elde edilen 17 *Steinernema*'nın 10 tanesinin *S. feltiae* türüne ait olduğu bulunmuş ve bunun Türkiye'deki en yaygın tür olduğu belirtilmiştir.

Steinernema feltiae tüm Avrupa'da kaydedilmiş bir türdür. Kuzey Avrupa'da da bu tür genellikle en sık rastlanan türdür (Griffin vd., 1991; Boag vd., 1992; Vainio vd., 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 ve 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 vd., 1998), soğuk bölgelere kadar (Hominick vd., 1996) yayılım gösterebilmektedir.

Türkiye'de İç Anadolu bölgesi hariç tutulursa, elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora* izolatlarının hepsinin sıcak iklim bölgelerinden elde edildiği belirtilmektedir (Hazır vd., 2002). Gelişim sıcaklığı temel alınması durumunda *H. bacteriophora*'nın

tropikal ve subtropikal bölgelere daha iyi adaptasyon sağladığı saptanmıştır (Grewal vd., 1994). Ancak, ılıman iklim bölgesi olarak kabul edilen Macaristan'dan da elde edildiği bilinmektedir (Mracek ve Jenser, 1988; Griffin vd., 1999).

Türkiye'de bugüne kadar yapılan çalışmalarda elde edilen *Heterorhabditis*'lerin çoğu *H. bacteriophora* türüne aittir (Hazır vd., 2003, Susurluk vd., 2001). *S. feltiae* gibi *H. bacteriophora* da dünyanın en yaygın entomopatojen nematod türlerinden biridir. Trabzon ilinin iklim şartları dikkate alındığında izole edilen entomopatojen nematodların çoğunun *H. bacteriophora* türüne ait olmaları daha önceki çalışmaları desteklemektedir. Tüm bu çalışmaların yakın zamanda olması, ülkemizde entomopatojen nematod çalışmalarının az olması bu alanın gelecek vaat eden bir bilim dalı olduğunu göstermektedir.

Saf kültürleri elde edilen bakteri türlerinin tanımlamaları yapıldı. Sonuçlara göre tespit edilen bakterilerin iki tanesi *Xenorhabdus bovienii* ve beş tanesinin ise *Photorhabdus luminescens* olduğu tespit edildi. Bu bakterilerin birden fazla nematod türü ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Fakat, bir nematod türü sadece bir tür bakteriyle ilişkili olduğundan bulunan sonuçlar literatür ile karşılaştırıldı.

Tür tayinleri yapılan 7 tane entomopatojen nematodun, *Melolontha melolontha* üçüncü evre larvaları üzerindeki etkisi farklı dozlarda (500, 1000 ve 2000 İJ/ml) ve farklı sıcaklık derecelerinde (15 ± 1 °C ve 25 ± 1 °C) uygulanarak tespit edildi.

Laboratuar çalışmalarında, Adi Mayıs böceğinin mücadelesinde en etkili nematod türü *Steinernema glaseri* olarak bildirilmiştir (Peters, 2000). Berner ve Schmetter'in (2001) yürüttüğü çalışmada, Avrupa'dan izole edilen farklı *Heterorhabditis* türünün suşları (*H. bacteriophora* ve *H. megidis*) ikinci ve üçüncü evre *M. melolontha* larvalarına karşı %5-30 oranında etki olduğunu göstermiştir. *S. feltiae* suşları ise larvalar üzerinde etki göstermemiştir (%0-3).

Laznik ve arkadaşlarının (2009) yaptığı çalışmada *S. feltiae* türüne ait iki izolatın *M. melolontha* üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Suşlar iki farklı sıcaklıkta (20 °C ve 25 °C) 3 farklı doz (750, 1500 ve 3000 İJ/ml) kullanılarak zararlı üzerinde test edildi. Araştırmacılar, yaptıkları çalışmalarda, 20 °C'de daha az etkili sonuç elde ettiler. En yüksek dozda en yüksek etkiyi 20 °C'de *S. feltiae* C76 suşu (%52,67) göstermiştir. Bizim çalışmamızda ise *S. feltiae* türüne ait iki suştan (ZET31 ve ZET76) ZET31'in (2000İJ/ml) 25 °C'de *M. melolontha* üzerinde en yüksek etkiye sahip olduğu ve bu etkinin de %83 olduğu tespit edildi.

Saringer ve arkadaşları (1997) yaptıkları çalışmada, laboratuvar denemelerinde *H. bacteriophora* HH ve *S. feltiae* izolatlarının *M. melolontha* üzerinde %100 oranında etki gösterdiğini saptadılar. Alan denemelerinde 1000 gr toprakta 10 larva üzerinde 10.000 İJ/g toprak konsantrasyonunda *H. bacteriophora* HH izolatı %45, 1000 İJ/g toprak konsantrasyonunda ise %20 oranında etki tespit edilmiştir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada, *H. bacteriophora* ZET09 ve ZET35 izolatları laboratuvar koşullarında %100 etki göstermiştir. Aynı şekilde saksı denemelerinde de bu izolatlar 80 g toprakta 1000 İJ/ml konsantrasyonunda %100 etkili olmuştur.

Toprak sıcaklığının da nematodun etkinliğini etkilediği düşünülmektedir. Genel olarak yüksek sıcaklıklarda nematodun hayatta kalması azalırken, düşük sıcaklıklarda nematodun aktivitesi ve enfektivitesi artmaktadır. Birçok entomopatojen nematodun uygulandığı elverişli toprak sıcaklığın 12 ile 28 °C arasında olduğu düşünülmektedir. Toprak sıcaklığı 28 °C'den daha yüksek olursa uygulama öncesi genellikle sıcaklığı azaltmak için sulama yapılması tavsiye edilmektedir (Grewal vd., 1994). Grewal vd. (1994) tarafından yapılan bu çalışmada uygulamaların %20'si 12 °C'nin altındaki toprak sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Toprak sıcaklığındaki minimum sıcaklık 5 °C'dir. Fakat *S. feltiae* ve *H. bacteriophora* bu alanlarda 12 ay süreyle bu sıcaklıkta uygulanırken, *H. bacteriophora* 22 ay süreyle 17,5 °C'de püskürtüldü. Bu çalışma sonucunda *S. feltiae*'nin daha uzun kalıcılık için *H. bacteriophora*'nın ise daha yüksek sıcaklıklarda daha uygun olduğu belirtilmiştir. Bizim yapmış olduğumuz çalışma sonucunda da ise hem *S. feltiae* hem de *H. bacteriophora* izolatlarının 25 °C'de konaklar üzerindeki öldürücü etkisi 15 °C'ye göre daha yüksek bulunmuştur.

Georgis ve Gaugler (1991), sıcaklık ve böceğin hayat döngüsü gibi çoğu durumlarda uygun olmayan suşların seçilmesinin, Scarabaeidae familyasına ait böceklerin mücadelesinde entomopatojen nematodların etkisiz olduğunu belirtmiştir. Birçok araştırmacı bu familyaya ait zararlıların mücadelesinde en etkili suşların *H. bacteriophora* GPS11 (%83-96), *H. zealandica* X1 (96-98) ve *S. scarabaei* (%100) (Cappaert ve Koppenhöfer, 2003; Koppenhöfer ve Fuzy, 2003; Grewal vd., 2004) olduğunu belirtmiştir. Yapmış olduğumuz denemeler sonucunda *S. feltiae*'nin *M. melolontha* üzerinde düşük sıcaklıkta etkili olamamasının bu türün suşlarının bu zararlının mücadelesinde etkili olmadığını ortaya koymuştur.

Entomopatojen nematodların büyük bölümü farklı gruplardan birçok böceği konak olarak kullanabilme özelliği taşımaktadır. *S. carpocapsae*'nin farklı ordolardan 250'nin

üzerinde böcek türünü enfekte ettiği bilinmektedir (Poinar, 1979). *S. scarabei* gibi bazı entomopatojen nematodlar ise sadece bir tek grup üzerinde patojenite gösterebilmektedir (Koppenhöfer ve Fuzy, 2003).

Steinernema feltiae'nin konak dağılımına bakıldığında bu türün sadece belli bir grup üzerinde patojenite göstermeyip, farklı familyalardan böceklerde enfeksiyon oluşturduğu belirlenmiştir. *Heterorhabditis bacteriophora*'nın ise geniş bir konak dağılımı gösterdiği bilinmektedir (Khan vd., 1976; Poinar, 1979; Koppenhöfer, 2000).

Nematodların farklı konak bulma stratejileri vardır. Türe özgü olarak nematodlarda farklı konak arama davranışları bulunmaktadır. 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 yakınlardan geçmesini beklerler. Bu iki tip davranışın dışında her iki davranışı da gösterebilen bir ara grup mevcuttur. Bu guruba giren nematodlar duruma göre konaklarını aktif olarak ararlar ya da otur ve bekle yöntemini kullanırlar (Lewis vd., 2006). *S. feltiae* grubu (İJs uzunlukları 700 µm-1000 µm) "intermediate" olarak adlandırılan bu son grup içerisinde yer almaktadır. Bunlar toprak partikülleri üzerinde "niktasyon hareketi" yapmakta ancak sıçrayamamaktadır. Bu nedenle *S. feltiae*'nin daha çok toprak yüzeyine yakın yerlerde bulunan konaklar üzerinde etkili bir nematod türü olduğu düşünülmektedir.

Yapılan laboratuvar denemelerinde, *Heterorhabditis bacteriophora*'nın iyi bir biyolojik mücadele etmeni olabilecek potansiyel gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durum özellikle toprak içerisinde larva ya da pupa şeklinde kışı geçiren böcek türleri üzerinde, etkin bir biyolojik mücadele sağlayacaktır. Ancak, saha uygulamalarında, toprak ekosistemindeki karmaşık abiyotik ve biyotik etkileşimler nedeniyle, farklı sonuçların alınabileceği unutulmamalıdır.

Molyneux (1986), Heterorhabditid ve Steinernematid'lerin birçok izolatu ile yaptığı çalışmada steinernematidlerin düşük sıcaklık derecelerinde konakları bulup enfekte etmede daha aktif olduklarını ortaya koymuştur. Buna paralel olarak kuzey-batı Avrupa'da heterorhabditidlerin nadiren bulunuşu düşük sıcaklığın bu grup üzerinde sınırlayıcı bir faktör olduğunu göstermiştir. Bütün bu bilgiler doğrultusunda steinernematidlerin heterorhabditidlere oranla düşük sıcaklıklara daha iyi adapte olduğu ve canlılıklarını sürdürmede daha başarılı oldukları söylenebilmektedir (Mracek ve Webster, 1993). Bu bilgi,

Heterorhabditis bacteriophora izolatlarımızın 25 ± 1 °C’de 15 ± 1 °C’ye göre daha yüksek ölüm oranına sahip olmasını desteklemektedir.

Pek çok çalışmada nematodların izole edildikleri bölgenin iklimik özellikleriyle bu nematodların büyüebildikleri uygun sıcaklık aralıkları arasında bir korelasyon bulunduğunu göstermiştir (Molyneux, 1985; Kung vd., 1991). Türkiye 7 farklı coğrafik bölgeye sahip olup bölgeler arasında büyük iklimsel farklılıklar bulunmaktadır. Türkiye’de daha önce yapılan araştırmalarda *Steinernema feltiae*, *Steinernema kraussei*, *Steinernema affine*, *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema anatoliense*, *Heterorhabditis megidis* ve *Heterorhabditis bacteriophora* türleri izole edilmiştir (Yılmaz vd., 2009, Özer vd., 1995; Susurluk vd., 2001; Hazır vd., 2003b). Bunlar içerisinde *Steinernema feltiae* ve *Steinernema affine* dışındakiler sıcak iklime adapte olan türlerdir.

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 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 vd., 1999; Boemare, 2002). Buradan da anlaşılacağı üzere *Xenorhabdus bovienii* türü bakteriler diğer *Xenorhabdus* türlerine oranla yüksek sıcaklıklara karşı daha az tolerans göstermektedir. Bu nedenle *X. bovienii* için soğuğa adapte nematodların simbiyontu adı verilmektedir (Boemare ve Akhurst, 1988; Boemare, 2002). *Heterorhabditis bacteriophora*’nın mutualistik ilişkili olduğu *Photorhabdus luminescens* bakterisi ise 35-39 °C’ye kadar üreyebilmektedir.

Doğal yaşam alanı toprak olan, önemli kayıplara neden olan yüzlerce zararlıyı rahatlıkla baskı altına alan, çevreye, doğal dengeye ve hedef olmayan diğer organizmalara zararlı etkisi bulunmayan entomopatojen nematodlar son yıllarda artan önemleri ile zararlılarla mücadele edebilen en önemli biyolojik mücadele etmenleri olmuştur. Sahip

olduğu birçok avantajı ile kimyasal mücadeleye en güzel alternatiflerden biri entomopatojen nematodlardır.

Bu çalışmada elde edilen türler zararlılara karşı biyolojik mücadelede kullanılabilme ihtimali olan, zararlılarla mücadelede başarılı sonuçlara sahip önemli entomopatojen nematod türleridir.

5. SONUÇ

Bu çalışma sonucunda Trabzon yöresinden alınan toprak örneklerinden entomopatojen nematod izole edildikten sonra, bunların tanımlanmaları, karakterizasyonları ve *Melolontha melolontha* üzerindeki etkileri tespit edildi.

Gerçekleştirilen bu tez çalışması sonucunda Trabzon yöresinden alınan 77 toprak örneğinden 7 tane entomopatojen nematod izole edildi. Böylece örneklerde gerçekleşen izolasyon sıklığı yaklaşık %9'dur.

Alınan 77 toprak örneğinden izolasyonu yapılan entomopatojen nematodlardan tamamı ekili tarım arazilerinden elde edildi.

Elde edilen 7 tane entomopatojen nematodun morfolojik ve moleküler özellikleri dikkate alınarak elde edilen sonuçlara göre *Heterorhabditis* ve *Steinernema* cinslerine ait olduğu belirlendi.

Morfolojik, morfometrik ve moleküler verilerin bir arada değerlendirilmesi sonucunda elde edilen *Heterorhabditis* cinsine ait nematodların *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema* cinsine ait nematodların ise *Steinernema feltiae* olduğu tespit edildi.

Tanımlanması yapılan 7 tane entomopatojen nematodun aralarındaki akrabalık derecelerini tespit etmek için MEGA 5.05 Filogenetik Ağaç Programı ile filogenetik ağaç grafiği çizildi.

Akrabalık dereceleri belirlenen entomopatojen nematodlarla simbiyotik yaşayan bakterilerin izolasyonu yapıldı.

Saf kültürleri elde edilen bakterilerin türlerinin belirlenmesi için yapılan moleküler çalışmaların sonucuna göre tespit edilen bakterilerin iki tanesinin *Xenorhabdus bovienii* ve beş tanesinin ise *Photorhabdus luminescens* olduğu tespit edildi.

İzole edilen 7 tane entomopatojen nematodun, *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabeidae) üzerindeki etkisi farklı konsantrasyonlarda ve sıcaklıkta test edildi.

İnsektisidal aktivite çalışmaları sonucunda 25 °C'de ölüm oranının 15 °C'ye göre daha yüksek olduğu belirlendi.

İzolatlar ile yapılan testlerin sonuçlarına göre *Melolontha melolontha* üzerinde özellikle *H. bacteriophora* izolatlarının en yüksek etkiyi 25 °C'de gösterdiği gözlemlendi (%77-100).

Kum denemeleri sonucunda etkili olan üç izolatın (ZET09, ZET31 ve ZET35) *M. melolontha* üzerindeki etkisini belirlemek için saksı denemeleri yapıldı.

Yapılan saksı denemeleri sonucunda *M. melolontha* üzerinde yine *H. bacteriophora* suşlarının en yüksek etkiyi gösterdiği tespit edildi (%100).

Tüm analiz ve değerlendirmeler sonucunda *Heterorhabditis bacteriophora*'ya ait ZET09 ve ZET35 numaralı izolatlarının *Melolontha melolothna* larvalarına karşı mikrobiyal mücadele etmeni olarak kullanılabilceği gösterilmiş oldu.

6. ÖNERİLER

Ormanlarımızın ve tarım bitkilerimizin sağlığını etkileyen çeşitli faktörler arasında böceklerin en başta geldiği kabul edilmektedir. Sarf edilen tüm çabalara rağmen orman ağaçlarımızın ve tarım bitkilerimizin yaprak, çiçek, tomurcuk, meyve, gövde ve kökleri sürekli olarak böcekler tarafından büyük zarar görmektedir.

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.

Zararlı böceklerle mücadelede kimyasal insektisitlere en iyi alternatif biyoinsektisitlerdir. Bu noktada biyolojik mücadele için en çok kullanılan mikroorganizmalardan birisi entomopatojen nematodlardır.

Çalışmada elde edilen sonuçların değerlendirilmesi noktasında ileriye dönük katkıların arttırılabilmesi için aşağıdaki hususlar dikkate alınmalıdır.

1. Bölgede daha geniş coğrafi alanlar belirlenerek farklı ekolojik özelliklere sahip sahalardan örneklemeler yapılarak tür çeşitliliği arttırılabilir.
2. Entomopatojen nematod izolasyonunda *G. mellonella* larvaları dışında farklı gruplara ait konaklar kullanılabilir.
3. İzolatların bölgede yaygın olan farklı toprak altı zararlılarına karşı insektisidal aktiviteleri test edilebilir.
4. İzolatların sera koşullarında *M. melolontha* üzerindeki etkinliği test edilebilir.
5. İzolatların insektisidal aktiviteleri üzerine toprak abiyotik özelliklerinin etkileri belirlenebilir.

7. KAYNAKLAR

- Adams, B.J., Fodor, A., Koppenhöfer, H.S., Stackebrandt, E., Stock, S.P. ve Klein, M.G., 2006. Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens, Biological Control, 37, 32-49.
- Adams, B.J. ve Nguyen, K.B., 2002. Taxonomy and systematics. In: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology, CABI Publishing, Wallingford, UK, 1-33.
- Akhurst, R.J. ve Boemare, N.E., 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In: Gaugler, R. and Kaya, H.K. (Eds.), Entomopathogenic Nematodes in Biological Control, CRC Press, Boca Raton, Florida, 75-90.
- Akhurst, R.J., 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*, Journal of General Microbiology, 121, 303-309.
- 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.
- Alpaslan, A., 2003. Non-tüberküloz mikobakteri infeksiyonlarında laboratuvar tanı ve duyarlılık testleri, 21. yüzyılda tüberküloz sempozyumu ve II. tüberküloz laboratuvar tanı yöntemleri kursu, Samsun.
- Ansari, M.A., Tirry, L. ve Moens, M., 2003. Entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria for the biological control of *Hoplia philanthis* (Coleoptera : Scarabaeidae), Biological Control, 28, 1, 111-117.
- Artyukhovsky, A.K., 1967. *Neoplectana arenaria* nov. sp. (Steinernematidae, Nematoda) inducing nematode disease in chafers of the Voronezh region, Trudy Voronezhskogo Gosudarstvennogo Zapovednika, 15, 94-100.
- Barbercheck, M. E. ve Duncan, L., 2004. Abiotic Factors. In: Gaugler, R., and Bilgrami, A.L. (Eds.), Nematode Behaviour, CABI, Wallingford, UK, 309-345.
- Bedding, R.A. ve Akhurst, R.J., 1975. Simple technique for detection of insect parasitic Rhabditid nematodes in soil, Nematologica, 21, 1, 109-110.
- Bedding, R.A., 1990. Logistics and Strategies for Introducing Entomopathogenic Nematode Technology in Developing Countries. In: Gaugler, R. and Kaya, H.K. (Eds.), Entomopathogenic Nematodes for Biological Control, CRC, Boca Raton, FL., 233-248.
- Bedding, R.A., Molyneux, A.S. ve Akhurst, R.J., 1983. *Heterorhabditis* s, *Neoplectana* s and *Steinernema kraussei*, Interspecific and Intraspecific Differences in Infectivity to Insects, Experimental Parasitology, 55, 248-257.

- Berner, M. ve Schnetter, W., 2001. Wirksamkeit entmopathogener Nematoden gegen Engerlinge der Maikäfer *Melolontha melolontha* und *M. hippocastani*, Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie, 13, 1-6, 165-167.
- Berner, M. ve Schnetter, W., 2002. Field trials with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* against with grubgs of the European cockchafer (*Melolontha melolontha*) in the southern part of Germany, IOBC/wprs bulletin, 25, 7, 29-34.
- Bleakley, B.H. ve Chen, X., 1999. Survival of insect pathogenic and human clinical isolates of *Photorhabdus luminescens* in previously sterile soil, Canadian Journal of Microbiology, 45, 273-278.
- Boag, B., Neilson, R. ve 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, CABI, Wallingford, UK, 35-57.
- Boemare, N., Laumond, C. ve 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. ve Akhurst, R.J., 1988. Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), Journal of General Microbiology, 134, 751-761.
- Boemare, N.E., Boyergiglio, M.H., Thaler, J.O. ve 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.
- Bornstein-Frost, S., Kiger, H. ve Rector, A., 2005, Impacts of fluctuating temperature on the development and infectivity of entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* A10, Journal of Invertebrate Pathology, 88, 147-153.
- Bovien, P., 1937. Some types of association between nematodes and insects, Videnskabelige Meddeleser fra Dansk Naturhistorisk Forening Kobenhaven, 101, 1-114.
- Brown, I.M., Lovett, B.J., Grewal, P.S. ve Gaugler, R., 2002. Latent infection: a low temperature survival strategy in steinernematid nematodes, Journal of Thermal Biology, 27, 531-539.
- Brunel, B., Givaudan, A., Lanois, A., Akhurst, R.J. ve Boemare, N.E., 1997. Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes, Applied and Enviromental Microbiology, 63, 574-580.

- Burnell, A.M. ve Stock, S.P., 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts lethal pathogens of insects, Nematology, 2, 31-42.
- Cabanillas, H.E., Poinar, G.O. ve Raulston, J.R., 1994. *Steinernema riobravis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Texas, Fundamental and Applied Nematology, 17, 123-131.
- Campbell, J.F., Lewis, E.E., Stock, S.P., Nadler, S. ve Kaya, H.K., 2003. Evolution of host search strategies in entomopathogenic nematodes, Journal of Nematology, 35, 2, 142-145.
- Campbell, L.R. ve Gaugler, R., 1991. Role of the sheath in desiccation tolerance of 2 entomopathogenic nematodes, Nematologica, 37, 3, 324-332.
- Cappaert, D.C. ve Koppenhöfer, A.M., 2003. *Steinernema scarabaei*, an entomopathogenic nematode for control of the European chafer, Biological Control, 28, 379-386.
- Chen, S., Li, J., Han, X. ve 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. ve Moens, M., 2006. A new entomopathogenic nematode, *Steinernema hebeiense* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae), from North China, Nematology, 8, 563-574.
- Chitwood, B.G. ve Chitwood, M.B., 1937. An Introduction to Nematology. Monumental Printing Company, Baltimore, Maryland, 213 pp.
- Choo, H.Y., Kaya, H.K. ve Stock, P., 1995. Isolation of Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Korea, Japanese Journal of Nematology, 25, 44-51.
- Ciche, T.A. ve 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.
- Ciche, T.A., Darby, C., Ehlers, R.U., Forst, S. ve Goodrich-Blair, H., 2006. Dangerous liaisons: The symbiosis of entomopathogenic nematodes and bacteria, Biological Control, 38, 1, 22-46.
- Constant, P., Marchay, L., Fischer-Le-Saux, M., Briand-Panoma, S. ve 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.

- Cutler, G.C. ve Stock, S.P., 2003. *Steinernema websteri* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from China, Nematol. Medit., 31, 215-224.
- Delbeke, F., Vercruyse, P., Tirry, L., De Clercq, P. ve Degheele, D., 1997. Toxicity of diflubenzuron, pyriproxyfen, imidacloprid and diafenthiuron to the predatory bug *Orius laevigatus* (Het.: Anthocoridae), Entomophaga, 42, 3, 349-358.
- Doucet, M.M.A., 1986. A new species of *Neoplectana* Steiner, 1929 (Nematoda: Steinernematidae) from Cordoba, Argentina, Revue de Nematologie, 9, 317-323.
- Doucet, M.M.A. ve Doucet, M.E., 1990. *Steinernema ritteri* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) with a key to the species of the genus, Nematologica, 36, 257-265.
- Edgington, S., Buddie, A.G., Tymo, L., Hunt, D.J., Nguyen, K.B., France, A.I., Merino, L.M. ve 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. ve 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., Stoessel, S. ve Wyss, U., 1990. The influence of phase variants of *Xenorhabdus* spp. And *Escherichia coli* (Enterobacteriaceae) on the propagation of entomopathogenic nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis*, Revue de Nematologie, 13, 417-424.
- Elawad, S., Ahmad, W. ve Reid, A., 1997. *Steinernema abbasi* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) from the Sultanate of Oman, Fundamental and Applied Nematology, 20, 433-442.
- Filipjev, I.N., 1934. Eine neue art der gattung *Neoplectana* Steiner nebst Bemerkungen über die systematische Stellung der letzteren, Magasin de parasitologie de l'Institut zoologique des Sciences de l' USSR, IV. 229-240.
- Finnegan, M.M., Downes, M.J., O'Regan, M. ve Griffin, C.T., 1999. Effect of salt and temperature stresses on survival and infectivity of *Heterorhabditis* ÏJs, Nematology, 1, 69-78.
- Fischer-Le Saux, M., Arteaga-Hernandez, E., Mracek, Z. ve 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.

- Fischer-Le Saux, M., Mauleon, H., Constant, P., Burnel, B. ve Boemare, N.E., 1998. PCR-ribotyping of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* isolates from the Carribean region in relation to the taxonomy and geographic distribution of their nematode hosts, Applied and Enviromental Microbiology, 64, 4246-4254.
- Forst, S. ve 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. ve 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, CABI Publishing, Wallingford, UK, 9-10.
- Georgis, R. ve Gaugler, R., 1991. Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes, Journal of Economic Entomology, 84, 3, 713-720.
- Georgis, R. ve Manweiler S.A., 1994. Entomopathogenic Nematodes: A Developing Biological Control Technology, Agricultural Zoology Reviews, 6, 63-94.
- Gerritsen, L.J.M., Wieggers, G.L. ve Smits, P.H., 1998. Selection of entomopathogenic nematodes for improved pathogenicity against grubs, IOBC bulletin, 21, 4, 167-171.
- Glaser, R.W., 1932. Studies on *Neoaplectana glaseri*, a nematode parasite of the Japanese beetle *Popillia japonica*, NJ Dept. Agriculture, Circ. No., 211.
- Glaser, R.W. ve Farrel, C.C., 1935. Field experiments with the Japanese beetle and its nematode parasite, J. NY Entomol. Soc., 43, 345-371.
- Glazer, I., 2002. Survival Biology. In: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology, CABI, Wallingford, UK, 169-187.
- Gouge, D.H., Lee, L.L. ve Henneberry, T.J., 1999. Effect of temperature and lepidopteran host species on entomopathogenic nematode (Nematoda: Steinernematidae, Heterorhabditidae) infection, Environmental Entomology, 28, 5, 876-883.
- Gouge, D.H., Smith, K.A., Payne, C., Lee, L.L., VanBerkum, J.R., Ortega, D. ve Henneberry, T.J., 1997. Control of pink bollworm *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae) with biocontrol and biorational agents, In Proceedings Beltwide Cotton Conferences, 1066 -1072.
- Gouge, D.H. ve Synder, J.L., 2006. Temporal association of entomopathogenicnematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) and bacteria, Journal of Invertebrate Pathology, 91, 147-157.
- Grant, J. A ve Villani, M.G., 2003. Soil Moisture effects on entomopathogenic nematodes, Environmental Entomology, 32, 1, 80-87.

- Grewal, P.S., Gaugler, R. ve Lewis, E.E., 1993. Host recognition behavior by entomopathogenic nematodes during contact with insect gut contents, Journal of Parasitology, 79, 495-503.
- Grewal, P.S., Ehlers, R.U. ve Shapiro-Ilan, D.I., 2005. Nematodes as Biocontrol Agents, CABI Publishing, Wallingford, UK, 505.
- Grewal, P.S., Power, K.T., Grewal, S.K., Suggars, A. ve Haupricht, S., 2004. Enhanced consistency in biological control of white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) with new strains of entomopathogenic nematodes, Biological Control, 30, 73-82.
- Grewal, P.S., Selvan, S. ve Gaugler, R., 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment, and reproduction, Journal of Thermal Biology, 19, 245-253.
- Griffin, C.T., 1993. Temperature responses of entomopathogenic nematodes: implications for the success of biological control programmes. In Bedding, R., Akhurst, R., Kaya, H. (Eds.). "Nematodes and the biological control of insects", CSRIO Publications, East Melbourne: Australia, 115-126.
- Griffin, C.T., Chaerani, R., Fallon, D., Reid, A.P. ve 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. ve Downes, M.J. 1999. Isolation and characterisation of *Heterorhabditis s* (Nematoda : Heterorhabditidae) from Hungary, Estonia and Denmark, Nematology, 1, 321-332.
- Griffin, C.T., Moore, J.F. ve Downes, M.J., 1991. Occurrence of insect parasitic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae) in the Republic of Ireland, Nematologica, 37, 92-100.
- Hara, A.H., Gaugler, R., Kaya, H.K. ve Lebeck, L.M., 1991. Natural populations of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) from the Hawaiian islands, Environmental Entomology, 17,211-216.
- Hazır, S., 2002. Türkiye'deki Entomopatojenik Nematodlar (Steinernematidae ve Heterorhabditidae) Üzerine Faunistik Çalışmalar, Doktora Tezi H. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Hazır, S., Keskin, N., Stock, P., Kaya, H.K. ve Özcan S., 2003b. Diversity and distribution of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Turkey, Biodiversity and Conservation, 12, 375-386.
- Hazır, S., Stackebrandt, E., Lang, E., Schumann, P., Ehlers, R-U. ve Keskin, N., 2004. Two new subspecies of *Photorhabdus luminescens*, isolated from *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae): *Photorhabdus luminescens* subsp. *kayaii* subsp. nov. and *Photorhabdus luminescens* subsp. *thraciaensis* subsp. nov., Systematic and Applied Microbiology, 27, 36-42.

- Hazır, S., Stock, S.P. ve Keskin, N., 2003a. A new entomopathogenic nematode, *Steinernema anatoliense* n. sp (Rhabditida : Steinernematidae), from Turkey, Systematic Parasitology, 55, 3, 211-220.
- Hominick, W.M. ve 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, CABI Publishing, Wallingford, UK, 115-143.
- 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. ve Yoshida, M., 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions, Journal of Helminthology, 71, 4, 271-298.
- Hominick, W.M., Reid, A.P., Bohan, D.A. ve Briscoe, B.R., 1996. Entomopathogenic Nematodes-Biodiversity, Geographical Distribution and the Convention on Biological Diversity, Biocontrol Science and Technology, 6: 317-331.
- Immaraju, J.A., Paine, T.D., Bethke, J.A., Robb, K.L. ve 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. ve Gordon, R., 1998. Effects of propagation temperatures on temperature tolerance of entomopathogenic nematodes, Fundamental and Applied Nematology, 21, 2, 177-183.
- Jagdale, G.B., Grewal, P.S. ve Salminen, S.O., 2005. Both heat-shock and coldshock influence trehalose metabolism in an entomopathogenic nematode, Journal of Parasitology, 91, 5, 988-994.
- Jian, H., Reid, A.P. ve Hunt, D.J. 1997. *Steinernema ceratophorum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from north-east China, Systematic Parasitology, 37, 2, 115-125.
- Kahel-Raifer, H. ve Glazer, I., 2000. Environmental factors affecting sexual differentiation in the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*, Journal of Experimental Zoology, 287, 158-66.
- Kakulia, G. ve Mikaia, N., 1997. New species of the nematode *Heterorhabditis poinari* sp. nov. (Rhabditida: Heterorhabditidae) H. Kakulia and N. Mikaia, Bulletin of the Georgian Academy of Science, 155, 457-459.
- Kaya, H.K. ve Gaugler, R., 1993. Entomopathogenic nematodes, Annual Review of Entomology, 38, 181-206.

- Kaya, H.K. ve Stock, S.P., 1997. Techniques in insect nematology. In: Manual of Techniques in Insect Pathology, Lacey, L. (Ed.), Academic Press, San Diego, 281-324.
- 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., 2002. Natural enemies and other antagonists. In: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology, CABI, Wallingford, UK, 189-203.
- Kepekçi, İ., Babaroğlu N., Öztürk G. ve Halıcı S., 1999. Türkiye için yeni bir entomopatojen nematod *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae), 4. Biyolojik Mücadele Kongresi Bildirileri, Adana, 587-596.
- Khan, A., Brooks, W.W. ve Hirschmann, H., 1976. *Chromonema heliothidis* n. Gen., n. Sp. (Steinernematidae, Nematoda), a parasite of *Heliothis zea* (Noctuidae, Lepidoptera), and other insects, Journal of Nematology, 8, 159-168.
- Klein, M.G., 1990. Efficacy Against Soil-Inhabiting Insect Pests. In: Gaugler, R. ve Kaya, H.K. (Eds.), Entomopathogenic Nematodes in Biological Control, Boca Raton, FL: CRC Press., 195-214.
- Koppenhöfer, A.M. ve Kaya, H.K., 1999. Ecological characterization of *Steinernema rarum*, Journal of Invertebrate Pathology, 73,120-128.
- Koppenhöfer, A.M. ve 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. ve Kaya, H.K., 1999. Ecological characterization of *Steinernema rarum*, Journal of Invertebrate Pathology, 73,120-128.
- Koppenhöfer, A.M., 2000. Nematodes. In: Lacey, L.A. ve Kaya, H.K. (Eds.), Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, Dordrecht, The Netherlands, Kluwer, 283-301.
- Kung, S.P. ve Gaugler, R., 1990. Soil type and entomopathogenic nematode persistence, Journal of Invertebrate Pathology, 55, 401-406.
- Kung, S.P., Gaugler, R. ve 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. ve Vail, P., 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future?, Biological Control, 21, 3, 230-248.
- Laznik, Z., Toth, T., Lakatos, T., Vidrih, M. ve Trdan, S., 2009. Efficacy of two strains of *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Rhabditida: Steinernematidae) against third-stage

- larvae of common cockchafer (*Melolontha melolontha* [L.], Coleoptera, Scarabaeidae) under laboratory conditions, Acta Agriculturae Slovenica, 93, 3, 293-299.
- Lee, M.M., Sicard, M., Skeie, M. ve 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. ve 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., Campbell, J., Griffin, C., Kaya, H.K. ve Peters, A., 2006. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes, Biological Control, 38, 66-79.
- Liu, J., 1994. A new species of the genus *Heterorhabditis* from China (Rhabditida: Heterorhabditidae), Acta Zootaxonomica Sinica, 19, 268-272.
- Liu, J. ve Berry, R.E., 1996. *Heterorhabditis marelatus* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Oregon, Journal of Invertebrate Pathology, 67, 48-54.
- Liu, J., Poinar, G.O. ve 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. ve 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. ve Stock, S.P., 2005. First Record of Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Costa Rica, Journal of Invertebrate Pathology, 88, 226-231.
- Lorio, L.U., Mora, M. ve 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.
- Luc, P.V., Nguyen, K.B., Reid, A.P. ve Spiridonov, S.E., 2000. *Steinernema tami* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Cat Tien Forest, Vietnam, Russian Journal of Nematology, 8, 33-43.
- Malan, A.P., Nguyen, K.B., De Waal, J.Y. ve 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.

- Molyneux, A.S., 1985. Survival of infective juveniles of *Heterorhabditis* spp., and *Steinernema* spp. (Nematoda: Rhabditida) at various temperatures and their subsequent infectivity for insects, Revue de Nematologie, 8, 165-170.
- Molyneux, A.S., 1986. *Heterorhabditis* s and *Steinernema* (*Neoplectana*) spp: temperature, and aspects of behavior and infectivity, Experimental Parasitology, 62, 169-180.
- Morgan, E.H., Remillard, R.A. ve Greiner, J., 1997. ApJ 482, 993-1010.
- Mracek, Z. ve Jenser, G., 1988. First report of entomogenous nematodes of the families Steinernematidae and Heterorhabditidae from Hungary, Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica, 23, 153-156.
- Mracek, Z. ve Webster, J.M., 1993. Survey of Steinernematidae and Heterorhabditidae (Rhabditida: Nematoda) in western Canada, Journal of Nematology, 25, 710-717.
- Mráček, Z., Hernandez, E.A. ve 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.
- Mracek, Z., 1980. The Use of *Galleria* Traps for Obtaining Nematode Parasites of Insects in Czechoslovakia (Lepidoptera: Nematoda, Steinernematidae), Acta Entomology Bohemoslovaca, 77, 378-382.
- Mráček, Z., Becvar, S. ve 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., Sturhan, D. ve Reid, A. 2003. *Steinernema weiseri* n. sp (Rhabditida, Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Europe, Systematic Parasitology, 56, 1, 37-47.
- Mráček, Z., Nguyen, K.B., Tailliez, P., Boemare, N. ve 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.
- Mracek, Z., Liu, Q.Z. ve Nguyen, K.B., 2009. *Steinernema xueshanense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematode from the province of Yunnan, southeast Tibetan Mts., China, Journal of Invertebrate Pathology, 102, 1, 69-78.
- Nagarkatti, S., Muza, A.J., Saunders, M.C. ve 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. ve 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. ve Smart, G.C., 1990. *Steinernema scapterisci* n. sp. (Steinernematidae: Nematoda), Journal of Nematology, 22, 187-199.
- Nguyen, K.B. ve 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. ve Smart, G.C., 1994. *Neosteinernema longicurvicauda* n. Gen., n. Sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a parasite of the termite *Reticulitermes flavipes* (Koller), Journal of Nematology, 26, 162-174.
- Nguyen, K.B., Malan, A.P. ve Gözel, U., 2006a. *Steinernema khoisanae* n. sp (Rhabditida : Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa, Nematology, 8, 157-175.
- Nguyen, K.B., Qiu, L.H, Zhou, Y. ve Pang, Y., 2006b. *Steinernema leizhouense* sp n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from southern China, Russian Journal of Nematology, 14, 2, 101-118.
- Nguyen, K.B., Puza, V. ve Mracek, Z., 2008a. *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., Shapiro-Ilan, D. ve Mbata, G., 2008b. *Heterorhabditis georgiana* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Georgia USA, Nematology, 10, 433-448.
- 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., Tesfamariam, M., Gözel, U., Gaugler, R. ve Adams, B.J., 2004a. *Steinernema yirgalemense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Ethiopia, Nematology, 6, 6, 839-856.
- Nguyen, K.B., Shapiro-Ilan, D.I., Stuart, R.J., McCoy, C.W., James, R.R. ve Adams, B.J., 2004b. *Heterorhabditis mexicana* n. sp (Rhabditida : Heterorhabditidae) from Tamaulipas, Mexico, and morphological studies of the bursa of *Heterorhabditis*, Nematology, 6, 231-244.
- Nguyen, K.B., Stuart, R.J., Andalo, V., Gözel, U. ve 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., Pears, F.B. ve 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 and Biotechnology, 17, 5, 505-515.
- Özer N., Keskin, N. ve Kırbaş, Z., 1995. Occurrence of Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae) in Turkey, Nematologica, 41, 639-640.
- Peters, A. ve Ehlers, R.U., 1997. Encapsulation of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* in *Tipula oleracea*, Journal of Invertebrate Pathology, 69, 3, 218-222.
- Peters, A., 2000. Susceptibility of *Melolontha melolontha* to *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. megidis* and *Steinernema glaseri*, IOBC/wprs bulletin, 23,8, 39-45.
- Peters, A., 2004. Bekämpfung von Scarabaeiden mit entomopathogenen Nematoden: Möglichkeiten und Grenzen, Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes, 56,5, 99-102.
- Phan, K.L., Nguyen, N.C. ve Moens, M. 2001. *Steinernema loci* sp n. and *Steinernema thanhi* sp n. (Rhabditida : Steinernematidae) from Vietnam, Nematology, 3, 503-514.
- Phan, L.K., Takemoto, S. ve Futai, K., 2006a. *Steinernema ashiuense* sp n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Japan, Nematology, 8, 681-690.
- Phan, K.L., Spiridonov, S.E., Subbotin, S.A. ve Moens, M., 2006b. Four new species of *Steinemema* Travassos, 1928 with short infective juveniles from Vietnam, Russian Journal of Nematology, 14, 1, 11-29.
- Phan, K.L., Tirry, L. ve Moens, M., 2005. Pathogenic potential of six isolates of entomopathogenic nematodes (Rhabditida : Steinernematidae) from Vietnam, Biocontrol, 50, 3, 477-491.
- Plichta, K.L., Joyce, S.A., Clarke, D., Waterfield, N. ve 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. ve Thomas, G.M., 1967. The nature of *Achromobacter nematophilus* as an insect pathogen, Journal of Invertebrate Pathology, 9, 510-514.
- 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., 1979. Nematodes for biological control of insects. CRC Press, Boca Raton, FL.

- Poinar, G.O., 1985. *Neoaplectana intermedia* n. sp. (Steinernematidae: Nematoda) from South Carolina, Revue de Nematologie, 8, 321-327.
- Poinar, G.O., Karunakar, G.K. ve David, H., 1992. *Heterorhabditis indicus* n. sp. (Rhabditida: Nematoda) from India: separation of *Heterorhabditis* spp. by infective juveniles, Fundamental and Applied Nematology, 15, 467-472.
- Qiu, L.H., Fang, Y.Y., Zhou, Y., Pang, Y. ve 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.
- Qiu, L., Yan, X., Zhou, Y., Nguyen, K.B. ve Pang, Y., 2005a. *Steinernema aciari* sp n. (Nematoda : Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Guangdong, China, Journal of Invertebrate Pathology, 88, 1, 58-69.
- Qiu, L., Hu, X, Zhou, Y., Mei, S., Nguyen, K.B. ve Pang, Y., 2005b. *Steinernema akhursti* sp n. (Nematoda : Steinernematidae) from Yunnan, China. Journal of Invertebrate Pathology, 90, 3, 151-160.
- Qiu, L., Hu, X., Zhou, Y., Pang, Y. ve Nguyen, K.B., 2005c. *Steinernema beddingi* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Yunnan, China, Nematology, 7, 5, 737-749.
- Roman, J. ve Figueroa, W., 1994. *Steinernema puertoricensis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) a new entomopathogenic nematode from Puerto Rico, Journal of Agriculture, University of Puerto Rico, 7, 167-175.
- Rosa J.S., Bonifassi E., Amaral J., Lacey L.A., Simoes N. ve Laumond C., 2000. Natural Occurrence of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: *Steinernema*, *Heterorhabditis*) in the Azores, Journal of Nematology, 32, 2, 215-222.
- Seurat, L.G., 1914. Sur un cas d'endotokie matricide chez un Oxyure, C.-r. Séanc. Soc. Biol., 76, 850-852
- Shahina, F., Anis, M., Reid, A.P., Rowe, J. ve Maqbool, M.A., 2001. *Steinernema pakistanense* sp. N. (Rhabditida: Steinernematidae) from Pakistan, International Journal of Nematology, 11, 124-133.
- Shamseldean, M.M., Abdelgawad, M.M. ve 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.
- Shapiro-Ilan, D.I., Gouge, D.H. ve Koppenhöfer, A.M., 2002. Factors Affecting Commercial Success: Case Studies in Cotton, Turf and Citrus, In: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology, Wallingford, UK, CABI Publishing, 333-356.

- Shapiron- Ilan, D.I., Gouge, D.H., Piggott, S.J. ve Fife, J.P., 2006. Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control, Biological Control, 38, 124-133.
- Shen, C.P. ve Wang, G.H., 1991. Description and study of an entomopathogenic nematode: *Steinernema longicaudum* sp. nov., Proceedings of the First National Academy Symposium, Young and Middle Aged Science and Technology Works, Plant Protection, Chinese Science and Technology Press, Beijing, 220-231.
- Shishiniova, M., Budurova, L. ve Gradinarov, D., 1995. Contribution to the fauna of the entomopathogenic nematodes/rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae from Bulgaria II, Biotechnology and Biotechnological Equipment, 12, 104–108.
- Sicard, M., Ferdy, J.B, Pages, S., Le Brun, N., Godelle, B., Boemare, N. ve Moulia, 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.
- Somvanshi, V.S., Lang, E., Ganguly, S., Swiderski, J., Saxena, A.K. ve 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., Krasomil-Osterfeld, K. ve Moens, M., 2004a. *Steinernema jollieti* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from the American Midwest, Russian Journal of Nematology, 12, 85-95.
- Spiridonov, S.E., Reid, A.P., Podrucka, K., Subbotin, S.A. ve Moens, M., 2004b. 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. ve 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, G., 1923. *Aplectana kraussei* n. Sp., eine in der Blattwespe *Lyda* sp. parasitierende Nematodenform, nebst Bemerkungen über das Seitenorgan der parasitischen Nematoden, Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene Abteilung I Originale, 59, 14-18.
- Steiner, G., 1929. *Neoaplectana glaseri* n. g., n. sp. (Oxyuridae) a new nemtic parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newm.), Journal of the Washington Academy of Science, 19, 436-440.
- Steiner, W.A., 1996. Dispersal and host-finding ability of entomopathogenic nematodes at low temperatures, Nematologica, 42, 2, 243-261.

- Stock, S.P. ve 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. ve 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., 2005. Insect-parasitic nematodes: From lab curiosities to model organisms, Journal of Invertebrate Pathology, 89, 1, 57-66.
- Stock, S.P., Choo, H.Y. ve 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., Somsook, V. ve Reid, A.P., 1998. *Steinernema siamkayai* n. sp. (Rhabditida : Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Thailand, Systematic Parasitology, 41, 2, 105-113.
- Stock, S.P., Pryor, B.M. ve 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. ve 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., Griffin, C.T. ve 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., Rivera-Orduno, B. ve 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.
- Saringer, G.Y., Nadasy, M., Lucskai, A., Fodor, A., Budai, C.S. ve Klein, M., 1997. New possibilities of controlling larvae of Melolonthidae and Noctuidae using entomopathogenic nematodes, Zborink Predavanj in Referatov s 3, Slovenskega Posvetovanja o Varstvu Rastlin, Portoroz, 3, 215-223.
- Stuart, R.J., Barbercheck, M.E., Grewal, P.S., Taylor, R.A.J. ve Hoy, C.W., 2006. Population biology of entomopathogenic nematodes: Concepts, issues, and models, Biological Control, 38, 80-102.
- Sturhan, D., Spiridonov, S.E. ve 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. ve 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. ve 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.
- Thomas, G.M. ve Poinar, G.O., 1979. *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic and nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae, International Journal of Systematic Bacteriology, 29, 352-360.
- Thurston, G.S., Ni, Y. ve Kaya, H.K., 1994. Influence of salinity on survival and infectivity of entomopathogenic nematodes, Journal of Nematology, 26, 345-351.
- Timper, P. ve 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.
- Travassos, L., 1927. Sobre o genera *Oxysomatium*, Boletim Biologico, 5, 20-21.
- Triggiani, O., Mracek, Z. ve Reid, 2004. A., *Steinernema apuliae* sp n. (Rhabditida : Steinernematidae): a new entomopathogenic nematode from southern Italy, Zootaxa, 460, 1-12.
- URL-1, <http://classes.seattleu.edu/biology/biol235/hodin/nematodePriapulidGroup/nematodes/formAndFunction.htm>, Entomopatojen nematodların morfolojik yapıları. 19 Temmuz 2012.
- Vainio, A., Vanninen, I. ve Hokkanen, H., 1994. Isolation and screening of entomopathogenic nematodes in Finland (COST 812, 1990-1993). In: Int. Collog. Invertebr. Pathol. Microb. Control, August-September, Montpellier, France, Abstracts, 1, 267.
- Volgyi, A., Fodor, A., Szentirmai, A. Ve Forst, S., 1998. Phase variation in *Xenorhabdus nematophilus*, Applied and Enviromental Microbiology, 64, 1188-1193.
- Vrain, T.C., Wakarchuk, D.A. ve 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. ve Webster, J.M., 2003. Interaction of microbial populations in *Steinernema* (Steinernematidae, Nematoda) infected *Galleria mellonella* larvae, Journal of Invertebrate Pathology, 83, 118-126.
- Wang, Y., Campell, J.F. ve Gaugler, R., 1995. Infection of entomopathogenic nematodes *Steinernema glaseri* and *Heterorhabditis bacteriophora* against *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae, Journal of Invertebrate Pathology, 66, 178-184.

- Waturu, C.N., Hunt, D.J. ve Reid, A.P., 1997. *Steinernema kari* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Kenya, International Journal of Nematology, 7, 68-75.
- Weiser, J., 1955. *Neoaplectana carpocapsae* n. sp. (Anguillulata: Steinernematinae) a new nematode parasite of the codling moth, *Carpocapsa pomonella* L. Ves., Ceskoslovenske Spolecnosti Zool., 19, 44-52.
- Wharton, D.A. ve 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.
- White, G.F., 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures, Science, 66, 302-303.
- 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. ve 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., ve Bilgrami, A.L. (Eds.), *Nematode Behaviour*, CABI, Wallingford, UK, 177-197.
- Wright, P.J., 1992. Cool Temperature Reproduction of Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes, Journal of Invertebrate Pathology, 60, 148-151.
- Xu, F.Z., Wang, G.H. ve Li, X.F., 1991. A new Species of the Genus *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae), Zoological Research, 12, 17-20.
- Yılmaz, H., Waeyenberge, L., Demir, İ., Moens, M. ve Demirbağ, 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.
- 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. ve Zhang, K.Y., 2008. *Heterorhabditoides chongmingensis* gen. nov., sp nov (Rhabditida : Rhabditidae), a novel member of the entomopathogenic nematodes, Journal of Invertebrate Pathology, 98, 2, 153-168.

8. EKLER

Ek 1.

```
AACCTGCAGATGGATCATCGCCGAAACCTTATGGGTAATGCTTTGATCACGAGAGATCGG
TACCAATGGAATCAGGCTTGTTCTTGATTTCAATCGGTTTCTCACCCCATCTAAGCTCAT
GGAGAGGTGTCTAGTCCCAATTGGAGTCGCTTTGAGTGACGGCTATGAAAATTGGGTATG
TTCCCCGTGAGGGTTCGAGCATAGACTTTATGAACAGTGCTGGAGCTGTGCCTCACAAAA
AATCATCGATAACTGGTGGCTATGTGTGACATTAGTCACATAGGTATCTGCTGATGCAGA
GAGCCTTAATGAGTTGTTTCGTGTCATCTGACCTACAACCGCCATTGTTACCGGTAAATCA
ACCCAATTAACCTTGTTTCTTGTGTCGTGTTAATACATACTGGCAAAGTGTATTAGCTTTA
GCGATGGTCGGTTGATTTCGCGTATCGATGAAAAACGCAGCAGCTGCGTTATTTACCACGA
ATTGCAGCTTAGAGTGGTGAAGTTTTGAACGCACAGCGCCGTTGGGTTTTCCCTTCGGCA
CGTCTGGCTCAGGTTGTTTAATAAGCGAAAAGTGTGAAAGTTCATTAAACGAGAGTTCGG
TGATACTGACAACACTACGTCGAGCGGTGTACTGTTGAAAGTACCCCGTTCAAGTATCTT
TATGGGGCAACATGTCTTCTATATGGAGACATGAAAGATATTAAGAGTATAACCTGTGGA
TGCCCACGTATGAAATATGACGTGTCGTATACACGGCTAGGAGGTATGTCTCAGATGAAT
TTGTTTATGCAACCTGAGCTCAGTCGTGATTACCCGCTGAA
```

Ek 1. Şekil 1. ZET02 numaralı izolata ait rRNA ITS bölgesi dizin analizi (821 bp.)

```
TTGAACTGAACTGCAGATGGATCATCGCCGAAACCTTATGGGTAATGCTTTGATCACGAG
AGATCGGTACCAATGGAATCAGGCTTGTTCTTGATTTCAATCGGTTTCTCACCCCATCTA
AGCTCATGGAGAGGTGTCTAGTCCCAATTGGAGTATAACCGCTTTGAGTGACGGCTATGA
AAATTGGGTATGTTCCCCGTGAGGGTTCGAGCATAGACTTTATGAACAGTGCTGGAGCTGT
CGCCTCACCAAAAAATCATCGATAACTGGTGGCTATGTGTGACATTAGTCCATAGGTATC
TGCTGATGCAGAGAGCCTTAATGAGTTGTTTCGTGTCATCTGACCTACAACCGCCAGTATC
GGTAAATCAACCAATTAACCTTGTTTCTTGTGTCGTGTTAATACATACTGGCAAAGTGTA
TTAGCTTTAGCGATGGATCGGTTGATTTCGCGTATCGATGAAAAACGCAGCAAGCTGCGTT
ATTTACCACGAATTGCAGACGCTTAGAGTGGTGAAGTTTTGCGCACAGCGCCGTTGGGTT
TTCCCTTCGGCACGTCTGGCTCAGGGTAATTTAATAAGCGAAAAGTGTGAAAGTTCATTA
AACGAGAGTTCGGTGATACTGACAACACTACGTCGAGCGGTGTACTGTTGAAAGTACCC
GTTCAAGTATCTTTATGGGGCAACATGTCTTCTATATGGAGACATGAAAGATATTAAGAG
TATATACCTGTGGATGCCACGTATGAAATATGACGTGTCGTATACACGGCTAGGAGGTA
TGTCTCAGATTTGAACTG
```

Ek 1. Şekil 2. ZET04 numaralı izolata ait rRNA ITS bölgesi dizin analizi (798 bp.)

```

GGTATGCTTTGATCACGAGAGATCGGTACCAATGGAATCAGGCTTGTTCTTGATTTCAAT
CGGTTTCTCACCCCATCTAAGCTCATGGAGAGGTGTCTAGTCCCAATTGGAGTCGCTTTG
AGTGACGGCTATGAAAATTGGGTATGTTCCCCGTGAGGCCGAGCATAGACTTTTATGAACA
GTGCTGGAGCTGTCGCCTCACCAAAAAATCATCGATAACTGGTGGCTATGTGTGACATTA
GTCACATAGGTATCTGCTGATGCAGAGAGCCTTAATGAGTTGTTTCGTGTCATCTGACCTA
CAACCGCCAGTATCGGTAAATCAACCCAATTAACTTGTTTCTTGTGTGTCGTGTTAATACAT
ACTGGCAAAGTGTATTAGCTTTAGCGATGGATCGGTTGATTCGCGTATCGATGAAAAACG
CAGCAAGCTGCTTTATTTTACCACGAATTGCAGACGCTTAGAGTGGTGAAGTTTGAACG
CACAGCGAAAAAACATCGATAACTGGTGGCTATGTGGTGACATTAGTCACATAGGTTTT
CTGCTGATGCAGAGAGCCTTAATGAATTGTTTCGTGTCATCTGACCTACAACCGCCAGTAT
CGGTAAATCAACCCAATAACTTGTTTCTTGTGTGTCGTGTTAAAACATACTGGCAAAGTGT
ATTAGCTTTAGCGATGGATCGGTTGATTCGCGTATCGATGAAAAAGCAGCAAGCTGCGTT
ATTTACCACGAATTGCAGACGCTTAGAGTGGTGAAGTTTGAACCACAGCGCCGTTGGG
TTTTCCCTTCGGCACGTCTGGCTCAGGGTTGTTTAATAAGCGAAAGTGTGAAAGTTCAT
TAAACGAGAGTTCGGTGATACTGACAACACTACGTCGAGCGGTGTAAGTGTGAAAGTACC
CCGTTCAAGTATCTTTATGGGGCAACATGTCTTCTATATGGAGACATGAAAGATATTAAG
AGTATATACCTGTGGATGCCACGTATGAAATATGACGTGTCGTATACACGGCTAGGAGG
TATGTCTCAGATGAAT

```

Ek 1. Şekil 3. ZET09 numaralı izolata ait rRNA ITS bölgesi dizin analizi (1036 bp.)

```

GTTTATGGGTATGCTTTGATCACGAGAGATCGGTACCAATGGAATCAGGCTTGTTCTTGA
TTTCAATCGGTTTCTCACCCCATCTAAGCTCATGGAGAGGTGTCTAGTCCCAATTGGAGT
CGCTTTGAGTGACGGCTATGAAAATTGGGTATGTTCCCCGTGAGGGTCGAGCATAGACTT
TATGAACAGTGCTGGAGCTGTCGCCTCACCAAAAAATCATCGATAACTGGTGGCTATGTG
TGACATTAGTCACATAGGTATCTGCTGATGCAGAGAGCCTTAATGAGTTGTTTCGTGTCAT
CTGACCTACAACCGCCAGTATCGGTAAATCAACCCAATTAACTTGTTTCTTGTGTGTCGTG
TAATACATACTGGCAAAGTGTATTAGCTTTAGCGATGGATCGGTTGATTCGCGTATCGAT
GAAAAACGCAGCAAGCTGCGTTATTTACCACGAATTGCAGACGCTTAGAGTGGTGAAGTT
TTGAACGCACAGCGCCGTTGGGTTTTCCCTTCGGCACGTCTGGCTCAGGGTTGTTTAATA
AGCGAAAGTGTGAAAGTTCATTAAACGAGAGATACTGACAACACTACGTCGAGCGGTGT
ACTGTTGAAAGTACCCCGTTCAAGTATCTTTCCATT

```

Ek 1. Şekil 4. ZET28 numaralı izolata ait rRNA ITS bölgesi dizin analizi (636 bp.)

```

ATTTACTTGGATTCAATGAATCGAGCTGAATTTTCGCTGTTTCGTTTCAAAGCGTTGTATT
CTCTCAACTAACGGCTATGAATGGTTTCTATAGGTGTCTGGAGCAGTTGTATGAGCGTGA
CTGTGGTATGACATTTTGGTGGCTCCTTAGTCGGGTCAGTAAATTAAGAAGTCTGT
TATGACTCGCCGTTCTTAAAAAACTTCAATTAACGTTTGTATCAATTTGACTGCACCAGCC
GTAGGTGTACTTAAAGATTTATCAAGTCTTGTTCGGTGGATCACTCGGTTTCGTAGTTCGAT
GAAAAACGGGGCAAAAACCGTTATTTGGCGTGAATTGCAGACATATTGAACGCTAAAATT
TTGAACGCAAATGGCACTATCAGGTTTATATCTGTTAGTATGTTTGGTTGAGGGTTCGATT
AATTCGTAACCTGCAGTCTGCTGTGACTGAAAATTTTGAACGCAAATGGCACTTTCAGGT
TTATATCGTTTAGTATGTTTGGTTGAGGGTTCGATTAATTCGTAACCTGCAGTCTGCTGTG
CCTGTTTTTTTCGATAAGTTATTTGGTTTTTTATCGAGTACCTTTTTTGGAAATGTGAATTTG
ATTGTCTAATTCGTTTCCTAATCGAAACGAGCTATTTTTTTATTTCTGTGCAATGTATTTT
TGGTGTTTTCGGCGTTTTTCTTGCCGACTGATTGGTACAACTTAACAGTTCGTATATTTT
TCAGAATTTTTTCAGAGGCCCTTACAATACATCACTTGACACAACACGTATCGTTTGTCTGA
GGAATTGCGCAAGAAAGAAAC

```

Ek 1. Şekil 5. ZET31 numaralı izolata ait rRNA ITS bölgesi dizin analizi (801 bp.)

```

GTATGCTTTGATCACGAGAGATCGGTACCAATGGAATCAGGCTTGTTCTTGATTTCAATC
GGTTTCTCACCCCATCTAAGCTCATGGAGAGGTGTCTAGTCCCAATTGGAGTCGCTTTGA
GTGACGGCTATGAAAATTGGGTATGTTCCCGTGAGGGTCGAGCATAGACTTTTATGAACA
GTGCTGGAGCTGTCGCCTCACCAAAAAATCATCGATAACTGGTGGCTATGTGTGACATTA
GTCACATAGGTATCTGCTGATGCAGAGAGCCTTAATGAGTTGTTCGTGTCATCTGACCTA
CAACCGCCAGTACGGTAAATCAACCCAATTAACCTGTTTTTGTGTGCTGTTAATACCGGC
AAAGTGTATTAGCTTTAGCGATGGATCGGTTGATTTCGCGTATCGATGAAAAACGCAGCAA
GCTGCGTTATTTACCACGAATTGCAGACGCTTAGAGTGGTGAAGTTTTTGAACGCACAGCG
CCGTTGGGTTTTCCCTTCGACATACTGGCAAAGTGTATTAGCTTTAGCGATGGATCGGTT
GATTTCGCGTATCGATGAAAAACGCAGCAAGCTGCGTTATTTACCACGAATTGCAGACGCT
TAGAGTGGTGAAGTTTTTGAACGCACGCGCCGTTGGGTTTTCCCTTCGGCACGTCTGGCTC
AGGGTTGTTTAATAAGCGAAAGTGTGAAAGTTCATTAACGAGAGTTCGGTGATACTGA
CAACACTACGTCGAGCGGTGTAAGTGTGAAAGTACCCCGTTCAAGTATCTTTATGGGGCA
ACATGTCTTCTATATGGAGACATGAAAGATATTAAGAGTATATACCTGTGGATGCCACG
TATGAAATATGACGTGTCTGATACACGGCTAGGAGGTT

```

Ek 1. Şekil 6. ZET35 numaralı izolata ait rRNA ITS bölgesi dizin analizi (878 bp.)


```

TTCGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAGCTTATCCATTTACTTGGAT
TCAAATGAATCGAGCTGAATTTTCGCTGTTTCGTTTCAAAGCGTTGTATTCTCTCAACTAA
CGGCATTGAATGGTTTCTATAGGTCTGGAGCAGTTGTATGAGCGTGACTGTGTGATGGAC
ATTTTGGTGGCTCCTTAGTCGGGTCACTAGAATTAAGAAGTCTGTTATGACTCGCCGTT
CTAAAAAACTTCAATTAACGTTTGATCAATTTGACTGCACCAGCCGTAGGTGTAATTAA
AGATTTATCAAGTCTTGTCGGGGATCACTCGTTCGTAGTTCGTGAAAAACGGGGCAAAAA
CCGTTATTTGGCGTGAATTGCAGACATATTGAACGCTAAAATTTTGAACGCAAATGGCCT
ATCAGGTTTATATCTGTTAGTATGTTTGGTTGAGGGTCGATTCCATTCGTAACCTGCAGT
CTGCTGTGACTGTTTTTTTCGATTGTATTTGGTTTTTTTATCGAGTACCTTTTTTGAATGT
GAATTTGATTGTCTAATTCGTTTTCCTAATCGAAACGAGCTATTTTTTATTTCTGTGCAAT
GTATTTTTTGGTGTTCGGCGTTTTTCTTGCCGACTGATTGGTACAACTTAACAGTTCGT
ATATTTTTTCAGAATTTTTCAGAGGCCCTTACAATACATCACTTGACACAACACTATCGTT
TGTCGAGGAATTGCGCAAGAAAGAACTTTTCGTTTTACGACCTCCTCAAGCAAGATTAC
CCGCTGAACTTAAGCATAT

```

Ek 1. Şekil 7. ZET76 numaralı izolata ait rRNA ITS bölgesi dizin analizi (799 bp.)

Ek 2.

```

TTGAGTAATGTCTGGGGATCTGCCCCGAGGGCGGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAA
TACCGCATAATGTCGCGAGACCAAAGTGGGGGACCTGAAAGGGCCTCACGCCGTCCGGATG
AACCCAGATGGGATTAGCTGGTAGGTAGGGTAATGGCCTAACTAGGCGACGATCCCTAGC
TGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGCCCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATG
AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTGGAGCGGGGAGGAAGGGTTGAGCCTGAACAG
GGCTGGGCCTTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATGACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGT
CAATTAAGTTAGATGTGAATTCCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGGCATCTAAGACTGGTTG
ACTGGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGT
GGAGGAATACCGGTGGCGAACCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTT
GTGGCCCTGAGCTGTGGCTTTGGAAGCTAACCGCTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGG
CCGCAAGGTTAAAAC TCAATGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT
TTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTCTCTTGACATCCTCAGAATTTGCTGGAGA
CAGCCCGGTGCCTTCGGGAACTGAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTT
GTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGT
CGAGGTGGGAACTCCGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGATACAAAGTGAA
GCGACCTCCGAGAGCAAGCGGAACACACAAAGTCTGTCGTAGTCCGGATTGGAGTTTGCA
ACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATAC
GTTCCCGGGCCTTGTAGGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTCGGTAGC
TTAACCTTTGGAATGGAGGGCGCTGACCACTTTGTGGCTCATGAC

```

Ek 2. Şekil 1. ZET02 numaralı izolat ile simbiyotik yaşayan bakterilere ait 16 S rRNA bölgesi dizin analizi (1365 bp.)

```

TTTAACCGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCGCAAGACCAA
AGTGGGGGACCTGAAAGGGCCTCACGCCCGCGGATGAACCCAGATGGGATTAGCTGGTAG
GTAGGGTAATGGCCTACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAAGGAC
ACTGGGACTGAGACACGGTTCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAAT
GGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTA
CTTTCAGCGGGGAGGAAGGATATCGCTTGAACAGAGCGGTATRRTGACGTTACCCGGCAG
AAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGC AAGCGTTAA
TCGGAATGACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCCGTTAAGTTAGATGTGAAATCCCC
GGGCTTAACCTGGGAACGGCATCTAAGACTGGTTGGCTGGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAG
AATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGG
CCCTTTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACCTGGCAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCGGTAAACGATGTTCGATTTGGAGGTTGTTCCCTAAGAGGAG
TGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAA
CTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCTTTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAA
CGCGAAGAACCTTACCTACTTTTGACATCCTCAGAATTTGCTGGAGACAGCGAAGTGCCT
TCGGGAAGTGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACT
CAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCAGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGG
CCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGATACAAAGTGAAGCGACGTCGG
AATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA
CCGCCCGTTCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTCCGGTAGCTTAACCGTTTGGAGGGCG
CTGACCACTTTGTGATTC

```

Ek 2. Şekil 2. ZET04 numaralı izolat ile simbiyotik yaşayan bakterilere ait 16 S rRNA bölgesi dizin analizi (1278 bp.)

```

GGCATTGTTGGTGGGGGCGGCCTACACATGCAGTTCGGGCGGTAACAGGAAAGCGCTTGCCT
TTTGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTGCCCCGGGGCGGGGAT
AACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTTCGCGAGACCAAAGTGGGGGACCTGA
AAGGGCCTCACGCCGTCCGGATGAACCCAGATGGGATTAGCTGGTAGGTAGGGTAATGGCC
TACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATTACCAGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTG
ATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGACTTTCAGCGGGGAG
GAAGGGTTGAGCCTGAACAGGGCTTGGGGCCTTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCGGC
TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGAGCGTTAATCGGAATGACTGG
GCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCAATTAAGTTAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGG
GAACGGCATCTAAGACTGGTTGACTGGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCATGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAA
GACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCTGTAAACGATGTTCGATTTGGAGGTTGTGGCCCTGAGCTGTGGCTTCCGAAGCTAACG
CGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGATTGACGGGGC
CGGCACAAGCGGTGGGAGCATGGTGTTCATCGATGCAACGCGAAGTACCCGTTAACCCAT
AACATGTTCGGG

```

Ek 2. Şekil 3. ZET09 numaralı izolat ile simbiyotik yaşayan bakterilere ait 16 S rRNA bölgesi dizin analizi (972 bp.)

```

TTGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTGCCCCGAGGGCGGGGGATAAACCACTGGAAACGGTGGC
TAATACCGCATAATGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTGAAAGGGCCTCACGCCATCGG
ATGAACCCAGATGGGATTAGCTGGTAGGTAGGGTAATGGCCTACCTAGGCGACGATCTCT
AGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAGACCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAA
GAAGGTTTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGCCAGGAAGGGTTTAGCCTGAACAGGGC
TGGGATTTTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTTAAGCCACGCAGGCCCGTCA
ATTAAGTTAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATGGCATCTAAGACTGGTTGGC
TGGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGG
AGGAATAACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCG
TGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCTGCCAAACGATGTCGATTTGG
AGGTTGTGGCCTTGAGCTGTGGCTTCCGAAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAG
TACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCAT
GTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAACCCTACTCTTGACATCCTCAGAATTTGCCGGAGAC
GGCGAAGTGCCTTCGGGAACTGAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTG
TGAAATGTTGCCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGAACTCAAAGG
AGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCTACAC
ACGTGCTACAATGGCGGATACAAAGTGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGAACACACAA
AGTCTGTTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGT
AATCGTAGATCAGC

```

Ek 2. Şekil 4. ZET28 numaralı izolat ile simbiyotik yaşayan bakterilere ait 16 S rRNA bölgesi dizin analizi (1214 bp.)

```

AGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGGGGAAGCTT
GCTTCCCGCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTGCCCGATGGAGGGG
GATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAACCTCTGTGGAGTAAAGTGGGGGACC
TTCGGGCCTCACGCCATCGGATGAACCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGC
TCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGTGACTATTGCACAATGGGCGCAAGCCT
GATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGACGTTAGCGGGGAG
GAAGGCAACAGCGTAAATAGCGCTGTTGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTA
ACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGC
GTAAAGCGCACGCAGGCGGTCAATTAAGTTAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGA
ACGGCATCTAAAACCTGGTTGACTAGAGTCTCGTAGAGGAAGTAGAATTCCACGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGAC
TGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCT
GTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTT
AAATCGACCGCCTGGCGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCT
TGACTTCCTCAGAATTTGCTGGAGACAGCGAAGTGCCTTCGGGAACCTGAGAGACAGTGCT
GCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAAC
CCTTTCCTTTGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGAACCTCAAGGGAGACTGCCGGTGATAGAT
CGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACAGTAGGGCTACACACGTGC
TACAAATGGCAGATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGAACCTATAAAGTCTG
TCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGT
AGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGG
GAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGGGGGCGCTTACCACCTTGTGA
TTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTAGAGGAG

```

Ek 2. Şekil 5. ZET31 numaralı izolat ile simbiyotik yaşayan bakterilere ait 16 S rRNA bölgesi dizin analizi (1483 bp.)

```

GGTCCTGGGGATCTGCCCCGAGGGCGGGGGATAAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCA
TAATGTCGCGAGACCAAAGTGGGGGACCTGAAAGGGCCTCACGCCATCGGATGAACCCAG
ATGGGATTAGCTGGTAGGTAGGGTAACGGCCTACCTAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTG
AGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TGGGGAATATTGCACAAGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGC
CTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGATTGAGCCTGAACCAAGTTAGATT
AAGGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
GAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATGACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTGAATTAAG
TTAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATGGCATCTAAGACTGGTTGAACCTGGA
GTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGA
ATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCCCGAAAGCGTGGGGAGC
AAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGG
CCCAGAGCCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGC
AAGGTTAAAAC TCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCTCAGAATTTGCTGGAGACAG
CGTAGTGCCTTCGGGAACTGAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTT
TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGCGTGATGGC
GGGAACTCAAAGGAGGCTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCA
TCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGATACAAAGTGAAGCGA
CCTCGCGAGAGCAAGCGGAACACACAAAGTCTGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACT
CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTTT

```

Ek 2. Şekil 6. ZET35 numaralı izolat ile simbiyotik yaşayan bakterilere ait 16 S rRNA bölgesi dizin analizi (1242 bp.)

```

GCCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCCAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGGGGGGAA
GCTTGCTTCCCTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTGCCCGATG
GAGGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAACCTCTGTGGAGTAAAGTGG
GGGACCTTCGGGCCTCACGCCATCGGATGAACCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGT
AATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGA
CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC
AAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCA
GCGGGGAGCCAGGCAACAGCGTGAATAGCGCTGTTGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC
ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAAT
TACTGGGCGTAAAGCGCACGACGAGCGGTC AATTAGTTAAGATGTGAAACCAAGGGCTCAA
CCTGGGAACGGCATCTAAAACCTGGTTGACTAGCCTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAC
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGA
CGAAGACTGACGCTCAGGTGCCAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCTGTAAACGATGTTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCT
AACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAATGAATTGAC
GGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTAA
TTACTCTTGACATCCTCAGAATTTGCTGGAGACAGCGAAGTGCCTTCGGGAACTGAGAGA
CAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGAACTCAAGGGAGACTGCCG
GTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCTAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGC
TACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGAACT
CATAAAGTCTGTTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCG
CTAGTAATCGTACCTCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC
CGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGGGGGCGCT
TACCACTTTGTGATTCATGAC

```

Ek 2. Şekil 7. ZET76 numaralı izolat ile simbiyotik yaşayan bakterilere ait 16 S rRNA bölgesi dizin analizi (1461 bp.)

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Trabzon'da doğdu. 1992-1994 yılları arasında Avusturya Hans Sachs Volksschule İlk Okulu'nda, devamında 1994-2000 yılları arasında 100. Yıl İlköğretim Okulu'nda ilköğretim eğitimini tamamladı. Lise eğitimini 2000-2003 yılları arasında Trabzon Lisesi'nde tamamladı. 2004-2005 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Giresun Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde lisans öğrenimine başladı. 2008 yılında mezun oldu. 2008-2009 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı.