



**ENTOMOPATOJEN NEMATOD *Heterorhabditis*
bacteriophora HBH HİBRİT İRKİNİN *IN VIVO* VE *IN*
VITRO ÜRETİM SONRASI TOPRAKTA KALICILIK VE
DEPOLANMA SÜRESİ FARKLILIKLARININ
ARAŞTIRILMASI**

Şeyma Hümeýra ÇAKIR



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENTOMOPATOJEN NEMATOD *Heterorhabditis bacteriophora* HBH HİBRİT
IRKININ *IN VIVO* VE *IN VITRO* ÜRETİM SONRASI TOPRAKTA KALICILIK
VE DEPOLANMA SÜRESİ FARKLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI**

Şeyma Hümeýra ÇAKIR
0000-0003-3161-2117

Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

BURSA – 2022
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ENTOMOPATOJEN NEMATOD *Heterorhabditis bacteriophora* HBH HİBRİT IRKININ *IN VIVO* VE *IN VITRO* ÜRETİM SONRASI TOPRAKTA KALICILIK VE DEPOLANMA SÜRESİ FARKLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI

Şeyma Hümeysra ÇAKIR

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK

Entomopatojen Nematodlar (EPN) biyolojik mücadelede aktif rol oynayan canlılardır. EPN'ler sentetik pestisitlerin uygulama zorluğu ve çevreye karşı ciddi tehdit oluşturması sebebiyle toprak altı zararlılarına karşı en etkili çözüm yollarından biri olarak bilinmektedir. EPN'ler uygulanmadan önce belirli depolama koşullarına göre saklanmaktadır. Uygulandıktan sonra uygulandığı alanda etkinliğini azami bir süre sürdürmesi beklenmektedir. Bu tez çalışması, EPN'lerin belirlenmiş iklim şartları altında uygulandığı toprakta kalıcılığını ve depolama süresini tespit etmek amacıyla yapılmıştır. *In vivo* ve *in vitro* olarak iki farklı metotta *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit ırkı infektif juveniller (IJ)'lerin üretimi gerçekleştirilmiştir. *H. bacteriophora*'nın kalıcılığını belirlemek amacıyla *in vivo* ve *in vitro* ortamda üretimi gerçekleştirilmiş IJ'ler, 6 cm'lik petri kapları kullanılarak toprakların içerisine bırakılmış ve toprak içerisine 10'ar gün arayla *Galleria mellonella* (son dönem) larvası bırakılmıştır. İki gün sonra petri içerisindeki *G. mellonella* larvası çıkarılıp disekte edilmiştir. *G. mellonella* içerisinde gelişen IJ birey sayısı açısından *in vivo* üretim metodunun (77,2 IJ / larva) *in vitro* üretime göre (22,6 IJ / larva) daha etkili olduğu tespit edilmiştir. *In vivo* metodu ile elde edilen IJ'ler, *G. mellonella* larvalarını enfekte edebilme açısından 140 gün boyunca toprak içerisinde etkinliğini sürdürebilmiş ve IJ'lerin enfekte yeteneğinin en yüksek olduğu süre 50. gün olarak tespit edilmiştir. *In vitro* metodu ile elde edilen IJ'ler ise, *G. mellonella* larvalarını enfekte edebilme açısından 170 gün boyunca toprak içerisinde etkinliğini sürdürebilmiş ve enfekte yeteneğinin en iyi olduğu süre 40. gün olarak tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında *in vivo* ve *in vitro* ortamda üretimi gerçekleştirilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'lerin depolama koşulları test edilmiş, inkübatörde 8, 12, 16, 20 ve 24 °C sıcaklıklarda 3, 6, 9 ve 12 gün sırasıyla bekletilmiştir. Çalışma, en düşük ölüm oranı (% 0,0548), *in vivo* ortamında üretilen ve 8 °C sıcaklıkta inkübatörde 3 gün bekletilen, en yüksek ölüm oranı (% 11,238) ise *in vitro* üretimle elde edilen ve 24 °C sıcaklıkta inkübatörde 12 gün bekletilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'lerde görüldüğünü ortaya çıkarmıştır.

Anahtar Kelimeler: Entomopatojen nematod, *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit ırkı, depolanma süresi, toprakta kalıcılık, *in vivo* ve *in vitro*.

2022, ix + 52 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION ON COMPARISON OF PERSISTENCE AND STORAGE OF THE ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE *Heterorhabditis bacteriophora* HBH HYBRID STRAIN AFTER *IN VIVO* AND *IN VITRO* PRODUCTIONS.

Şeyma Hümeýra ÇAKIR

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK

Entomopathogenic nematodes (EPN) are living things that play an active role in biological control. EPNs are known as one of the most effective solutions against underground pests due to the difficulty of applying synthetic pesticides and the serious threat to the environment. EPNs are stored according to certain storage conditions before being applied. It is expected to maintain its effectiveness in the area where it is applied for a maximum period of time after application. This thesis study is carried out to determine the persistence and storage time of EPNs in the soil under predetermined climatic conditions. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH hybrid strain infective juveniles (IJ) are produced in two different methods *in vivo* and *in vitro*. To assess the persistence of *Heterorhabditis bacteriophora* HBH hybrid strain, is produced *in vivo* and *in vitro*, are filled into 6 cm petri dishes, infective juveniles (IJ) are left inside and dishes and *Galleria mellonella* (end stage) larvae are deposited into the soil at ten-day intervals. After two days, *G. mellonella* larvae in the petri dish are removed and dissected. It is determined that *in vivo* production method (77.2 IJ / larva) is more effective than *in vitro* production (22.6 IJ / larva) in terms of the number of IJ individuals developed in *G. mellonella*. The IJs obtained by the *in vivo* method are able to maintain their effectiveness in the soil for 140 days in terms of infecting *G. mellonella* larvae, and the maximum infecting ability of IJs is determined on the 50th day. The IJs obtained by the *in vitro* method, on the other hand, are able to maintain their effectiveness in the soil for 170 days in terms of infecting *G. mellonella* larvae and the best time to infect is determined as the 40th day. In this thesis, the storage conditions of *H. bacteriophora* HBH hybrid strain IJs, which are produced *in vivo* and *in vitro*, are tested and kept in an incubator at 8, 12, 16, 20 and 24 °C for 3, 6, 9 and 12 days, respectively. The study showed that the lowest mortality rate (0.0548%) is produced *in vivo* and kept in an incubator at 8 °C for 3 days, the highest mortality rate (11.238%) is obtained with *in vitro* production and kept in an incubator at 24 °C for 12 days. *H. bacteriophora* HBH is found in hybrid strain IJs.

Key words: Entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hybdid strain, persistence in the soil, storage period, *in vivo* ve *in vitro*.

2022, ix + 52 pages.

ÖNSÖZ VE/VEYA TEŞEKKÜR

Eğitim sürecimde bilgi birikiminden yararlandığım, üzerinde gerçek manada emeği olup yardımlarını esirgemeyen ve her konuda bana destek olan Saygıdeğer danışman Hocam Sayın Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Alanımla ilgili birçok konuda yardımcı olan Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Hocalarına, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Tufan Can Ulu (Şeyh Edebali Üniversitesi)’ya, Doktora öğrencisi Büşra Sadıç’a, Bursa Uludağ Üniversitesi Nematoloji Laboratuvarında ve tezimde yardımlarını esirgemeyen Sayın Araş. Gör. Yavuz Selim Şahin (Bursa Uludağ Üniversitesi)’e teşekkürlerimi sunarım.

Tezim esnasında tarafıma burs imkanı sağlayan Tübitak 219O370 No’lu projeye teşekkür ederim.

Bana yol gösterici olan aynı zamanda maddi ve manevi her türlü desteği benden esirgemeyen canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını, eğitimimizi her daim destekleyen biricik babamız Mustafa ÇAKIR’a armağan ediyorum.

Şeyma Hümeysra ÇAKIR
.../.../.....

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE/VEYA TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	7
2.1. <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HBH Hibrit Irkının Toprakta Kalıcılığı Üzerine Çalışmalar.....	7
2.2. <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HBH Hibrit Irkının Depolama Süresi Çalışmaları	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	13
3.1. Materyal.....	13
3.1.1. <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> izolat ve ırkı.....	13
3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar ve malzemeler	13
3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve besin maddeleri	14
3.1.4. Çalışmada kullanılan yapay ortamlar	14
3.2. Yöntem	16
3.2.1. <i>Galleria mellonella</i> üretimi	16
3.2.2. <i>Galleria mellonella</i> için besin ortamı hazırlanması	19
3.2.3. <i>Galleria mellonella</i> 'nın yaşam döngüsü	19
3.2.4. <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HBH Hibrit ırkının <i>in vivo</i> koşullarda üretimi ...	20
3.2.5. <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HBH Hibrit ırkının <i>in vitro</i> koşullarda üretimi ..	22
3.2.6. Simbiyont bakteri <i>Photorhabdus</i> spp.'nin izolasyonu	23
3.2.7. Stok bakteri kültürü hazırlanması	27
3.2.8. <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HBH Hibrit ırkının yumurta izolasyonu	28
3.2.9. J1'lerin katı agar ortamına aktarılması.....	34
3.3. <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HBH Hibrit Irkının Toprakta Kalıcılığı.....	37
3.4. <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HBH Hibrit Irkının Depolanma Süresi	41
3.5. İstatistiksel Analizler	42
4. BULGULAR	43
4.1. <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HBH Hibrit Irkının Toprakta Kalıcılığı	43
4.2. <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HBH Hibrit Irkının Depolanma Süresi	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	51
KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ.....	59

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
cm	Santimetre (1×10^{-2})
cm ²	Santimetrekare (1×10^{-4} m ²)
cm ³	Santimetreküp
°C	Santigrat derece (Celcius)
g	Gram
ml	Mililitre (1×10^3 l)
mm	Milimetre (1×10^3 m)
µl	Mikrolitre (1×10^3 ml)

Kisaltmalar	Açıklama
dk	Dakika
EPN	Entomopatojen Nematod
IJ	İnfektif Jüvenil
J1	Birinci Dönem Juvenil
J2	İkinci Dönem Jüvenil
J3	Üçüncü Dönem Jüvenil
J4	Dördüncü Dönem Jüvenil
L.	Linnaeus
NBTA	Nutrient Bromothymol Blue Agar
Rpm	Revolutions per minute (Dakikada Devir Sayısı)
spp.	Species (çoğul)
YS	Yeast Medium (Yeast extract and salt)

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. <i>Photorhabdus</i> spp. bakterisinin mikroskop görüntüsü (Susurluk ve. Çakır,2022).....	3
Şekil 1.2. EPN'lerin genel yaşam döngüsü (Shapiro -İlan & Gaugler, 2002;... Edwin E. Lewis & Grewal, 2005; Lacey & Georgis, 2012).....	4
Şekil 3.1. Buzdolabında +4 °C'de flasklar içerisindeki depolanmış <i>Heterorhabditis</i> türleri (Susurluk ve Çakır, 2022).....	13
Şekil 3.2. <i>G. mellonella</i> 'nın yumurta ve ilk dönem larvası (Susurluk ve Çakır, 2022).....	16
Şekil 3.3. Kavanoz içerisindeki son dönem <i>G. mellonella</i> larvaları (Susurluk ve Çakır, 2022).....	17
Şekil 3.4. Besinden ayıklanmış son dönem <i>G. mellonella</i> larvaları (Susurluk ve Çakır, 2022).....	17
Şekil 3.5. <i>G. mellonella</i> pupaları (Susurluk ve Çakır, 2022).....	18
Şekil 3.6. <i>G. mellonella</i> ergin dişi (Susurluk ve Çakır, 2022).....	18
Şekil 3.7. Ringer Solüsyonu hazırlamak için gerekli kimyasallar ve Ringer Solüsyonu (Susurluk ve Çakır, 2022).....	21
Şekil 3.8. White Trap düzeneği (Susurluk ve Çakır, 2022).....	22
Şekil 3.9. Etil alkol içerisinde steril edilen <i>G. mellonella</i> larvası (Susurluk ve... Çakır, 2022).....	24
Şekil 3.10. <i>G. mellonella</i> larvasının ventralinden steril iğne ucu ile delinerek..... larvanın vücut sıvısının izolasyonu (Susurluk ve Çakır, 2022).....	25
Şekil 3.11. NBTA agar ortamına <i>Photorhabdus</i> spp. bakterisinin çizimi (Susurluk ve Çakır, 2022).....	26
Şekil 3.12. Üç gün inkübasyona bırakılan <i>Photorhabdus</i> spp. üremiş NBTA ortamı (Susurluk ve Çakır, 2022).....	26
Şekil 3.13. Steril edilmiş YS sıvısı Bakteri üremiş YS ortamı (Susurluk ve Çakır, 2022).....	27
Şekil 3.14. -20 °C'de stoklanan <i>Photorhabdus</i> spp. bakteri kültürleri (Susurluk ve Çakır, 2022).....	28
Şekil 3.15. Enfeksiyonu başarılı olan <i>G. mellonella</i> larvaları (Susurluk ve Çakır, 2022).....	29
Şekil 3.16. Diseksiyon yöntemi ile larva içerisinden hermafrodit bireylerin ayıklanması (Susurluk ve Çakır, 2022).....	29
Şekil 3.17. A: Diseksiyon sonrası elde edilmiş ve Ringer Solüsyonu ile yıkanmış hermafrodit bireyler. B: Hermafrodit bireyler içerisinde görülen yumurtalar. C: İçerisinde yumurta ve jilet bulunan tüpün vortex ile karıştırılarak parçalanmasının sağlanması (Susurluk ve Çakır, 2022)	30
Şekil 3.18. Eppendorf tüp içerisindeki yumurtaların dibe çökmesi amacıyla santrifüj edilmesi (Susurluk ve Çakır, 2022).....	31
Şekil 3.19. Eppendorf tüpü içerisindeki kirli Ringer'in boşaltılması (Susurluk ve Çakır, 2022).....	32
Şekil 3.20. Kuyucuklu kaplara YS ve yumurta eklenmesi (Susurluk ve Çakır, 2022).....	33
Şekil 3.21. Steril edilen yumurtaların mikroskop görüntüsü (Susurluk ve Çakır, 2022).....	33
Şekil 3.22. Yumurtadan çıkan birinci dönem juveniller (Susurluk ve Çakır, 2022)	34

Şekil 3.23.	İçerisinde J1 bulunan kuyucuklu kaplar (Susurluk ve Çakır, 2022)	34
Şekil 3.24.	Bakterili Wouts Agar ortamına aktarılmaya uygun olan J1'ler (Susurluk ve Çakır, 2022).....	35
Şekil 3.25.	A. Bakteri çoğalmış olan Wouts Agar ortamına J1'lerin bırakılması.. B. Wouts Agarda üremiş olan hermafrodit bireyler C. Petri kapağının altına toplanmış IJ'ler (Susurluk ve Çakır, 2022).....	36
Şekil 3.26.	Petri kapağının altına toplanmış IJ'lerin mikroskop görüntüsü (Susurluk ve Çakır, 2022).....	37
Şekil 3.27.	Toprak neminin ölçümü (Susurluk ve Çakır, 2022).....	38
Şekil 3.28.	Sayımı gerçekleşen IJ'lerin toprağa bırakılması (Susurluk ve Çakır, 2022).....	39
Şekil 3.29.	IJ bırakılan petri kapları (Susurluk ve Çakır, 2022)	39
Şekil 3.30.	<i>G. mellonella</i> larvasının toprağa bırakılması (Susurluk ve Çakır, 2022)	40
Şekil 3.31.	İki gün sonra larvaların diseksiyonu (Susurluk ve Çakır, 2022).....	40
Şekil 3.32.	Disekte işleminden sonra mikroskopta IJ'lerin sayımı (Susurluk ve Çakır, 2022).....	41
Şekil 3.33.	A. Inverted mikroskopta IJ sayımı B. Sayım aletleri C. İnkübasyona bırakılan IJ'ler (Susurluk ve Çakır, 2022).....	42
Şekil 4.1.	<i>In vivo</i> üretim ile gerçekleştirilen IJ'lerin toprakta kalıcılık süreleri...	44
Şekil 4.2.	<i>In vitro</i> üretim ile gerçekleştirilen IJ'lerin toprakta kalıcılık süreleri..	45
Şekil 4.3.	8 °C'de IJ'lerin ölüm oranlarının karşılaştırılması..... (F= 323,01; df= 7, 32; P= <,0001).....	46
Şekil 4.4.	12 °C'de IJ'lerin ölüm oranlarının karşılaştırılması..... (F= 95,80; df= 7, 32;P= <,0001).....	47
Şekil 4.5.	16 °C'de IJ'lerin ölüm oranlarının karşılaştırılması..... (F= 46,768; df= 7, 32; P= <,0001).....	48
Şekil 4.6.	20 °C'de IJ'lerin ölüm oranlarının karşılaştırılması..... (F= 903,02; df= 7, 32; P= <,0001).....	49
Şekil 4.7.	24 °C'de IJ'lerin ölüm oranlarının karşılaştırılması..... (F= 151,54; df= 7, 32; P= <,0001).....	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. NBTA agar ortamının içeriği (Akhurst, 1980)	15
Çizelge 3.2. YS sıvı besin ortamının içeriği (Dye, 1968)	15
Çizelge 3.3. Wouts (Nutrient Lipid) agar ortamının içeriği (Wouts, 1981)	15
Çizelge 3.4. Yumurtaların steril edilmesi için kullanılan sterilizasyon solüsyonu	15
Çizelge 3.5. İJ'lerin yapay ortamı Ringer solüsyonu (Ringer, 1882)	15
Çizelge 3.6. <i>G. mellonella</i> besin ortamının içeriği (Weisner, 1993)	19



1. GİRİŞ

Tarım, dünya genelinde insanların beslenmesi ve hayatın devamlılığı için en önemli sektördür. Tarımın devamlılığı ve üretimin artırılması amacıyla konvansiyonel üretime doğru yönelim artmış, bu sebepten ötürü uzun yıllar ve bilinçsiz bir şekilde kullanılan tarımsal girdiler (kimyasal ilaçlar, gübreler vs.) ile geri dönülemeyecek ciddi hasarlar ortaya çıkmıştır. Araştırmalar neticesinde kimyasal mücadelenin zararlarını minimize etmek amacıyla doğayla dost mücadele yöntemleri ön plana çıkmıştır. Bu mücadele yöntemlerinden yaygın olarak tercih edilen ise, biyolojik mücadeledir.

Biyolojik Mücadele” çevrede mevcut ve etkili olan biyotik (canlı) etmenlerin “insan” faktörünün yardımı ile hastalık, zararlı ve yabancı otlar üzerinde etkinliklerinin artırılması için yapılan her türlü girişim olarak adlandırılmaktadır. Başka bir kaynaktan; “biyolojik kontrol” terimi diğer bir ifadeyle kısaltılmış eş anlamlısı “biyokontrol”, biyolojinin farklı alanlarında, özellikle entomoloji ve bitki patolojisinde kullanılmıştır. Entomolojide, böcek popülasyonlarını baskılamak amacıyla canlı predatör böcekler, entomopatojen nematodlar (EPN) veya mikrobiyal patojenlerin kullanılması şeklinde tanımlanmaktadır. Bitki patolojisinde ise bu terim, hastalıkları baskı altına almak amacıyla mikrobiyal antagonistlerin yanı sıra, yabancı ot popülasyonlarını kontrol etmek için konukçuya özgü patojenlerin kullanımı olarak ifade edilmektedir. Her iki alanda da zararlıyı veya patojeni baskılayan organizma biyolojik kontrol ajanı olarak adlandırılmaktadır (Pal & Gardener, 2006). En kısa haliyle biyolojik mücadele, sürdürülebilir tarım tekniklerine uygun, çevreye, insan ve hayvan sağlığına duyarlı hastalık ve zararlılarla mücadele yöntemidir (Kilinçer vd., 2010).

Yaşadığımız çevrenin kirlenme problemleri, kullanılan tarımsal ilaçların doğaya ve insan sağlığına verdiği zararlar, hastalık ve zararlıların kullanılan tarımsal ilaçlara belirli bir süre sonra direnç kazanması ve tüketicilerin organik ürünleri tüketme eğilimleri göz önüne alındığında biyolojik mücadele, dünyada büyük önem arz etmektedir (Özaktan, Aysan, Yıldız, & Kınay, 2010).

Biyolojik mücadelede kullanılan birçok biyokontrol ajanı vardır. Bunlar; predatörler (avcı böcekler), parazitoitler, EPN’ler, entomopatojen funguslar, ve entomopatojen

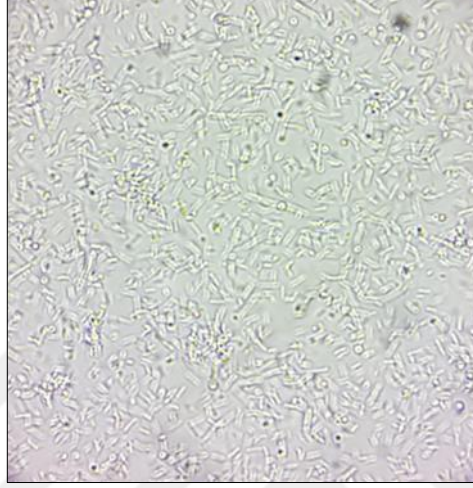
virüsler olup biyolojik mücadelede aktif rol oynayan canlı etmenlerdir (Zehnder vd., 2006).

Biyolojik mücadele içerisinde dikkat çeken ve önem arz eden ajanlarından birisi olan EPN'ler, Nemata şubesi, Secernentea sınıfı, Rhabditida takımına ait bir biyolojik mücadele etmenidir. EPN'ler yaşam döngüsünü tamamlamak için konukçu bir böceğin kütikülasından, doğrudan veya doğal açıklıklarından (stigma, ağız, anüs) giren (Kilinçer vd., 2010) ve bu döngü sırasında konukçu böceğini öldüren ve biyolojisinin % 90'ından fazlasını toprak içinde geçiren obligat endoparazitik organizmalar (Klein, 1990; R. Ehlers & Peters, 2010) olup, doğal dengeyi bozmadan, biyolojik mücadelede etkin olarak kullanılırlar (Vashisth, Chandel, & Sharma, 2013).

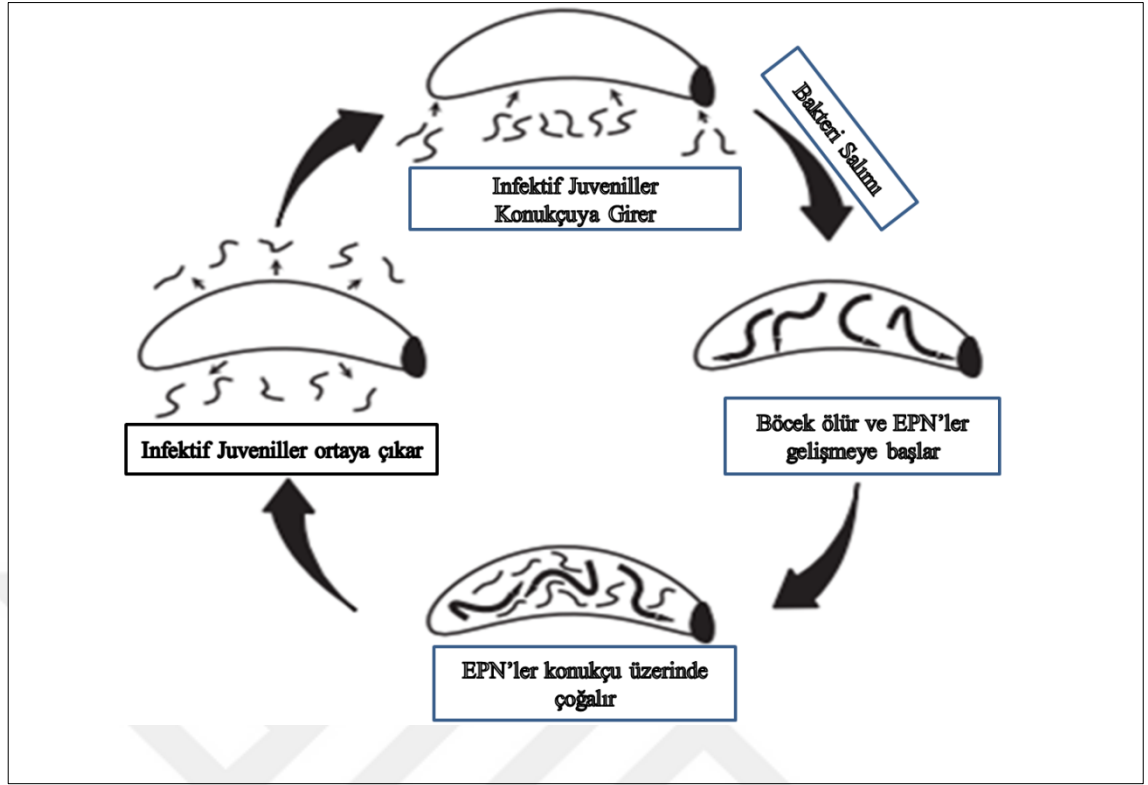
Günümüzde Antarktika hariç diğer tüm kıta ve iklim şartlarında yaşayabildikleri saptanan EPN'lerin (Griffin, Downes, & Block, 1990; Hominick, Reid, Bohan, & Briscoe, 1996; Hominick, 2002), tarımsal ürünlerde zarar yapan 250' den fazla böceğe karşı etkili olması (Peters, 1996) konukçusunu arama yeteneği (Lewis, Gaugler, & Harrison, 1992; Grewal, Selvan, & Gaugler, 1994), hedef dışı organizmalara zararının olmaması (Ehlers, 2001a), birçok pestisit ile uyumluluğu (Rovesti & Deseö, 1990; Burges, 2012) ve açık alanlarda uygulama için *in vitro* sıvı kültürde büyük miktarlarda üretilibilmeleri (Lunau, Stoessel, Schmidt-Peisker, & Ehlers, 1993; Ralf Udo Ehlers, Lunau, Krasomil-Osterfeld, & Osterfeld, 1998; Ehlers, 2003) diğer biyokontrol ajanlarına kıyasla konukçusunu çok kısa sürede öldürebilmesi (Ehlers & Peters, 1995) EPN'leri önemli kılan ve üzerinde çalışılması için istek uyandıran özelliklerinden birkaçıdır.

Biyolojik mücadelede (Gaugler, 1990) kullanılan EPN'ler 2 familya olarak gruplandırılmıştır. Bunlar; Steinernematidae ve Heterorhabditidae'dir. Bu familyalar böcekler için etkili biyolojik mücadele etmenleridir (Kilinçer vd., 2010). 90'dan fazla Steinernematidae ve Heterorhabditidae türü tanımlanmıştır ve bunlardan en az 13 tür ticari gelişime ulaşmıştır (Shapiro-Ilan, Han, & Qiu, 2014) EPN'ler; Steinernematidae familyası için *Xenorhabdus* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae) ve Heterorhabditidae familyası için *Photorhabdus* (Enterobacteriaceae: Gammaproteobacteria) cinsi bakterilerle mutualist ilişki içerisinde dirler (Boemare,

Akhurst, & Mourant, 1993). Bakteriler; böceği öldürmek ve nematod için besin kaynağı oluşturmakla sorumlu birincil etmenlerdir. Bakteriler ve nematodlar arasındaki simbiyotik ilişkinin keşfi, *in vitro* kültür tekniklerinde büyük ilerlemelere yol açmıştır. Simbiyotik bakteriler, nematodlar için bir besin kaynağıdır, ancak nematodun ihtiyaç duyduğu tüm besin maddelerini sağlamazlar (Kvvs, Yadav, & Patil, 2020).



Şekil 1.1. *Photorhabdus* spp. bakterisinin mikroskop görüntüsü (Susurluk ve Çakır, 2022)



Şekil 1.2. EPN'lerin genel yaşam döngüsü (Shapiro -İlan & Gaugler, 2002; Edwin E. Lewis & Grewal, 2005; Lacey & Georgis, 2012)

Entomopatojen Nematodların 6 yaşam evresi vardır: Yumurta, dört juvenil evre ve ergin. Bu yaşam evrelerini tamamlarken konukçu içerisinde bir ila üç nesil olarak yaşamını sürdürebilmektedirler (Lewis & Clarke, 2012). EPN'lerin genel yaşam döngüsü, Şekil 1.2.'de gösterilmektedir. Bu yaşam döngüsünde; infektif juvenil nematod (IJ/ EPN'nin 3. yaşam evresi), konukçuya doğal açıklıklar (ağız, anüs, stigmalar veya bazen böcek kütikülası) yoluyla girebilmektedir (Dowds & Peters, 2002). Böceğin vücut sıvısına giren IJ'ler simbiyotik bakterileri serbest bırakmakta ve konukçu genellikle 24-72 saat içinde ölmektedir. IJ'ler konukçu içerisine girdikten sonra, gelişimsel olarak yaşam döngüleri yeniden başlatmaktadır ve dördüncü aşamadaki juvenillere dönüşmektedir. EPN'ler çoğalan bakteri ve konukçu dokularla beslenmektedir. Konukçudaki besin değeri tükendiğinde, IJ'ler böcek kadavrasından çıkmakta, yeni konukçular aramaktadır.

Heterorhabtidae'nin yaşam döngüsü, Steinernematidae'in yaşam döngüsünden farklıdır. Heterorhabtidae'lerin ilk evresinde erginler yalnızca hermafrodit ve sonraki nesilleri

erkek, dişi ve hermafrodit bireylerden oluşmaktadır (Strauch, Stoessel, & Ehlers, 1994; Koltai, Glazer, & Segal, 1995). Buna karşılık, tüm Steinernematidae türleri erginde sadece amfimik (erkek ve dişi) formlara sahiptir (Stock, Griffin, & Chaerani, 2004). İnsanlara ve diğer hedef olmayan organizmalara karşı güvenli olmaları sebebiyle, biyolojik böcek mücadelesi için *in vivo* ya da *in vitro* modellerinde kitle halinde üretilmektedirler (Grewal & Georgis, 1998; Ehlers vd., 1998; Ehlers, 2001; Gaugler, Brown, Shapiro-Ilan, & Atwa, 2002;).

Entomopatojen Nematodların *in vivo* üretimi, laboratuvarında ve küçük ölçekli alan denemelerinde test için kullanıma uygun bir yöntemdir. EPN'in *in vitro* üretim metodu ise daha büyük ölçekte katı ve sıvı olarak günümüz koşullarında uluslararası pazarlama ve ticarete kullanım için üretilmektedir (Ehlers & Shapiro-Ilan, 2005).

In vivo üretim; IJ'nin doğal yollarla konukçudan uzaklaşmasından yararlanılan White Trap (White, 1927)'e dayalı bir sistemdir. Bu yöntem; inokulasyon, hasat, konsantrasyon ve dekontaminasyon aşamalarından oluşmaktadır. Bu yöntem uygulanırken, konukçu böcekler; filtre kâğıdı, elenmiş toprak, torf gibi materyaller veya nematod enfeksiyonuna uygun başka bir materyal üzerine ya da altına konulmaktadır. Sonrasında üzerine EPN inokulasyonu gerçekleştirilmektedir. Yaklaşık 2-5 gün sonra enfekte böcekler White Trapa alınmaktadır (Shapiro-Ilan ve ark. 2001). White Trap; EPN ile enfekteli ölü *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarının Ringer solüsyonu ile çevrili petri üzerine konulması ve EPN'lerin sıvıya geçmesinin sağlandığı bir petri düzeneğidir. IJ'ler başka konukçu aramak amacıyla konukçudan ayrıldıktan sonra Ringer solüsyonu içerisinde toplanmaktadır.

In vivo üretim verimleri, nematod dozuna ve konukçu yoğunluğuna bağlıdır (Zervos, Johnson, & Webster, 1991; Boff, Wieggers, & Smits, 2000; Shapiro -Ilan & Gaugler, 2002). *G. mellonella* larvalarına çok düşük dozda EPN uygulandığında, konukçu ölüm oranı az gözlenmektedir. Çok yüksek dozda EPN uygulandığında ise, başka organizmalarla rekabet olması sebebiyle (ortamda fungus üremesi gibi) başarısız enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Woodring & Kaya, 1988).

Entomopatojen Nematodların *in vivo* kültürü, türlerin korunması ve küçük ölçekli deneyler için ideal olmasına rağmen alan denemeleri için *in vitro* kültür üretimi

yapılması daha avantajlıdır. EPN'ler, *in vitro* olarak katı ve sıvı fermentasyonu, aksenik veya monoksenik olarak üretilebilmektedir. Bununla birlikte, katı ortamda EPN'nin *in vitro* üretimi, büyük ölçekli üretimlerden daha fazla emek gerektirmekte ve bulaşma riski yüksek olmaktadır. Bu nedenlerle, *in vitro* sıvı ortamda büyük ölçekli üretim teknikleri geliştirilmiştir (Ehlers, 2001).

Bu çalışmada; laboratuvar koşullarında hibrit ırk olarak geliştirilen *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1976) (Rhabditida: Heterorhabditidae) HBH Hibrit ırkının, *in vivo* ve *in vitro* kartı agar ortamında üretimi yapıldıktan sonra belirli sıcaklıklarda depolama koşulları test edilmiş ve daha önce denenmemiş bir şekilde karşılaştırmasını yapmak amacıyla bu Hibrit ırkın toprakta canlı kalma süreleri incelenmiştir. Depolama süresinin belirlenmesi için laboratuvar koşullarında petriler içerisinde canlı ve ölü birey sayımı yapılan EPN'ler, belirli sıcaklıklarda belirli süre bırakıldıktan sonra tekrar canlı ve ölü birey sayımları yapılmıştır.

Toprakta kalıcılık denemesinde ise, laboratuvar koşullarında *in vivo* ve *in vitro* katı agar ortamında üretimi yapılmış olan IJ'ler 180 gün boyunca, petri içerisindeki toprağa bırakılarak belirli gün aralığında içerisine *G. mellonella* larvası konularak sonrasında disekte edilen larva içerisindeki IJ'ler sayılmıştır.

Bu çalışmanın amacı; EPN'lerin laboratuvar koşullarında, iki farklı üretim metoduyla (*in vivo* ve *in vitro*) üretimini gerçekleştirerek, bu üretimler arasında belirli sıcaklık koşullarında depolanma süreleri arasındaki farkların belirlenmesi ve toprak içerisindeki IJ'lerin canlı kalma süresini tespit etmektir. Bu iki üretim modelinden (*in vivo* ve *in vitro*) elde edilen bireyler arasında depolanma şartları ve toprakta kalıcılık süresi arasında karşılaştırma yapılmıştır. EPN'in depolanma şartları ve uygulandığı toprakta kalıcılığı açısından hangi üretim modelinin daha uygun olduğuna dair sonuçlar istatistiksel olarak analiz edilmiştir. EPN'in ticari anlamda üretimde karşılaşılan depolama koşulları ve arazide kullanımdan sonra toprakta canlı kalma süresinin belirlenmesini amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bu bölümde *H. bacteriophora*'nın depolama süresi ve toprakta kalıcılığı çalışmalarıyla ilgili olan kaynaklar gözden geçirilerek 2 ayrı başlık halinde, yayımlanma tarihine göre aşağıda sunulmuştur.

2.1. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Toprakta Kalıcılığı Üzerine Çalışmalar

Nouh'un 2016 yılında yaptığı bu çalışmada; EPN'lerin iki türünün *Heterorhabditis bacteriophora* ve *Steinernema abbasi*'nin (Rhabditida: Steinernematidae) *G. mellonella*'nın son dönem larvalarına karşı patojenitesi ve kalıcılığı değerlendirilmiştir. Bununla birlikte, her iki türün konukçu bulma yeteneği, kumlu toprakta depolanan EPN'lerin hayatta kalması ve IJ üretimi incelenmiştir. IJ dozu arttıkça ve kumlu toprağın yüksekliği azaldıkça ölüm yüzdeleri artmıştır. Temas süresi bir haftaya yükseldiğinde ölüm oranı da artmıştır. *H. bacteriophora* genel olarak *S. abbasi*'den daha virulent olmuştur. *H. bacteriophora*, tüm dozlarda ve depolama dönemlerinde % 100 ölüme neden olduğu için *G. mellonella* larvalarına karşı daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. *S. abbasi*, üç haftalık depolamadan sonra toprağa 70, 140 ve 280 IJ/cm² dozlarında uygulandığında sırasıyla % 100, 60 ve 52 ölüme neden olmuştur. *G. mellonella* larvasından *H. bacteriophora* üretimi, en düşük doz olan 5 IJ/larvada 55400 IJ olmuştur. Üretim hızı, en yüksek 200 IJ/larva dozunda 229660 IJ/larvaya yükselmiştir. *S. abbasi* uygulanan *G. mellonella* larvalarında ise en düşük doz olan 5 IJ/larvada 30080 IJ/larva üretmiştir. En yüksek 200 IJ/larva dozunda ise üretim hızı 177800 IJ/larvaya yükselmiştir (Nouh, 2016).

Susurluk'un 2013 yılında yaptığı çalışmada, *Heterorhabditis* ve *Steinernema* cinsleri, toprakta yaşayan böcek zararlılarına karşı önemli biyolojik mücadele potansiyeline sahiptir. Sürdürülebilir ve başarılı biyolojik mücadele için en önemli faktörlerden biri, salınan alanlardaki ısı toleranslarıdır. Isıya toleranslı *H. bacteriophora* ırklarının IJ'lerinin, kalıcılık yeteneklerini ve besin arama davranış özelliklerini belirlemek amacıyla, toleranslı bir *H. bacteriophora* HIZ ırk1, toleranssız bir (Hb1 1) ırk ile karşılaştırılmıştır. Kalıcılığı değerlendirmek için 4 ay boyunca açık hava deneyi

yapılmıştır. Irkların besin arama davranışlarını tespit etmek için toprakla doldurulmuş dikey PVC kolonlar kullanılmıştır. Sonuç olarak çalışma, kalıcı IJ sayılarında (bir örnekleme hariç) ısıya dayanıklı ve toleranssız ırklar arasında yiyecek arama davranışında önemli farklılıklar olduğunu göstermiştir. Sonuçlara göre, toleranslı tür toprakta daha kalıcı olmuştur. Toleranslı tür toleranssız türe göre daha iyi yiyecek arama davranışına sahip olmuştur. Bu çalışma ayrıca *H. bacteriophora*'nın ısıya dayanma yeteneğinin, kalıcılığı ve yiyecek arama davranış özellikleriyle pozitif bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur (Susurluk, 2013).

Hass, Griffin ve Downes'in 1999 yılında yaptığı benzer bir çalışmada *Heterorhabditis megidis*'in (Heterorhabditidae: Rhabditida) topraktaki kalıcılığı 4 haftalık bir süre boyunca incelenmiştir. 0, 2, 14 ve 28. günlerde, IJ'lerin santrifüj flotasyonu, Baermann hunisi ve toprakta *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvalarının konaklamasından sonra ekstrakte edilmiş ve bunlar daha sonra disekte edilmiştir. 0. günde ekstraksiyon verimi santrifüj flotasyon ile % 82, Baermann hunisi ile % 56 ve *T. molitor* ile % 19,8 olmuştur. Bu üç yöntemin etkinliği zamanla değişmiştir. Topraktaki nematod yoğunluğu ve diseksiyonla elde edilen oran arasındaki ilişkinin doğrusal olmadığı gözlemlenmiştir. Yaklaşık 60 IJ/böcek doza kadar, % 12'den azı saptanırken, daha yüksek dozlarda (200 IJ/böcek'e kadar) yayılım oranı % 23 olmuştur. Yaklaşık 60 IJ / böcek dozuna kadar % 12'den az, daha yüksek dozlarda (200 IJ / böceğe kadar) yayılma etkinliği % 23 olmuştur. *T. molitor*' un ölüm oranı 0. günden 2. güne artmış, ancak 28. günden sonra ölüm oranı düşmüştür. *T.molitor*'un % 50'sini öldüren toprak veya IJ dozunu hesaplayarak benzer bir şekilde toprak yoğunluğu hazırlayarak toprak patojenitesini değerlendirmenin yeni bir yöntemi olmuştur. Bu yöntem, seyreltilmemiş topraktaki *T. molitor* ölüm oranının % 100'e yakın olduğunda patojenisitedeki değişiklikleri izlemenin bir aracı olarak önerilmektedir. Toprakta bir dizi *Heterorhabditis* IJ yoğunluğu hazırlamanın iki yöntemi vardır. Bunlar ya toprağın kendisini IJ içermeyen toprakla seyrelterek ya da toprağa seyreltilmiş IJ süspansiyonları ekleyerek olmaktadır (Hass, Griffin, & Downes, 1999).

Khan ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptığı bu çalışma, EPN'lerin toprakta hayatta kalmasını belirlemek amacıyla yapılmıştır. EPN'ler [(*Steinernema asiaticum* (Rhabditida: Steinernematidae) *S. glaseri*, *H. indica* ve *H. bacteriophora*], sterilize

edilmiş ve edilmemiş toprağa (domates bitkisi bulunan) uygulanmıştır. Kumlu tınlı toprağın sterilizasyonunda formalin (formaldehit) kullanılmıştır (% 72 kum, % 17 silt ve % 8 kil). EPN'ler, uygulamadan hemen sonra eleme yöntemi ile topraktan izole edilmiştir. Bu işlem uygulamadan 7 gün sonra yinelenmiştir. Uygulamaların tamamında önemli bir farklılık görülmemiştir.

7 günlük uygulamadan sonra elde edilen EPN'lerin oranı % 1,87 ile % 7,83 arasında değişmiştir. *S. asiaticum*, *S. glaseri*, *H. indica* ve *H. bacteriophora*'nın sterilize edilmemiş toprakta (domates kökleri olsun veya olmasın) hayatta kalma oranları 7 gün sonra ciddi şekilde azalmıştır. Uygulamadan hemen sonra elde edilen EPN'lerin oranı ise % 43,22 ile % 45,42 arasında değişmiştir. *S. asiaticum*, *S. glaseri*, *H. indica* ve *H. bacteriophora*'nın sterilize edilmiş toprakta yaşama oranlarında önemli farklılıklar olduğu tespit edilmiştir (Khan vd., 2016).

2.2. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Depolama Süresi Çalışmaları

Lalramliana ve Yadav 2016 yılında EPN'lerin depolanmasıyla ilgili bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada deneme materyali olarak topraktan Hindistan'ın Meghalaya bölgesinden üç EPN türü [*Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae), *Steinernema thermophilum* (Rhabditida: Steinernematidae) ve *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae) (Steiner)] izole edilmiştir. Bu türler üzerinde depolama sıcaklığı, IJ'lerin hayatta kalması ve etkinliği test edilmiştir. Denemede saf su kullanılmış olup 120 gün boyunca ortamın 5 ± 2 ve 25 ± 2 °C sıcaklıkta olması sağlanmıştır. IJ'lerin canlılığı hareketli davranışları ile kontrol edilmiştir. IJ'lerin infektivitesi ise laboratuvar koşullarında petri kapları içerisinde *G. mellonella* larvalarındaki ölüm oranları ile tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, denemede kullanılan üç EPN türünde depolama sıcaklığının IJ'lerde hayatta kalmayı önemli ölçüde etkilediği gözlemlenmiştir. 5 °C'de 15 gün depolama sonucunda IJ'lerin hayatta kalma oranı (% 74-86) oldukça yüksek gözlenmiştir. Ancak aynı sıcaklıkta 30 günlük depolamadan sonra *H. indica* ve *S. thermophilum* için hayatta kalma oranı (% 28-32) büyük ölçüde düşmüştür. 25 °C'de incelenen üç EPN türünün IJ'lerinin hayatta kalma süresinin 120 güne kadar olduğu gözlemlenmiştir. *S. thermophilum* ve *S. glaseri* sırasıyla 15 ve 30 günlük denemede IJ'lerin hayatta kalma oranının (>% 75) daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca çalışmada, depolama sürelerinin artmasıyla üç EPN türünün IJ'lerinin oluşumunun, her iki deneme sıcaklığında da azaldığını göstermiştir.

Genel olarak, 25 °C'de depolanan nematodlar, 5 °C'de depolananlara göre daha iyi gelişme göstermiştir. İncelenen üç EPN türü arasında, *S. glaseri*'nin oluşumu, hem sıcaklıklarda hem de farklı depolama sürelerinde diğer türlere göre daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak çalışmada, yerel böcek zararlılarına karşı biyokontrol ajanları olarak görünen Hindistan'ın Meghalaya şehrinde üç yerli EPN türünün hayatta kalma ve infektivitesi üzerinde depolama sıcaklığının etkisinin fazla olduğu tespit edilmiştir (Lalramliana & Yadav, 2016).

Strauch ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları bir çalışmada; EPN'lerin maksimum süre hayatta kalmasını ve infektivitesini garanti etmek amacıyla depolama ve

formülasyon tekniklerinde optimum koşullar sağlanmıştır. EPN'lerin canlılık oranı 5-25°C arasındaki sıcaklıklarda test edilmiştir. *H. indica*'nın hayatta kalabileceği optimum sıcaklık 15°C'de iken en fazla ölüm oranının 5°C'de olduğu tespit edilmiştir. *H. bacteriophora* en iyi 7,5°C'de ve en az 25°C'de canlılığını sürdürmüştür. Tuz konsantrasyonunun artması, sulu süspansiyonlarda IJ'lerin canlılığı üzerine olumlu etkiye sahiptir. 6 ile 4 arasındaki düşük pH, ortamda bakteri üremesinden dolayı depolanmış IJ'lerin uzun süreli hayatta kalmasını azaltmıştır. *H. indica*'nın hayatta kalmasına askorbik, benzoik, sitrik ve sorbik asit gibi organik asit bileşiklerinden sadece askorbik asitin, olumlu bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Kurutulmuş bitkilerden tarçın, karanfil, biberiye ve kekik özleri EPN'ler üzerinde test edilmiştir. Tarçın ve karanfilin *H. indica*'nın canlılık süresini arttırdığı kaydedilmiştir. Atapulgit ve bentonit killlerinde ve süngerde depolanan EPN'lerin hayatta kalma ve infektiviteleri, farklı depolama sıcaklıklarında birkaç hafta boyunca test edilmiştir. İnfektivite, farklı formülasyon materyallerinden etkilenmemiştir. EPN'ler 25°C'de sünger içinde saklandığında 1 haftadan daha az ancak killi formülasyonda daha uzun süre hayatta kalmıştır. *H. bacteriophora*'nın 5 °C'de kile göre süngerdeki canlılığını koruması daha iyi sonuçlanmıştır. Ancak *H. indica*'nın 15 °C'de süngerde kile göre daha az süre hayatta kaldığı belirlenmiştir. Havalandırılmış suda depolanan EPN'lerden, *H. bacteriophora* 5°C'de ve *H. indica* 15°C'de en düşük ölüm oranıyla sonuçlanmıştır. Kontrollü koşullarda (sıcaklık, pH ve ozmolarite) depolama için, havalandırılmış su test edilen diğer tüm yöntemlerden üstün olup koruyucuların eklenmesi ile hayatta kalma süresinin arttığı gözlemlenmiştir (Strauch vd., 2000).

Heterorhabditis türleri, çok çeşitli topraklarda yaşayabilen böcek parazitleridir. 20. yüzyılın son yarısından itibaren bu nematodlar biyolojik kontrol ajanları olarak kullanılırlar da, bu organizmaların tarımsal ve diğer ekosistemlerde nasıl işlediğini anlamak için yapılması gereken çok sayıda araştırma vardır. Kusakabe ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptıkları bir çalışmada, Sonoran Çölü'nde varlığını sürdüren Ağustos böceği *Diceroprocta ornea*'nın (Homoptera: Cicadidae) (Walker) doğal paraziti olan *Heterorhabditis sonorensis*'in (Nematoda: Heterorhabditidae) (Caborca strain) bazı ekolojik özellikleri belirlenmiştir. Özellikle bu EPN'nin çeşitli böcek grupları arasındaki enfeksiyonu ve üremesi, farklı sıcaklıklar ve toprak nem seviyeleri göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir. Diğer üç *Heterorhabditis* türü, sıcaklık ve

toprak nemi denemeleri için karşılaştırmada kullanılmıştır. *H. sonorensis*'in test edilen Lepidoptera konukçularına virülens olduğu ve üreme açısından da uygun olduğu görülmektedir. Bu EPN, 25-30 °C'de optimum bir sıcaklık aralığına sahiptir ancak 15 ile 35°C arasında değişen sıcaklıklarda da başarıyla üreyebilmektedir. Son olarak, *H. sonorensis* IJ'lerinin 24 haftalık depolamadan sonra çeşitli depolama sıcaklıklarında (10-25 °C) yüksek canlılık oranına (% 80'in üzerinde) sahip olmuştur. Ayrıca depolama sonrası enfeksiyon testlerinin ortaya çıkardığı gibi infektif kaldığı görülmüştür (Kusakabe, Peterson, Rivera Orduño, & Stock, 2019).

Acevedo ve Pablo'nun 2006 yılında yapmış oldukları çalışmada tarımsal zararlıların kontrolünde potansiyel ajanlar olarak kullanılan, EPN'lerin depolama koşulları altında, sıcaklık, doz ve zaman gibi faktörlerle hayatta kalmalarına ve patojenisitelerine yönelik denemeler yapılmıştır. Bu denemede altı EPN türünden, üç Steinernematid *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Rhabditidae) (Weiser 1955), *S. glaseri* ve *S. arenarium* türleri depolama çalışmalarında hayatta kalma oranları belirlenmiştir. Üç heterorhabdit: *H. bacteriophora* (Poinar), *H. bacteriophora* HP88 (Grenier) ve *Heterorhabditis baujardi* (Dolinski LPP7) (Nematoda: Rhabditida) türleri ise denemede, beş farklı sıcaklıkta (8, 12, 16, 20 ve 24 °Cderecede) ve iki farklı dozda (1000 ve 10000 IJ / ml) ve iki farklı süre boyunca (15 gün ve 3 ay) kullanılmıştır. Denemede, her bir işlem 10 tekrarlı olarak yapılmıştır. Tüm EPN'lerin hayatta kalmasında, sıcaklık, dozaj ve saklama süresi arasındaki üç yönlü etkileşim önemli olmuştur ($P < 0.05$). Stenernematidlerin çoğunda, 8 - 20 °C arasında geniş bir sıcaklık aralığında kademeli olarak artmıştır. Bu dozlarda ve en kısa sürede, hayatta kalma oranı % 87 ile % 95 arasında olmasına rağmen, düşük konsantrasyon ve kısa sürede 20 ve 24 °C'lik yüksek sıcaklıklar, sırasıyla % 78 ile % 92 arasında olmak üzere, Heterorhabdit'lerin yüksek oranda hayatta kaldığı tespit edilmiştir. Bu denemede, laboratuvarında yüksek canlılık ile biyolojik kontrol ve koruma programlarında yüksek bir canlı kalma süresi temsil eden her EPN için özel koşulları belirlemek mümkün olmuştur (Acevedo & Pablo, 2006).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. *Heterorhabditis bacteriophora* izolat ve ırkı

Biyolojik mücadelede sıkça kullanılan ayrıca bu çalışmada da yer alan EPN, *H. bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) (Poinar, 1976) HBH Hibrit ırkı 2012 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Nematoloji Laboratuvarında gerçekleştirilen “EPN hibridizasyon” çalışması kapsamında iki farklı ilin izolatlarının hibritlenmesinden meydana gelmiş ve patenti alınmış bir ırktır (TPMK Patent No: TR 2013 06141 B).



Şekil 3.1. Buzdolabında +4 °C’de flasklar içerisindeki depolanmış *Heterorhabditis* türleri (Susurluk ve Çakır, 2022)

3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar ve malzemeler

Yapılan çalışmada hassas terazi (AND FZ-5000i 5200 g /0,01 g), ısıtmalı etüv (Termal), ısıtmalı-soğutmalı etüv (Nüve ES 500), manyetik karıştırıcı (ısıtıcılı) (BIOSAN MSH 300), buzdolabı (Arçelik), otoklav (Nüve OT 032), saf su cihazı (Elektro.mag M3), bilgisayar (Casper), Ters (Inverted) Tip Trinoküler Işık Mikroskobu (Leica DMIL LED), steril kabin (BİLSER), well plate (6x4) (kuyucuklu kap), filtre kağıdı 55 mm, eppendorf tüpü (1,5 ml), alüminyum folyo, parafin film, cam kavanoz (1 lt), cam tüp,

pens, plastik petri (6 cm), miktopipet (100-1000 µl) mikropipet ucu (100 ve 1000 µl), pastör pipeti, cam pipet, şeffaf laboratuvar şişesi (500 ml) flask (kültür kabı 200 ml), jilet, öze, pürmüz, selüloz tıpa, ısıya dayanıklı cam erlen (250 ml, 1000 ml) kullanılmıştır.

3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve besin maddeleri

NaCl, KCl, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , gliserin, bal, kepek, soya unu, mısır unu, süt tozu, Standard-I-Nutrient Agar, Bromthymolblue, 2,3,5-Triphenyl-tetracolumchloride solution, Bacto Nutrient Broth, Bacto Agar, Bitkisel yağ, Yeast extract, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, Distile su, Sodyum Hipoklorit (NaClO) çalışmalarımızda kullanılmıştır.

3.1.4. Çalışmada kullanılan yapay ortamlar

In vivo ve *in vitro* ortamlarda EPN üretimi yapabilmek amacıyla bazı kimyasal karışım ve yapay ortamlara ihtiyaç duyulmuştur. *In vitro* ortamda IJ üretilmesi için *Photorhabdus* spp. bakterisinin izolasyonundan sonra bakterinin yapay ortamda üretilmesini sağlamak amacıyla NBTA (Nutrient Bromothymol Blue Agar) agar ortamı (Çizelge 3.1) (Akhurst, 1980) hazırlanmıştır. Katı ortamda gelişim sağlayan bakterinin çoğaltılması amacıyla YS (Yeast Medium) sıvı besin ortamı (Çizelge 3.2) (Dye, 1968) hazırlanmıştır. Üremiş olan bakterinin yapay ortamda EPN ile birleşebilmesi amacıyla Wouts (Nutrient Lipid) agar besi ortamı (Çizelge 3.3) (Wouts, 1981) hazırlanmıştır. Wout agar ortamında oluşan yeni bireyler içerisinde Ringer solüsyonu bulunan (Çizelge 3.5) (Ringer, 1882) flasklar içerisine konularak buzdolabında +4-8 °C’de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.1. NBTA agar ortamının içeriği (Akhurst, 1980)

Kimyasal Madde Adı	Miktarı
Standard-I-Nutrient Agar	9,25 g
Bromthymolblue	0,006625 g
Saf su	250 ml
2,3,5-Triphenyl-tetracolumchloride solution	1 mg

Çizelge 3.2. YS sıvı besin ortamının içeriği (Dye, 1968)

Kimyasal Madde Adı	Miktarı
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,2 g
Saf Su	1000 ml

Çizelge 3.3. Wouts (Nutrient Lipid) agar ortamının içeriği (Wouts, 1981)

Kimyasal Madde Adı	Miktarı
Nutrient Broth	16 g
Agar powder, Bacteriological	12 g
Ayçiçek yağı	5 ml
Saf su	1000 ml

Çizelge 3.4. Yumurtaların steril edilmesi için kullanılan sterilizasyon solüsyonu

Kimyasal Madde Adı	Miktarı
NaOCI	1 ml
4 M NaOH	1 ml
Saf su	10 ml

Çizelge 3.5. IJ'lerin yapay ortamı Ringer solüsyonu (Ringer, 1882)

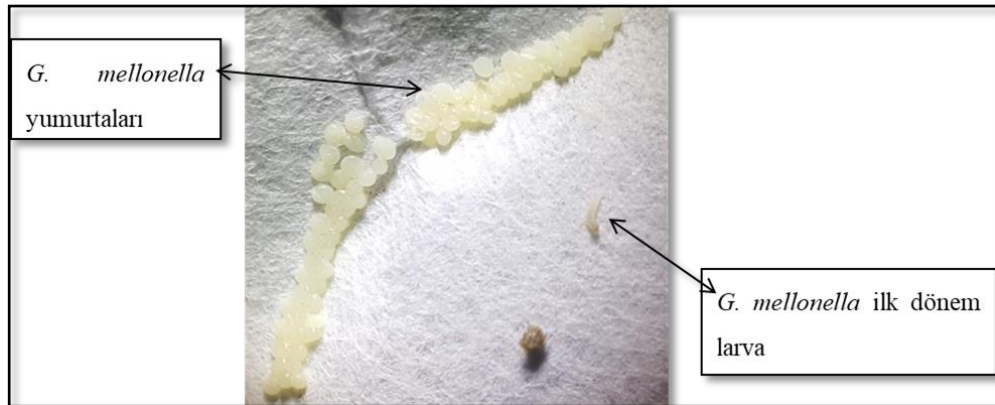
Kimyasal Madde Adı	Miktarı
NaCl	9 g
KCl	0,42 g
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,37 g
NaHCO ₃	0,20 g
Saf su	1000 ml

3.2. Yöntem

3.2.1. *Galleria mellonella* üretimi

Bal mumu güvesi olarak bilinen, petek güvesi olarak da adlandırılan *G. mellonella* larvaları EPN'lerin üretiminde yaygın olarak tercih edilen bir deney hayvanıdır. Genel anlamda *G. mellonella* larvaları; laboratuvar ortamında kolayca üretilmesi (Aktümsek, Nurulloğlu, & Kalyoncu, 2000), yetiştirme kolaylığı, kısa zamanda dölünü tamamlaması, birçok zorlu koşullara dayanıklı olması, biyolojik mücadelede EPN'ler açısından oldukça uygun bir konukçu böcek türü olması ve EPN'lerin bu larvaya karşı hassasiyet göstermesi gibi özelliklerinden dolayı laboratuvar koşullarında kullanılması uygun görülmüştür (Woodring & Kaya, 1988; Ehlers, 1996; Shapiro -Ilan & Gaugler, 2002). Laboratuvar koşullarında EPN'lerin *in vivo* koşullarda üretimini sağlamak ve EPN'lere konukçu olması amacıyla *G. mellonella* kültürü yetiştirilmiştir.

Galleria mellonella larvalarının beslenip gelişmeleri amacıyla bir litre hacimli cam kavanozlar içerisine özel yem karışımı konularak bu larvaların gelişmesi sağlanmıştır. Özel sıcaklık ve nem koşulları isteyen bal mumu güvesi larvaları, bu koşulların inkübatör aracılığıyla sağlanmasıyla yaklaşık kırk beş gün içerisinde yeni nesil vermekte olduğu belirlenmiştir. Nematoloji laboratuvarımızda sağlıklı bir şekilde *G. mellonella* larvalarının üretimi yapılmaktadır.



Şekil 3.2. *G. mellonella* 'nın yumurta ve ilk dönem larvası (Susurluk ve Çakır, 2022)



Şekil 3.3. Kavanoz içerisindeki son dönem *G. mellonella* larvaları (Susurluk ve Çakır, 2022)



Şekil 3.4. Besinden ayıklanmış son dönem *G. mellonella* larvaları (Susurluk ve Çakır, 2022)



Şekil 3.5. *G. mellonella* pupaları (Susurluk ve Çakır, 2022)



Şekil 3.6. *G. mellonella* ergin dişisi (Susurluk ve Çakır, 2022)

3.2.2. *Galleria mellonella* için besin ortamı hazırlanması

Galleria mellonella larvaları için önemli besin kaynağı baldır. Bu sebeple laboratuvar koşullarında hazırlanacak olan yemin de temel besin maddesini bal oluşturmaktadır. Bal ve gliserin termostatl ısıtıcı üzerindeki tencerede 200 °C’de kaynayana kadar tutulmuştur. Sonrasında üzerine kuru maya ilave edilerek maya eriyene kadar karıştırılmıştır. Mayanın erimesinin ardından ölçümü yapılan katı bileşenlerden kepek, mısır unu, soya unu ve süt tozu da ilave edilerek malzemelerin iyice karışması sağlanmıştır (Kaya & Stock, 1997). Hafif kahverengi bir renk almış olan. besin soğuduktan sonra kavanozlara konularak, önceden elde edilmiş olan yumurtalar kavanoza eklenmiştir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. *G. mellonella* besin ortamının içeriği (Weisner, 1993)

Malzeme	Miktarı (g)
Bal	100
Gliserin	100
Kepek	100
Mısır Unu	75
Soya Unu	50
Süt Tozu	50

3.2.3. *Galleria mellonella*’nın yaşam döngüsü

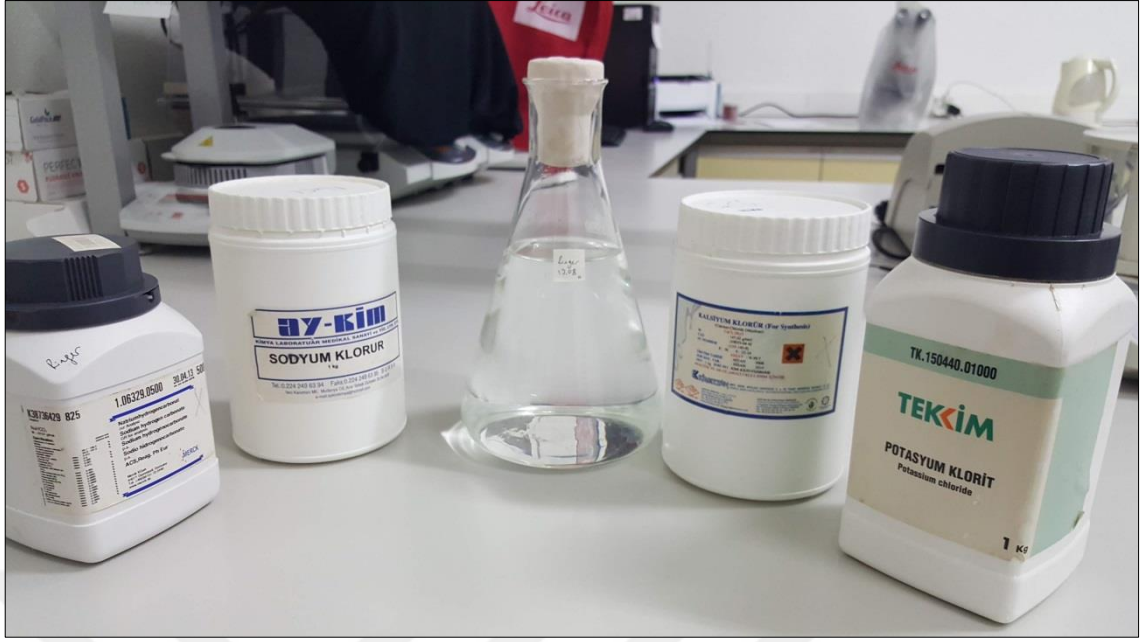
Büyük balmumu güvesi kaynaklardaki adıyla *G. mellonella* tipik bir holometabol böcektir. Bu canlı yumurta, larva, pupa ve ergin olmak üzere dört farklı yaşam evresi geçirmektedir. Güvenin (*G. mellonella*) yaşam döngüsünü tamamlaması için geçen süre haftalar ile aylar arasında değişmektedir. *G. mellonella* hem biyotik (intra ve interspesifik) hem de abiyotik faktörlerden etkilenmektedir (Nielsen & Brister, 1979; Charriere & Imdorf, 1999; Gulati & Kaushik, 2004).

Galleria mellonella 29-33 °C’de optimum gelişme gösterip % 29-33 nem koşullarında canlılığını sürdürmüştür (Kwadha vd., 2017). *G. mellonella*, uygun koşulları sağladığında yaklaşık 6 haftada bir dölünü tamamlamaktadır. *G. mellonella* larvası 28

gün ila 6 ay arasında canlı kalabilmektedir (Paddock, 1918; Nielsen & Brister, 1979). Tüm koşulların uygun olması ve herhangi bir bulaşmanın olmaması durumunda sağlıklı yumurtaların elde edilmesi mümkündür.

3.2.4. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit ırkının *in vivo* koşullarda üretimi

In vivo üretimde kullanılacak HBH Hibrit ırkı nematodlar daha önceden üretilerek buzdolabında hücre kültür kapları (flask) içerisinde +4-8 °C’de muhafaza edilmiştir (bkz. Şekil 3.1). Buzdolabından çıkarılan 200 ml’lik hücre kültür kapları (flask) içerisinde bulunan IJ’ler oda sıcaklığında bir süre bekletilmiştir. 24 kuyucuklu hücre kültür kapları alınarak, içerisine laboratuvarda kültürü yapılan *G. mellonella* larvaları her kuyucuğa bir adet gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Üzerine daha önceden steril edilen ve Ringer solüsyonu ile % 10 oranında nemlendirilen ince taneli kum eklenmiştir. Oda sıcaklığında bekletilen nematodlar, larva başına 100 IJ gelecek şekilde kültür kabının her bir kuyucuğuna mikropipet yardımıyla bırakılmıştır. Bu şekilde EPN enfeksiyonu gerçekleştirilen kuyucuklu kabın kapağı kapatılarak sıkıca parafilmelenmiştir (Susurluk vd., 2001; Susurluk, Unlu, & Kepenekci, 2003). İşlemi sonlanan hücre kültür kabı ısıtılmalı inkübatörde 24 °C’de dört gün beklemeye bırakılmıştır. Dördüncü günün sonunda enfeksiyonu gerçekleşen larvalar alınarak White Trap düzeneğine konulmuş (White, 1927) ve üzerine Ringer solüsyonu (Şekil 3.7) ilave edilmiştir.



Şekil 3.7. Ringer Solüsyonu hazırlamak için gerekli kimyasallar ve Ringer Solüsyonu (Susurluk ve Çakır, 2022)

Şekil 3.8.'deki gibi White Trap'ta bulunan kadvralardan Ringer solüsyonu içerisine geçen IJ'ler, stok kültürü oluşturulması amacıyla pastör pipet yardımıyla toplanarak flasklar içerisine alınıp +4-8 °C'de buzdolabına konulmuştur (Kaya & Stock, 1997). Böylece *in vivo* ortamda yeni nematod kültürleri elde edilmiştir.



Şekil 3.8. White Trap düzeneği (Susurluk ve Çakır, 2022)

3.2.5. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit ırkının *in vitro* koşullarda üretimi

Entomopatojen Nematodların (EPN) *in vitro*da üretimi sıvı ve katı agar ortamı olmak üzere iki şekilde olmaktadır. Tez çalışmamızda *in vitro* koşullarından katı agar ortamdaki üretimi yapılmıştır. Katı agar ortamında 2 aşama vardır. Birincisi EPN ile simbiyont ilişki içerisinde bulunan bakterinin izolasyonu, ikinci aşama ise üretimi gerçekleştirilecek EPN'den yumurtalarının izolasyonudur. Bu 2 aşama tamamlandığında *in vitro* katı agar ortamında *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkına ait sağlıklı bireyler elde edilebilmektedir.

3.2.6. Simbiyont bakteri *Photorhabdus* spp.'nin izolasyonu

Heterorhabditis bacteriophora barsağın ön kısmında, özel bir kese içerisinde bulunan *Photorhabdus* spp. bakterisi ile simbiyont bir ilişki içerisinde (Endo & Nickle, 1994; Duchaud vd., 2003). *In vitro* üretimde *Photorhabdus* spp. bakterisinin var olması gereklidir.

Photorhabdus spp. bakterisinin izolasyonu için ilk aşama *in vivo* ortamda yapılan enfeksiyon gibi *G. mellonella* larvalarının EPN'ler ile buluşturulmasıdır. *G. mellonella* larvaları well plate içerisine her bir kuyucuğa 1 adet gelecek şekilde 5-6 adet konulduktan sonra üzerine nemlendirilmiş steril toprak kapatılıp, larva başı 100 IJ gelecek şekilde kuyucuklara eklenmiştir (Susurluk vd., 2001). Bir başka enfeksiyon şeklinde ise petri içerisine filtre kâğıdı yerleştirilip filtre kâğıdı Ringer ile hafifçe ıslatılarak üzerine EPN'i larva başı 100 IJ dozunda mikropipet ile uygulama şeklinde yapılmaktadır (McMullen & Stock, 2014). EPN'nin larvaya direk teması enfeksiyonun başarılı olmasındaki kriterlerden birisidir. Her iki yöntemle de enfekte edilebilen *G. mellonella* larvaları inkübatörde 25 °C sıcaklıkta 24 saat bekletilmiştir. *G. mellonella* larvalarının hala yaşıyor olması önem arz etmektedir. Ölümü gerçekleşmiş larvadan bakteri izolasyonunun başarılı olmadığı gözlemlenmiştir. Çıkarılan larvalar Ringer solüsyonu ile topraktan temizlendikten sonra eppendorf tüpleri içerisine alınıp üzerini kaplayacak şekilde % 70'lik etil alkol vasıtasıyla beş dakika yüzey sterilizasyona tabi tutulmuştur (Şekil 3.9). Bu sürenin beş dakikayı aşmaması bakterinin canlılığını yitirmemesi için ve beş dakikadan az olmaması ise larva yüzeylerinin steril olması için oldukça önem arz etmektedir.



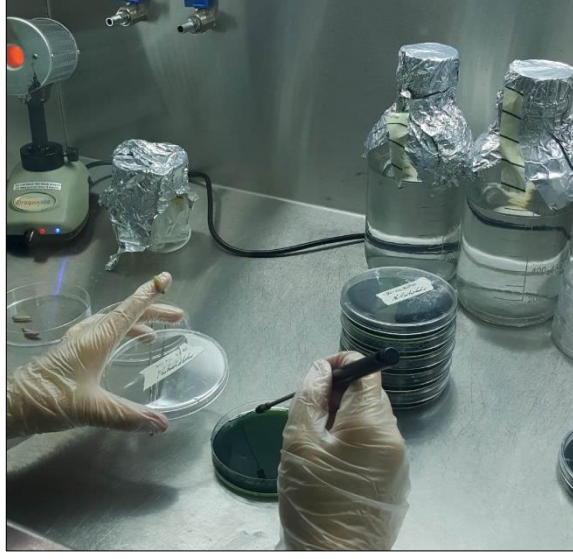
Şekil 3.9. Etil alkol içerisinde steril edilen *G. mellonella* larvası (Susurluk ve Çakır, 2022)

Steril edilen larvalar laminar akım kabini içerisinde temiz bir ortama alınmıştır. Bir müddet larvalar bekletilip üzerindeki etil alkolün kuruması amaçlanmıştır. Sonrasında larva ele alınıp, iki parmak arasında sıkıştırılarak sol ventralinden steril bir iğne ucu ile delinmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. *G. mellonella* larvasının ventralinden steril iğne ucu ile delinerek larvanın vücut sıvısının izolasyonu (Susurluk ve Çakır, 2022)

Delinen yerden çıkan larvanın vücut sıvısı (hemolinf) steril öze yardımıyla alınarak BSA agar ortamına çizimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.11). Bu işlemde sonra petriler parafilm yardımıyla kapatılarak üç gün boyunca 26 °C’de inkübasyona tabi tutulmuştur (Şekil 3.12).



Şekil 3.11. NBTA agar ortamına *Photorhabdus* spp. bakterisinin çizimi (Susurluk ve Çakır, 2022)



Şekil 3.12. Üç gün inkübasyona bırakılan *Photorhabdus* spp. üremiş NBTA ortamı (Susurluk ve Çakır, 2022)

Üçüncü günden sonra petriler steril kabinde açılarak içerisinde bulaşma olmamış bir miktar bakteri öze yardımıyla alınıp 250 ml'lik cam erlen içerisindeki 80 ml'lik steril YS sıvı besin ortamına aktarılmıştır. Erlen içerisinde bulunan YS bakteri inokulasyonundan sonra 25 °C ve 180 rpm (dakikadaki devir sayısı)'de 24 saat orbital çalkalayıcı (shaker) içerisinde karıştırılarak üremesi sağlanmıştır (Akhurst, 1980).

Bakterilerde üreme başarılı olduğunda koyu sarı veya turuncumsu bir renk aldığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Steril edilmiş YS sıvısı Bakteri üremiş YS ortamı (Susurluk ve Çakır, 2022)

3.2.7. Stok bakteri kültürü hazırlanması

Photorhabdus spp. bakterisinin *in vitro* katı agar ortamında üretimini yaparken işlemlerin daha hızlı yapılabilmesi amacıyla bakteri stoku oluşturulmuştur. Stok hazırlama işleminde 3.2.6. Bölümünde bahsi geçen bakteri izolasyonu yapılmıştır. Bakterinin soğuk koşullarda canlılığını kaybetmemesi amacıyla çoğalmış olan bakterili erlenin içerisine gliserin katılmıştır. Gliserin ilavesinde 100 ml'lik bakterili YS içerisine % 15'i kadar gliserinin yoğunluğu dikkate alınarak ($1,26 \text{ g/cm}^3$) 9,5 g gliserin ilave edilmiştir. Gliserin eklenen bakterili YS ortamı 1,5 ml'lik eppendorf tüpleri içerisine 1 ml konularak $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de buzlukta daha sonra kullanılmak üzere depolanmıştır (Lunau vd., 1993) (Şekil 3.14).



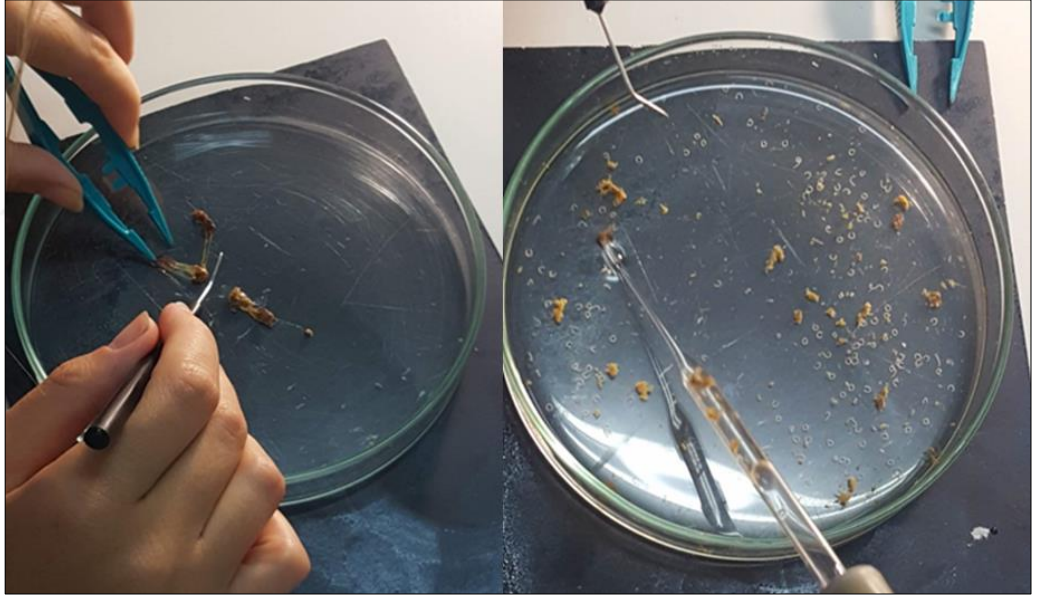
Şekil 3.14. -20 °C’de stoklanan *Photorhabdus* spp. bakteri kültürleri (Susurluk ve Çakır, 2022)

3.2.8. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit ırkının yumurta izolasyonu

Orbital çalkalayıcı içerisinde 24 saatte üremesi tamamlanan bakteriler (ister stok kültürden alınan bakteriler olsun isterse yeni elde edilen bakteriler olsun) daha sonra Wouts Agar ortamına damlatılarak karanlık ortamda 1 gece 25 °C’de inkübasyona tabi tutulmuştur. Yumurta izolasyonunda döllenmiş yumurtaların elde edilmesi oldukça önemlidir. Yumurtaların izolasyonu için; *in vivoda* yapıldığı gibi öncelikle larvalar kuyucuklu kaplara konularak üzerine nemlendirilmiş steril toprak ilave edilmiştir. Sonrasında larva başına 100 IJ gelecek şekilde EPN’ler eklenmiş ve bu işlemten sonra kuyucuklu kaplar inkübatörde 26 °C’de yaklaşık 96 saat inkübasyona bırakılmıştır. Burada dört gün bekletilen ve Şekil 3.15’te gösterilen enfeksiyonu başarılı olan kadvralar alınıp diseksiyon yöntemine tabi tutularak kadvralar içerisindeki hermafrodit bireyler öze yardımıyla cam petri içerisinde toplanmış (Şekil 3.16) ve mikroskop aracılığı ile hermafrodit bireylerin döllenmiş olup olmadığı kontrol edilmiştir.



Şekil 3.15. Enfeksiyonu başarılı olan *G. mellonella* larvaları (Susurluk ve Çakır, 2022)



Şekil 3.16. Diseksiyon yöntemi ile larva içerisinde hermafrodit bireylerin ayıklanması (Susurluk ve Çakır, 2022)

Yaklaşık yüz elli adet döllenmiş hermafrodit birey alındıktan sonra cam tüp içerisine konulup, üzerine yaklaşık 50 ml ringer solüsyonu eklenmiş ve hermafrodit bireylerin dibe çökmesi sağlanmıştır. Birkaç defa bu yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra daha önceden küçük parçalar halinde kesilen jiletler de tüp içerisine eklenmiştir. Bu işlemin ardından vortex aracılığıyla yaklaşık bir dk jiletlerin hermafrodit bireyleri kesip,

içerisindeki yumurtaların ringer solüsyonuna geçmesi sağlanmıştır (Şekil 3.17). Burada suyun bulanık beyaz rengi alması en belirleyici unsurdur.



Şekil 3.17. A: Diseksiyon sonrası elde edilmiş ve Ringer Solüsyonu ile yıkanmış hermafrodit bireyler. B: Hermafrodit bireyler içerisinde görülen yumurtalar. C: İçerisinde yumurta ve jilet bulunan tüpün vortex ile karıştırılarak parçalanmasının sağlanması (Susurluk ve Çakır, 2022)

Ringer solüsyonu içerisinde bulunan yumurtalar dar aralıklı bir tül yardımıyla süzülmüştür. Süzülen yumurtalar 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine 1 ml olacak şekilde eklenmiştir. Sonrasında santrifüj aleti ile 2000 devir/dk'da iki dk santrifüj edilmiştir (Şekil 3.18). Santrifüj edilen eppendorf tüpleri içerisindeki yumurtaların merkezkaç kuvveti ile dibe çökmesi sağlanmıştır.



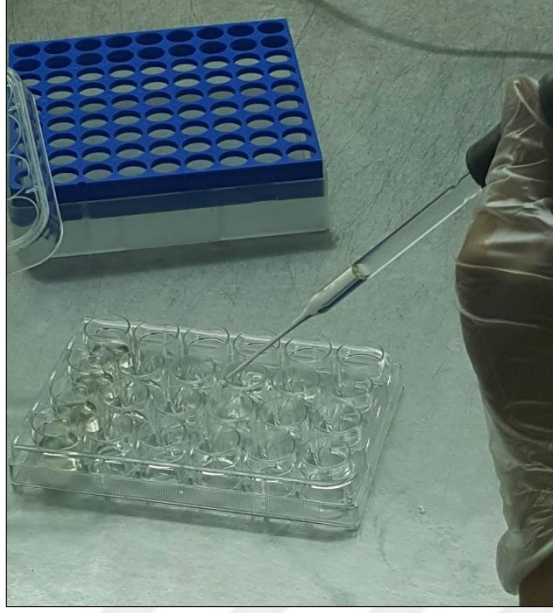
Şekil 3.18. Eppendorf tüp içerisindeki yumurtaların dibe çökmesi amacıyla santrifüj edilmesi (Susurluk ve Çakır, 2022)

Yumurtaların dibe çökmesini takiben yüzeyde biriken kirli su tabakası cam pipet vasıtasıyla alınmış (Şekil 3.19) ve eppendorf tüpü içerisindeki yumurtalar üzerine temiz bir ringer solüsyonu eklenmiştir. Eppendorf tüpü içerisinde bulunan yumurtalar üzerine Ringer eklendikten sonra tekrar santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Dört defa Ringer solüsyonu ile yıkama işlemine tabi tutulan ve dibe çökmesi sağlanan yumurtaların üzerine son olarak sterilizasyon sıvısı eklenmiş ve elle hafifçe dört dk boyunca nazikçe çalkalanmıştır. Sonrasında eppendorf tüpleri 3000 devir/dk'da iki dk santrifüj edilmiştir.

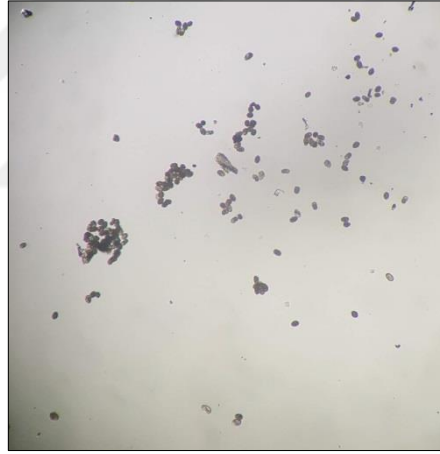


Şekil 3.19. Eppendorf tüpü içerisindeki kirli Ringer'in boşaltılması (Susurluk ve Çakır, 2022)

Sterilizasyon solüsyonu eklenmesinin ardından aşırı maruziyet sonrası yumurtalar negatif etkilendikleri için bu süreçte santrifüj işlemine ayrılan toplam sürenin 6 dk'yı geçmemesine özen gösterilmiştir. Santrifüj işleminin ardından yumurtalar steril kabin içerisine alınıp üzerine daha önceden steril edilmiş olan YS sıvısı eklenmiş ve yeniden santrifüj edilmiştir. Son olarak YS ile santrifüj edilen eppendorf tüpü içerisindeki yumurtalar, steril kabin içerisine alınmış ve eppendorf tüplerinin dip kısmından yumurtalar çekilerek 24 kuyucuklu steril hücre kültür kabı (well plate) içerisine eklenmiştir (Şekil 3.20). Kabin kapağı kapatılarak etrafı parafilm ile sıkıca kapatılmıştır. Inverted mikroskop aracılığıyla yumurtaların doğru bir şekilde steril edilip edilmediği kontrol edilmiştir (Şekil 3.21).

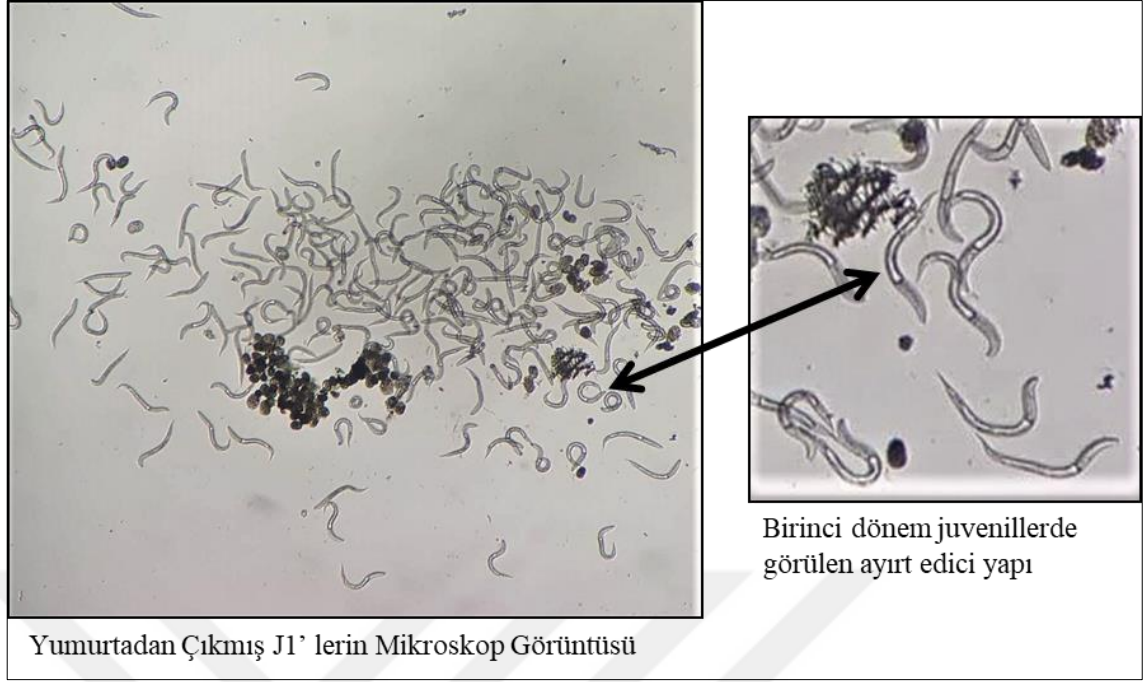


Şekil 3.20. Kuyucuklu kaplara YS ve yumurta eklenmesi (Susurluk ve Çakır, 2022)

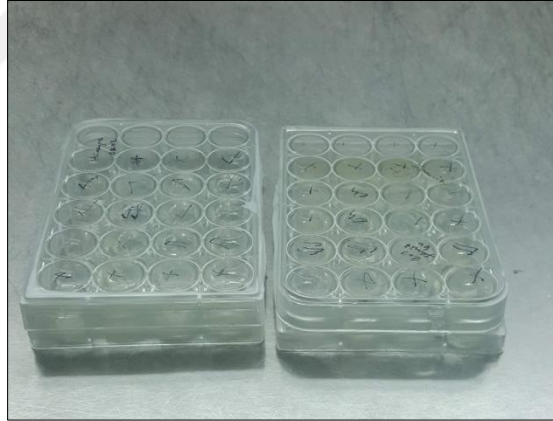


Şekil 3.21. Steril edilen yumurtaların mikroskop görüntüsü (Susurluk ve Çakır, 2022)

Kuyucuklu kap 26 °C’de 2 gün bekletilmiş ve birinci dönem juvenillerin (J1) çıkması sağlanmıştır. J1’ler üzerindeki şeffaf üçgenimsi yapıdan anlaşılmaktadır (Şekil 3.22).



Şekil 3.22. Yumurtadan çıkan birinci dönem juveniller (Susurluk ve Çakır, 2022)

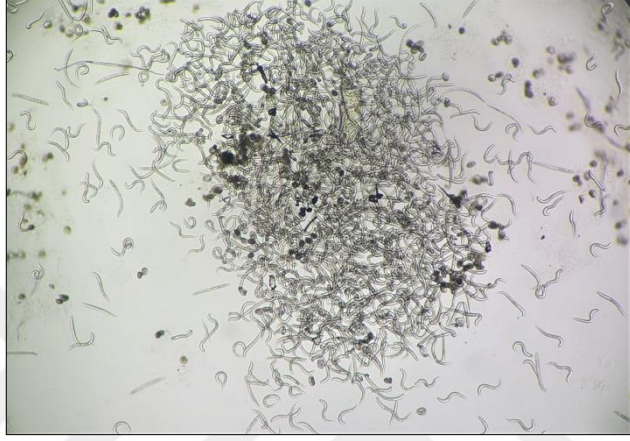


Şekil 3.23. İçerisinde J1 bulunan kuyucuklu kaplar (Susurluk ve Çakır, 2022)

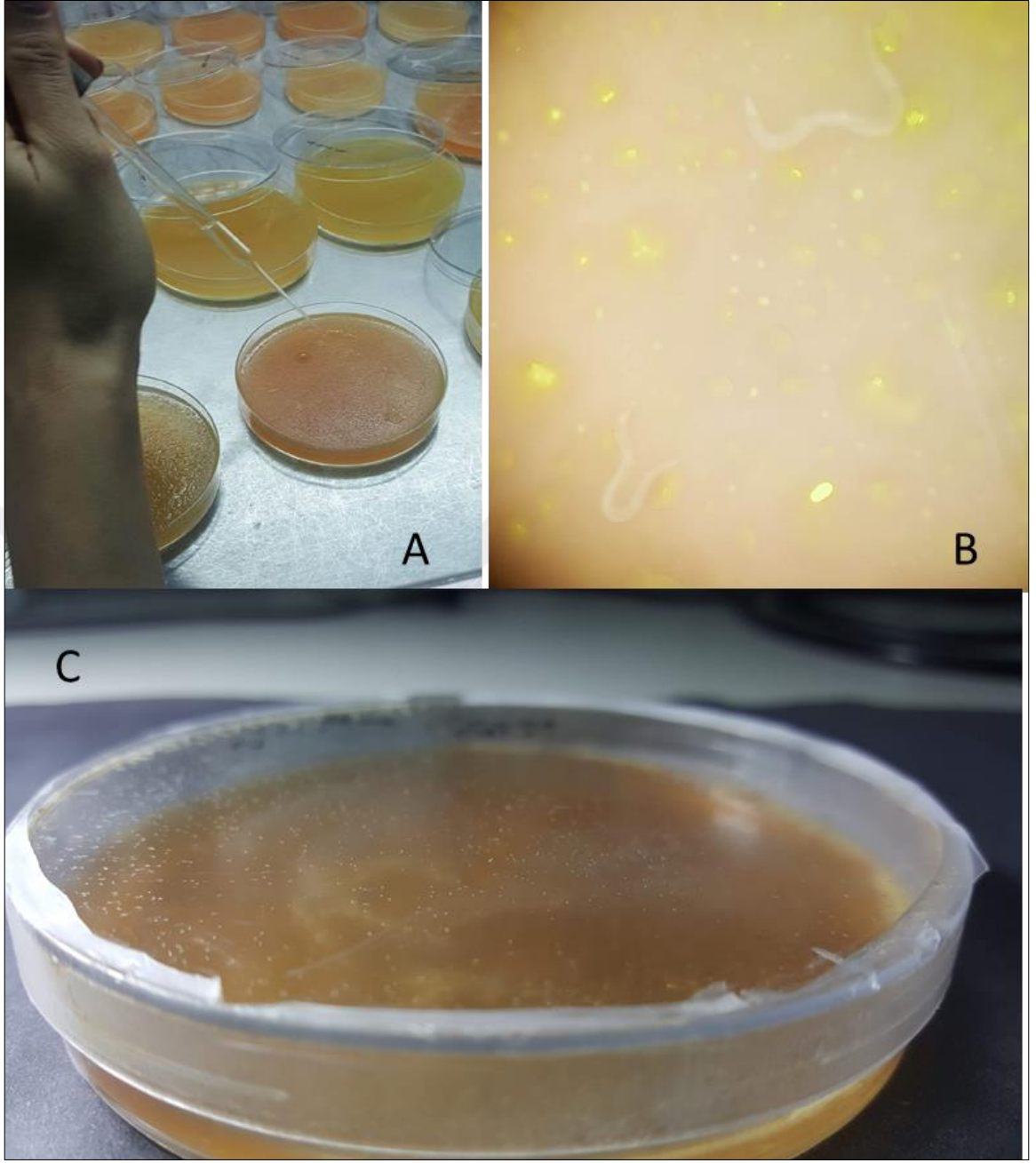
3.2.9. J1'lerin katı agar ortamına aktarılması

In vitro ortamda sağlıklı ve saf nesil elde etmek amacıyla *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit ırkından yumurta izolasyonu yapılmıştır. Bölüm 3.2.8'de anlatılmış olan ve sağlıklı bir şekilde elde edilen J1'ler, Bölüm 3.2.6'da bahsedilen *Photorhabdus* spp. bakterisi damlatılmış olan Wouts agar ortamına steril kabin içerisinde her bir petriye 5-10 damla gelecek şekilde petrilere paylaştırılmıştır. Petriler

parafilm ile iyice kapatılarak 25 °C’de karanlık ortam koşullarında inkübasyona tabi tutulmuştur. Eklenen birinci dönem juveniller (J1) yaklaşık beş gün içerisinde yeni hermafrodit birey oluşturmuş ve bu bireylerden yeni IJ’ler meydana gelmiştir. Elde edilen IJ’ler petri kapağının altı kısmına doğru toplanmış olup (Şekil 3.25), bunlar steril kabin içerisinde ringer solüsyonu ile yıkanarak flasklar içerisine alınmıştır. Flasklar içerisinde *in vitro* üretimi gerçekleşmiş IJ’ler buzdolabında +4-8 °C’de depolanmıştır.



Şekil 3.24. Bakterili Wouts Agar ortamına aktarılmaya uygun olan J1’ler (Susurluk ve Çakır, 2022)



Şekil 3.25. A. Bakteri çoğalmış olan Wouts Agar ortamına J1'lerin bırakılması B. Wouts Agarda üremiş olan hermafrodit bireyler C. Petri kapağının altına toplanmış IJ'ler (Susurluk ve Çakır, 2022)



Şekil 3.26. Petri kapağının altına toplanmış IJ'lerin mikroskop görüntüsü (Susurluk ve Çakır, 2022)

3.3. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Toprakta Kalıcılığı

Heterorhabditis bacteriophora HBH Hibrit ırkının toprakta canlı kalma sürelerini tespit etmek amacıyla Bursa Uludağ Üniversitesi Güzel Sanatlar Fakültesi yakınlarında bulunan ve koordinat bilgileri verilen 40°13'40.4"N 28°51'41.0"E (40.227898, 28.861392) alandan toprak temin edilmiştir. Toprak örneği laboratuvar koşullarında *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkının toprakta kalıcılığını (yaşam süresini) belirlemek amacıyla alınmıştır. Temin edilen topraklar 0,1-0,5 mm partikül boyutunda kum haline getirilmiştir. Toprak nemini ölçmek amacıyla 13 gram toprak örneği de alınarak kurutma aletinde nemi uçurulmuştur (Şekil 3.27). Bu işlem 100 °C'de 14 dakika 5 saniye sürmüştür. Toprakta % 9 nem oranı olduğu tespit edilmiştir. Gerekli olan % 1'lik nemi sağlamak amacıyla 3 kg toprak için 33 ml saf su kullanılmıştır.

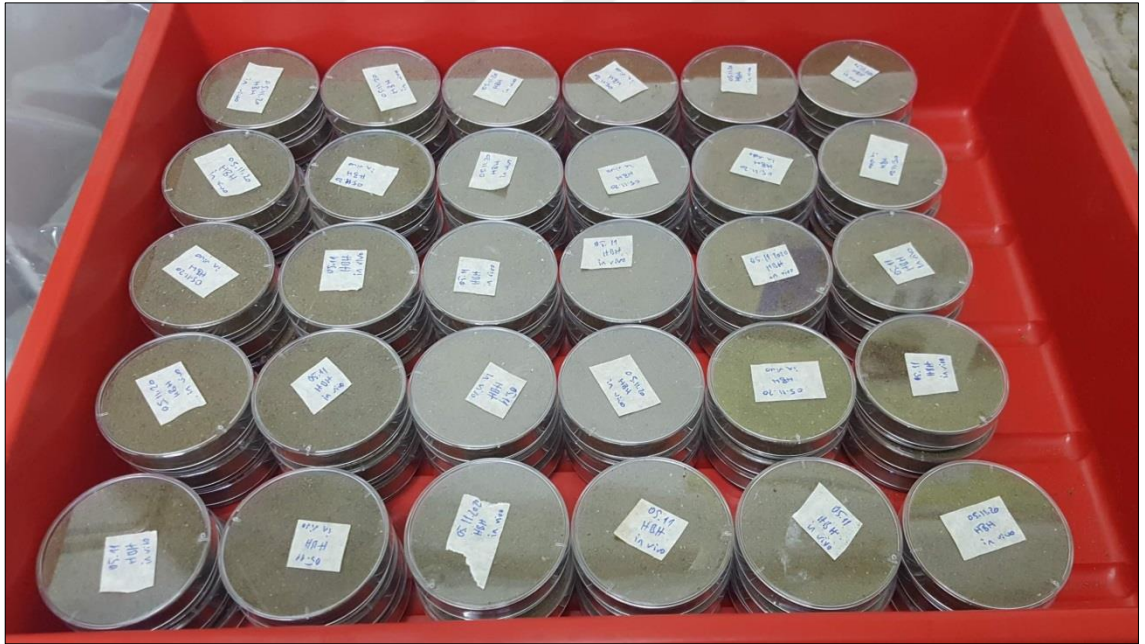


Şekil 3.27. Toprak neminin ölçümü (Susurluk ve Çakır, 2022)

Toprak nemi ayarlandıktan sonra 6 cm çaplı petri kaplarının her biri 30 gram toprak ile doldurulmuştur. Bir petrinin alanı 24 cm² olup, cm²'ye 50 IJ dozunda (ticari olarak uygulanan doz) *in vivo* ve *in vitro* ortamda elde edilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı bireyleri bırakılmıştır. Bir petriye yaklaşık olarak 1200 IJ dozu uygulanmıştır (Şekil 3.28).

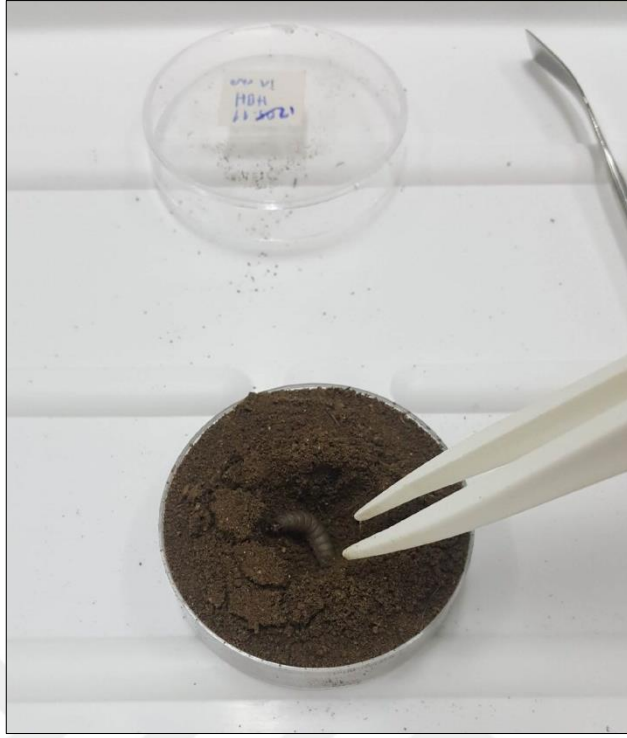


Şekil 3.28. Sayımı gerçekleşen IJ'lerin toprağa bırakılması (Susurluk ve Çakır, 2022)

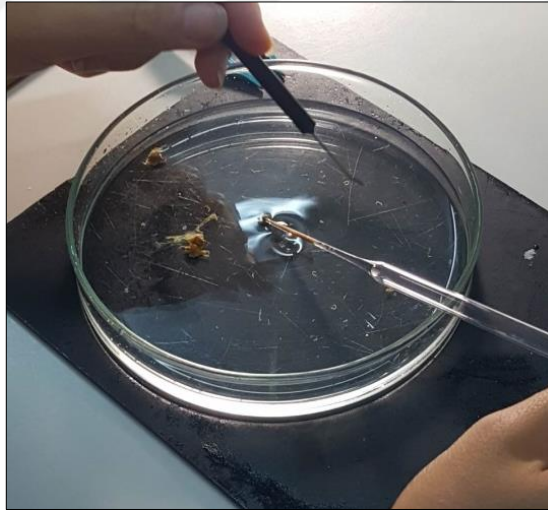


Şekil 3.29. IJ bırakılan petri kapları (Susurluk ve Çakır, 2022)

İnfektif juvenillerin bırakılmasının ardından nem kaybını engellemek adına petri kaplarının etrafı parafilm ile kapatılmıştır. Bu işlemin ardından 10 gün sonra beş petri kabı içerisine her bir petri kabına bir *G. mellonella* larvası konulmuş (Şekil 3.30) ve 2 gün sonra larvalar topraktan temizlenip disekte edilmiştir (Şekil 3.31).

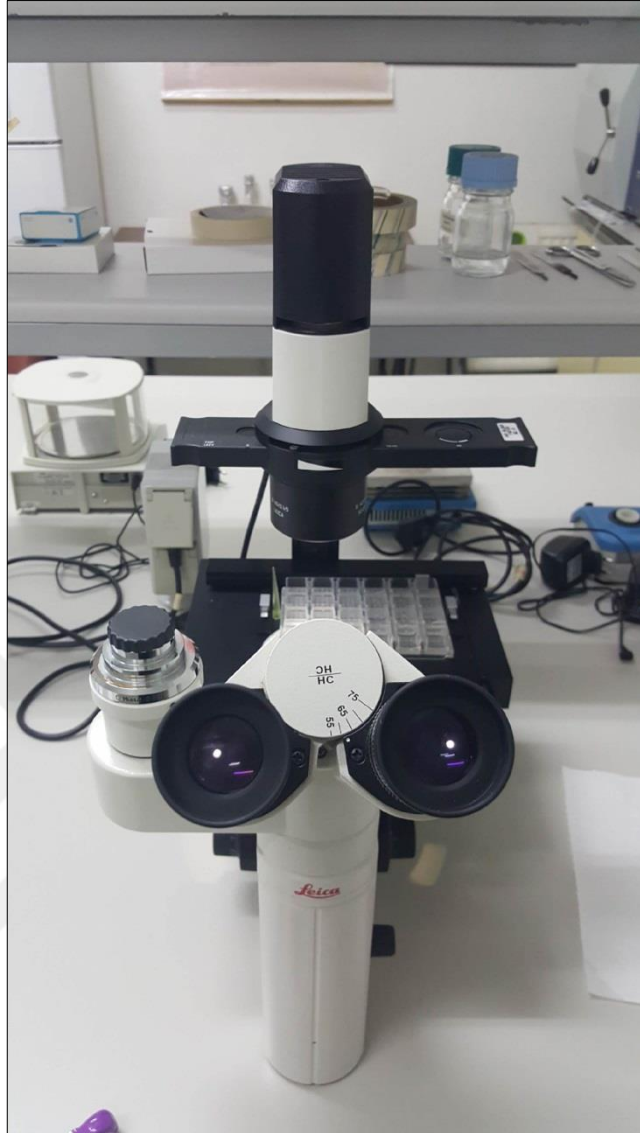


Şekil 3.30. *G. mellonella* larvasının toprağa bırakılması (Susurluk ve Çakır, 2022)



Şekil 3.31. İki gün sonra larvaların diseksiyonu (Susurluk ve Çakır, 2022)

Sayım kaplarına alınan disekte edilmiş larvaların içerisindeki IJ'ler inverted mikroskop ile sayılmıştır (Şekil 3.32). Her 10 günde petri içerisindeki *G. mellonella* larvası içerisinde disekte edilmiş IJ'lerin sayım işlemi 5 tekerrürlü yapılmış ve deneme 180 günde tamamlanmıştır.

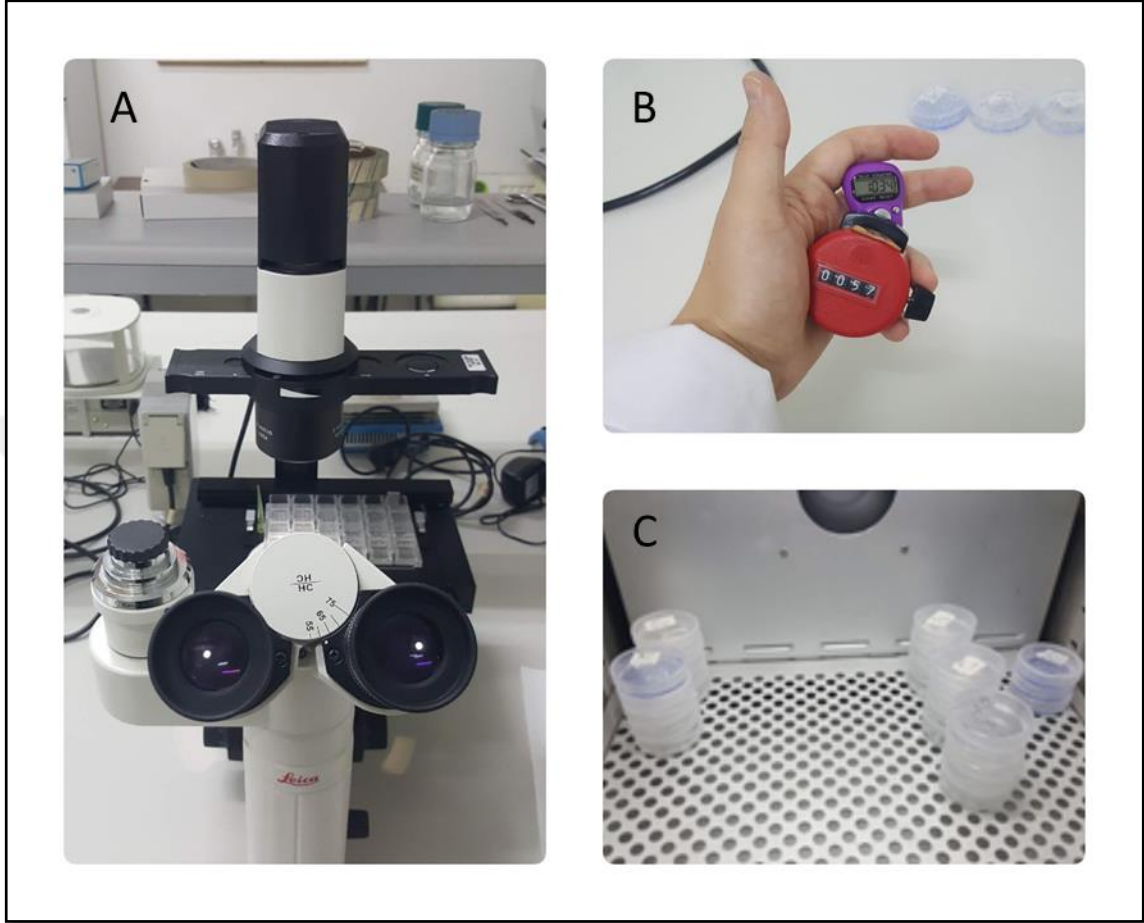


Şekil 3.32. Disekte işleminden sonra mikroskopta IJ'lerin sayımı (Susurluk ve Çakır, 2022)

3.4. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Depolanma Süresi

In vivo ve *in vitro* koşullarda üretimi gerçekleştirilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkının depolanma süresi, IJ'lerin belirli sıcaklık koşullarında ne kadar süre canlı kalabildiğini tespit etmek amacıyla yapılmıştır. Çalışmada sayım kabının içerisinde bulunan IJ'ler 3, 6, 9 ve 12 gün boyunca sırasıyla 8-12-16-20 ve 24 °C sıcaklıklara maruz bırakılmıştır. Inkübasyon süresi sonrası IJ'ler yeniden sayılarak EPN'lerin depolanma süresi tespit edilmiştir (Şekil 3.33). Depolama süresinin belirlenmesi

alışması her bir gün ve sıcaklık denemesi için 5 tekerrürlü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.



şekil 3.33. A. Inverted mikroskopta IJ sayımı B. Sayım aletleri C. İnkübasyona bırakılan IJ'ler (Susurluk ve akır, 2022)

3.5. İstatistiksel Analizler

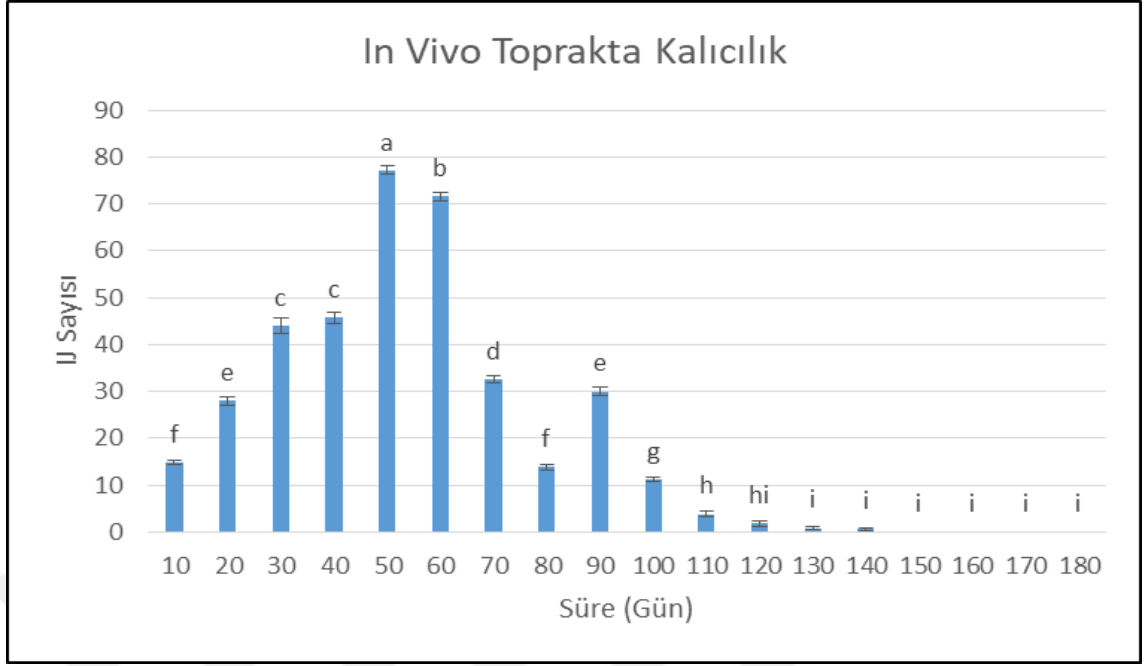
In vivo ve *in vitro* ortamda üretilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'lerinin toprakta kalıcılık ve depolama sürelerinin belirlenmesinde elde edilen verilerin analizinde tek yönlü ve faktöriyel ANOVA (Analysis of Variance) testi kullanılmıştır. Muamele ortalamalarının karşılaştırılmasında $\alpha = 0.05$ düzeyinde LSD (Least Significant Differences) testi uygulanmıştır. Tüm analizler JMP® 7 istatistik programı kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Toprakta Kalıcılığı

In vivo üretimden elde edilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'lerin toprakta kalıcılık süreleri (Şekil 4.1) arasında istatistiksel olarak önemli farklar bulunmuştur ($F = 1141,604$; $df = 17, 72$; $P = <0.0001$). Genel olarak, toprakta konukçusunu arayan *H. bacteriophora* HBH ırkı IJ'lerin, 140 gün boyunca *G. mellonella* larvalarını enfekte edebilme kabiliyeti gösterebildikleri tespit edilmiştir. *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'ler toprakta 140 gün ve daha fazla süre kaldıktan sonra, ortama bırakılan *G. mellonella* larvaları enfekte olmamış ve disekte edilen *G. mellonella* larvalarında herhangi bir IJ varlığı görülmemiştir (Şekil 4.1).

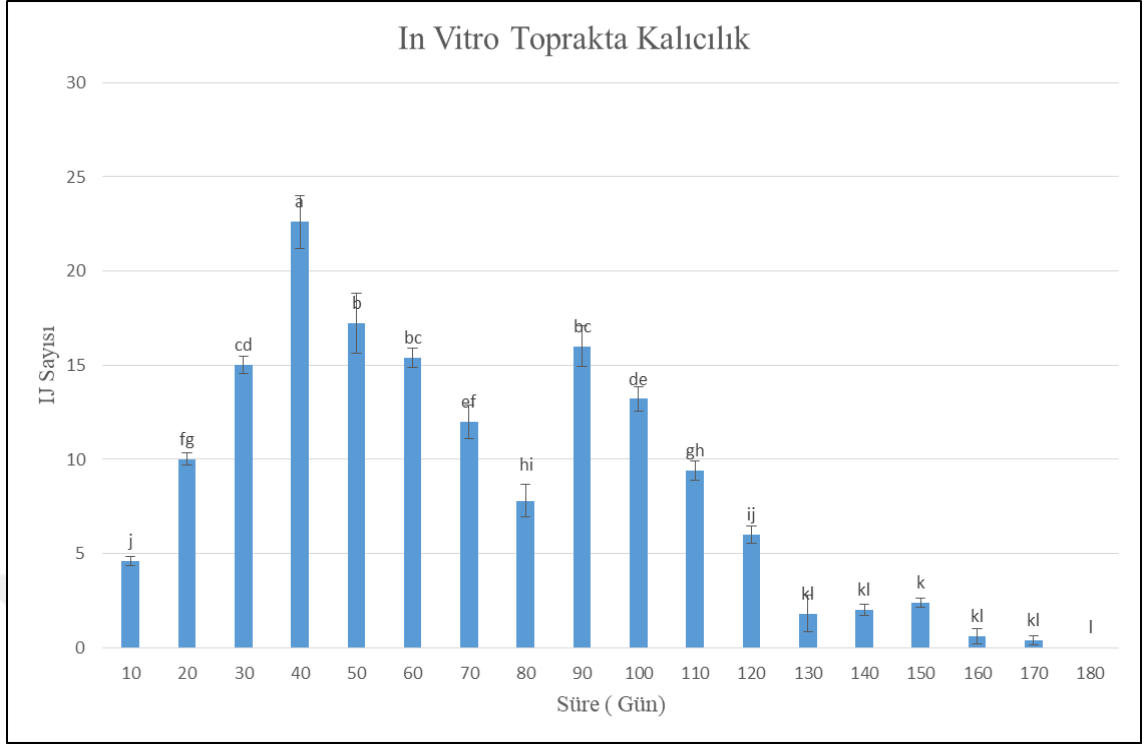
Heterorhabditis. bacteriophora HBH Hibrit ırkı IJ'ler toprağa bırakıldıktan sonra, 10'ar gün arayla (10 – 180 gün) ortama *G. mellonella* larvaları ilave edilmeye başlanmıştır. Ortama ilave edildikten sonra *G. mellonella* larvaları disekte edilerek içerisine giriş yapan *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ sayıları tespit edilmiştir. İstatistiksel açıdan *G. mellonella* larvalarına giriş yapan en yüksek IJ sayısı ortalama 77,2 olup, *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'ler toprağa bırakıldıktan 50 gün sonra ortama ilave edilen *G. mellonella* larvalarında tespit edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *In vivo* üretim ile gerçekleştirilen IJ'lerin toprakta kalıcılık süreleri

In vitro üretimden elde edilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'lerin toprakta kalıcılık süreleri (Şekil 4.2) arasında istatistiksel olarak önemli farklar bulunmuştur ($F = 84,4472$; $df = 17,72$; $P = <0.0001$). Genel olarak, toprakta konukçusunu arayan *H. bacteriophora* HBH ırkı IJ'lerin, 170 gün boyunca *G. mellonella* larvalarını enfekte edebilme kabiliyeti gösterebildikleri tespit edilmiştir. *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'ler toprakta 170 gün ve daha fazla süre kaldıktan sonra, ortama bırakılan *G. mellonella* larvaları enfekte olmamış ve disekte edilen *G. mellonella* larvalarında herhangi bir IJ varlığı görülmemiştir (Şekil 4.2).

Heterorhabditis bacteriophora HBH Hibrit ırkı IJ'ler toprağa bırakıldıktan sonra, onar gün arayla (10 – 180 gün) ortama *G. mellonella* larvaları ilave edilmeye başlanmıştır. Ortama ilave edildikten sonra *G. mellonella* larvaları disekte edilerek içerisine giriş yapan *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ sayıları tespit edilmiştir. İstatistiksel açıdan *G. mellonella* larvalarına giriş yapan en yüksek IJ sayısı ortalama 22,6 olup, *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'ler toprağa bırakıldıktan 40 gün sonra ortama ilave edilen *G. mellonella* larvalarında tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *In vitro* üretim ile gerçekleştirilen IJ'lerin toprakta kalıcılık süreleri

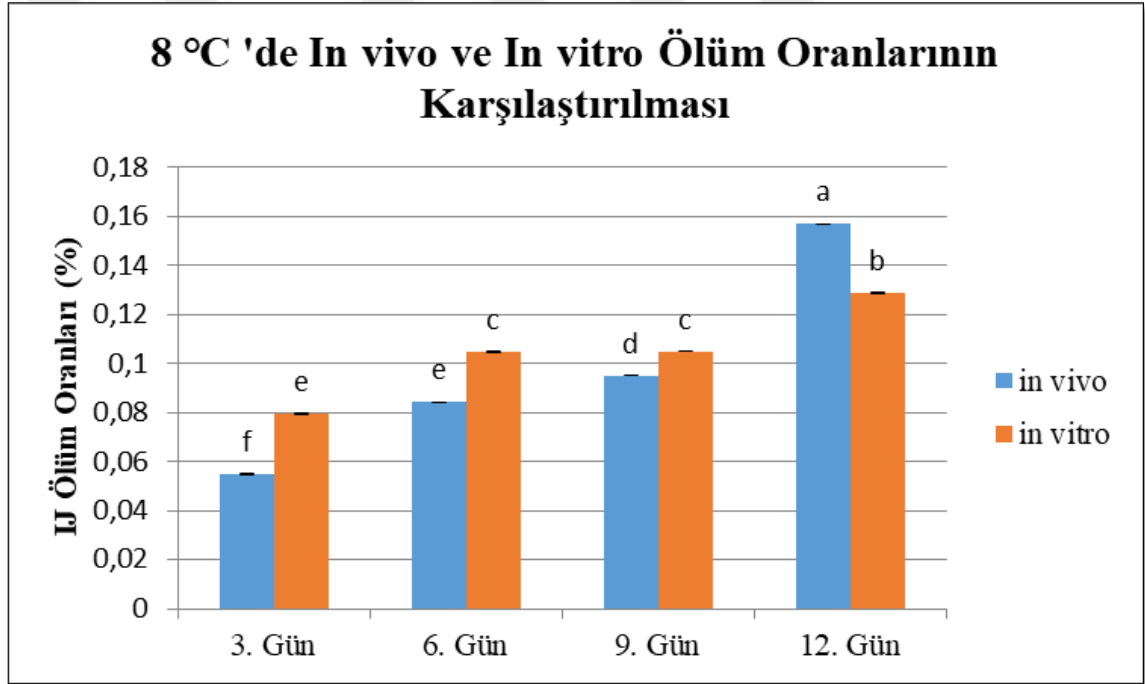
Tez çalışmasında toprakta kalıcılık denemesinin istatistiksel analizlerinin bulgularında *in vivo* üretim koşullarında elde edilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'lerinin *in vitro* koşullarda üretimi gerçekleştirilen Hibrit ırkın IJ'lerinden daha uzun süre toprakta kaldığı gözlemlenmiştir. *In vivo* metodu ile elde edilen IJ'ler, *G. mellonella* larvalarını enfekte edebilme açısından 140 gün boyunca toprak içerisinde etkinliğini sürdürebilmiş ve IJ'lerin enfekte yeteneğinin en yüksek olduğu süre 50. gün olarak tespit edilmiştir. *In vitro* metodu ile elde edilen IJ'ler ise, *G. mellonella* larvalarını enfekte edebilme açısından 170 gün boyunca toprak içerisinde etkinliğini sürdürebilmiş ve enfekte yeteneğinin en iyi olduğu süre 40. gün olarak tespit edilmiştir. *G. mellonella* içerisinde gelişen IJ birey sayısı açısından *in vivo* üretim metodunun (77,2 IJ / larva) *in vitro* üretime göre (22,6 IJ / larva) daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

4.2. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Depolanma Süresi

In vivo ve *in vitro* ortamlarında üretilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'ler ayrı bir şekilde ringer içeren petrilere alınıp, 8 °C sıcaklıkta sırasıyla 3, 6, 9 ve 12 gün boyunca

inkübatör içerisinde beklemeye bırakılmıştır (Şekil 4.3). 3., 6., 9. ve 12. günlerin sonunda IJ birey sayımı yapılmıştır. Genel olarak 8 °C sıcaklıkta bekleme süresi (gün) arttıkça, *in vivo* ve *in vitro* ortamlarında üretilen *H. bacteriophora* HBH ırkı IJ'lerin ölüm oranları istatistiksel olarak önemli seviyede yükseliş göstermiştir (F= 323,0135; df= 7, 32; P= <,0001).

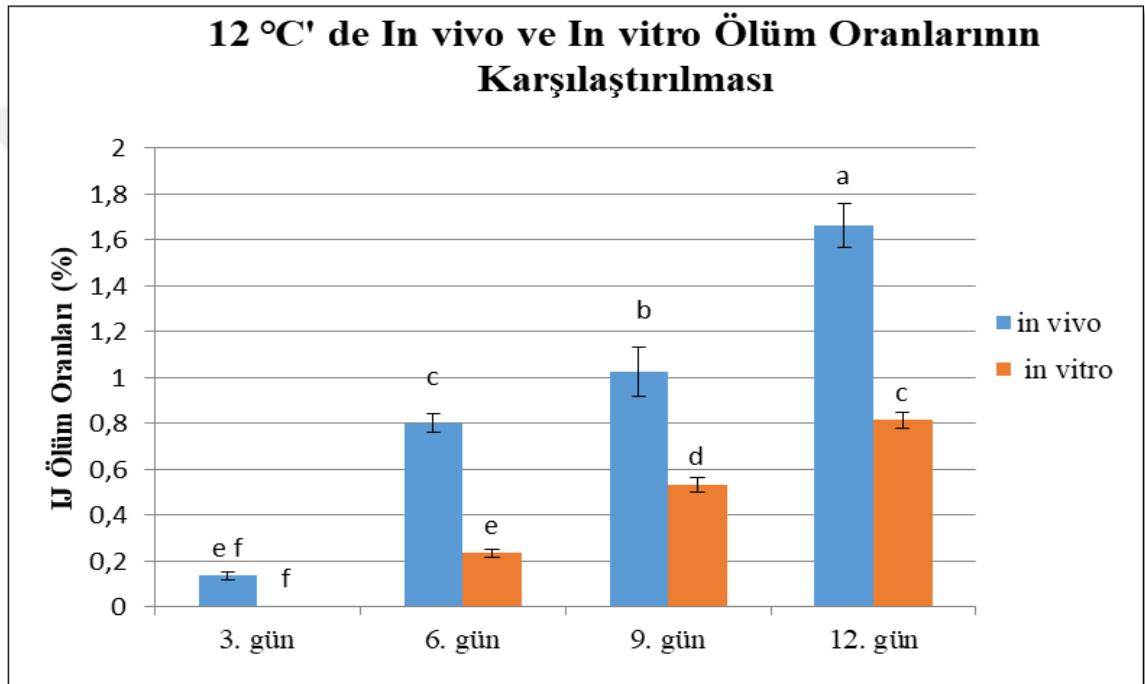
İstatistiksel açıdan en düşük ölüm oranı (% 0,0548), *in vivo* ortamında üretilen ve 8 °C sıcaklıkta inkübatörde 3 gün bekletilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'lerde tespit edilmiştir. İstatistiksel açıdan en yüksek ölüm oranı (% 0,157), *in vivo* ortamında üretilen ve 8 °C sıcaklıkta inkübatörde 12 gün bekletilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'lerde tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. 8 °C'de IJ'lerin ölüm oranlarının karşılaştırılması (F= 323,01; df= 7, 32; P= <,0001)

In vivo ve *in vitro* ortamlarında üretilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'ler ayrı bir şekilde ringer içeren petrilere alınıp, 12 °C sıcaklıkta sırasıyla 3, 6, 9 ve 12 gün boyunca inkübatör içerisinde beklemeye bırakılmıştır (Şekil 4.4). Genel olarak 12 °C sıcaklıkta bekleme süresi (gün) arttıkça, *in vivo* ve *in vitro* ortamlarında üretilen HBH Hibrit ırkı IJ'lerin ölüm oranları istatistiksel olarak önemli seviyede yükseliş göstermiştir (F= 95,80; df= 7, 32; P= <,0001).

İstatistiksel olarak en düşük ölüm oranları, *in vivo* ve *in vitro* ortamlarında üretilen ve 12 °C sıcaklıkta inkübatörde 3 gün bekletilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'lerde tespit edilmiştir. *In vivo* ve *in vitro* ortamlarında üretilen HBH Hibrit ırkı IJ'lerin, 3. gün sonunda elde edilen ölüm oranları arasında istatistiksel olarak fark gözlenmemiş olup sırasıyla % 0,136 ve % 0'dır. İstatistiksel açıdan en yüksek ölüm oranı (% 1,664), *in vivo* ortamında üretilen ve 12 °C sıcaklıkta inkübatörde 12 gün bekletilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'lerde tespit edilmiştir (Şekil 4.4).

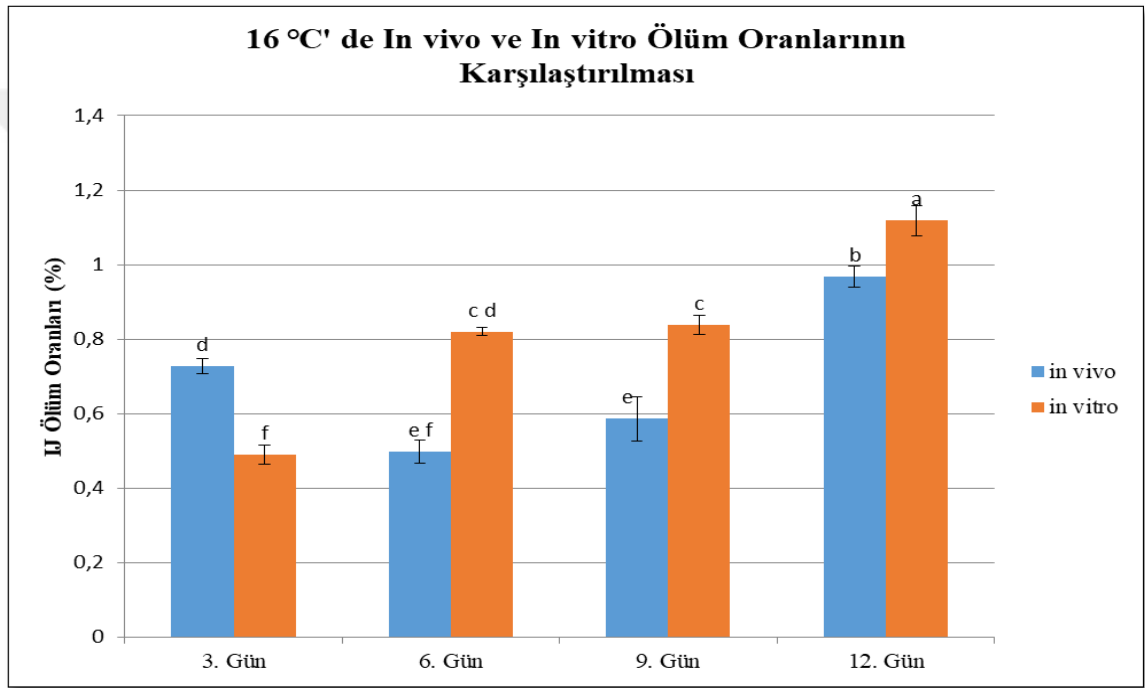


Şekil 4.4. 12 °C'de IJ'lerin ölüm oranlarının karşılaştırılması (F= 95,80; df= 7, 32;P= <,0001)

In vivo ve *in vitro* ortamlarında üretilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'ler ayrı bir şekilde ringer içeren petrilere alınıp, 16 °C sıcaklıkta sırasıyla 3, 6, 9 ve 12 gün boyunca inkübatör içerisinde beklemeye bırakılmıştır (Şekil 4.5). 3., 6., 9. ve 12. günlerin sonunda IJ birey sayımı yapılmıştır.

Genel olarak inkübatör içerisinde 16 °C sıcaklıkta 3, 6 ve 9 gün bekletilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'lere kıyasla, *in vivo* ve *in vitro* ortamlarında üretilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'lerin 12 gün sonundaki ölüm oranları istatistiksel olarak daha yüksek seviyede olup sırasıyla % 0,968 ve % 1,118'dir (F= 46,768; df= 7,

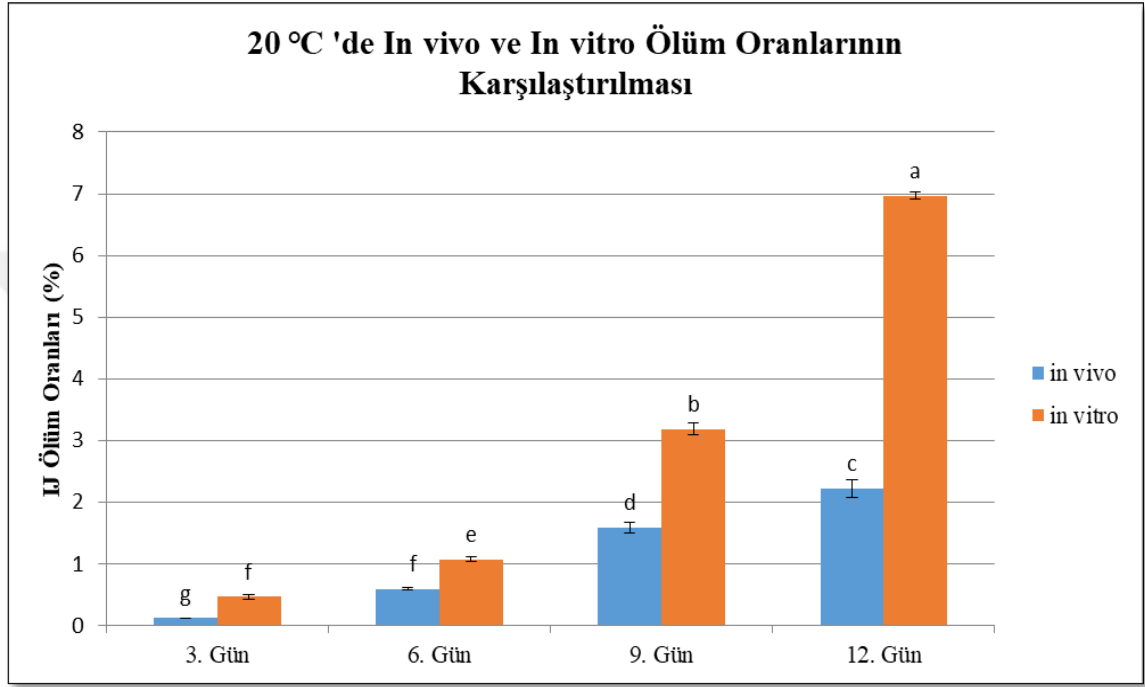
32; $P = <,0001$). İstatistiksel açıdan 16 °C sıcaklıkta en düşük ölüm oranları, *in vitro* ortamında üretilip inkübatörde 3 gün bekletilen ve *in vivo* ortamında üretilip inkübatörde 6 gün bekletilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'lerde tespit edilmiştir. *In vivo* ve *in vitro* ortamlarında üretilen *H. bacteriophora* HBH ırkı IJ'lerin sırasıyla ölüm oranları % 0,49 ve % 0,498 olup istatistiksel olarak fark yoktur (Şekil 4.5). İstatistiksel açıdan en yüksek ölüm oranı (% 1,118), *in vitro* ortamında üretilen ve 16 °C sıcaklıkta inkübatörde 12 gün bekletilen *H. bacteriophora* HBH ırkı IJ'lerde tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. 16 °C'de IJ'lerin ölüm oranlarının karşılaştırılması ($F = 46,768$; $df = 7, 32$; $P = <,0001$)

In vivo ve *in vitro* ortamlarında üretilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'ler ayrı bir şekilde ringer içeren petrilere alınıp, 20 °C sıcaklıkta sırasıyla 3, 6, 9 ve 12 gün boyunca inkübatör içerisinde beklemeye bırakılmıştır (Şekil 4.6). 3., 6., 9. ve 12. günlerin sonunda IJ'lerin sayımı yapılmıştır. Genel olarak 20 °C sıcaklıkta bekleme süresi (gün) arttıkça, *in vivo* ve *in vitro* ortamlarında üretilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'lerin ölüm oranları istatistiksel olarak önemli seviyede yükseliş göstermiştir ($F = 903,02$; $df = 7, 32$; $P = <,0001$).

İstatistiksel açıdan en düşük ölüm oranı (% 0,116), *in vivo* ortamında üretilen ve 20 °C sıcaklıkta inkübatörde 3 gün bekletilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'lerde tespit edilmiştir. İstatistiksel açıdan en yüksek ölüm oranı (% 6,968), *in vitro* ortamında üretilen ve 20 °C sıcaklıkta inkübatörde 12 gün bekletilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'lerde tespit edilmiştir (Şekil 4.6).

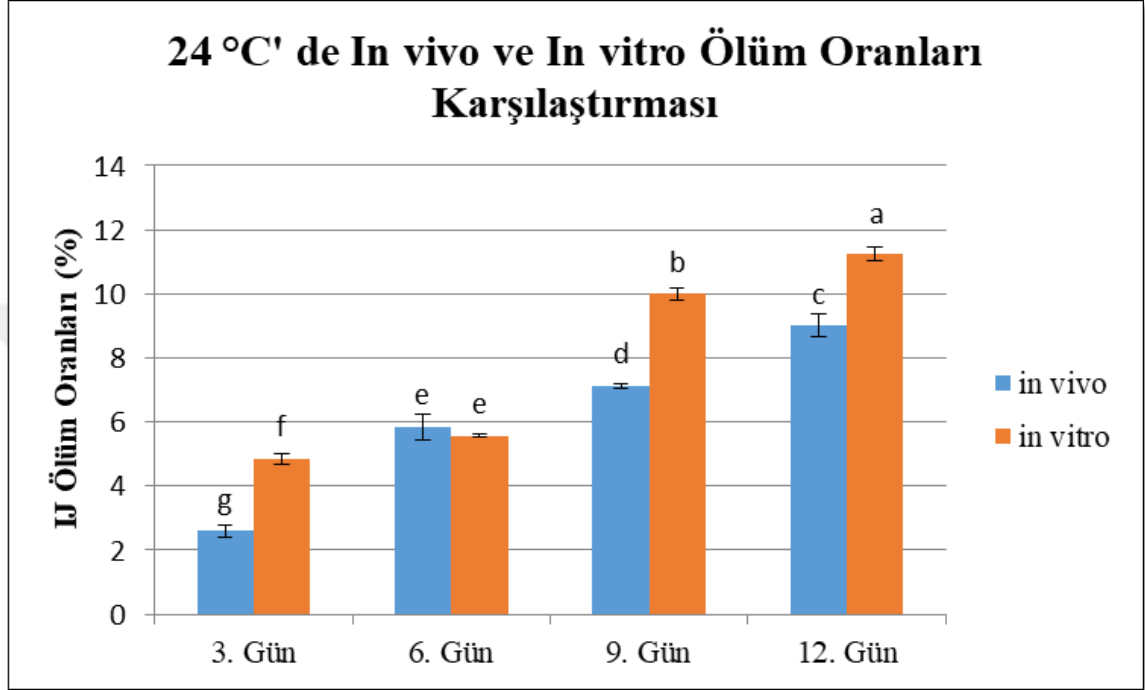


Şekil 4.6. 20 °C'de IJ'lerin ölüm oranlarının karşılaştırılması (F= 903,02; df= 7, 32; P= <,0001)

In vivo ve *in vitro* ortamlarında üretilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'ler ayrı bir şekilde ringer içeren petrilere alınıp, 24 °C sıcaklıkta sırasıyla 3, 6, 9 ve 12 gün boyunca inkübatör içerisinde beklemeye bırakılmıştır (Şekil 4.7). 3., 6., 9. ve 12. günlerin sonunda IJ'lerin sayımı yapılmıştır. Genel olarak 24 °C sıcaklıkta bekleme süresi (gün) arttıkça, *in vivo* ve *in vitro* ortamlarında üretilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'lerin ölüm oranları istatistiksel olarak önemli seviyede yükseliş göstermiştir (F= 151,54; df= 7, 32; P= <,0001).

İstatistiksel açıdan en düşük ölüm oranı (% 2,602), *in vivo* ortamında üretilen ve 24 °C sıcaklıkta inkübatörde 3 gün bekletilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'lerde tespit edilmiştir. İstatistiksel açıdan en yüksek ölüm oranı (% 11,238), *in vitro* ortamında

üretilen ve 24 °C sıcaklıkta inkübatörde 12 gün bekletilen *H. bacteriophora* HBH ırkı IJ'lerde tespit edilmiştir (Şekil 4.7). *In vitro* ve *in vivo* ortamlarında üretilip inkübatörde 24 °C sıcaklıkta 6 gün bekletilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'lerin ölüm oranları istatistiksel olarak fark olmayıp sırasıyla % 5,572, % 5,846'dır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. 24 °C'de IJ'lerin ölüm oranlarının karşılaştırılması (F= 151,54; df= 7, 32; P= <,0001)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Entomopatojen nematodlar (EPN) çok geniş bir konukçu dizisine sahip oldukları için biyolojik mücadelede böcek patojeni organizmaları olarak yer almaktadırlar (Grewal, Ehlers & Shapiro-Ilan, 2005). Özellikle EPN'ler, sentetik pestisitlerin uygulanma zorluğu, çevreye karşı ciddi tehdit oluşturması sebebiyle toprak altı zararlılarına karşı en etkili çözüm yollarından biri olarak bilinmektedir. EPN'ler uygulanmadan önce belirli depolama koşullarına göre saklanmaktadır. Uygulandıktan sonra maksimum süre uygulandığı alanda etkinliğini sürdürmesi beklenmektedir.

Entomopatojen nematodlar (EPN) buzdolabında özel ortamlarda aylarca depolanabilmektedir. Depolama yaparken en önemli koşul ortamın sıcaklığıdır. Bu tez çalışmasında *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'lerinin laboratuvar koşullarında toprakta infektivite yetenekleri ve canlılıklarını devam ettirmelerine bağlı yaşam koşulları test edilmiştir. Bunun yanı sıra, *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'lerinin optimum depolama koşullarında sıcaklığa bağlı yaşam koşulları değerlendirilmiştir.

Heterorhabditis bacteriophora HBH Hibrit ırkı IJ'ler laboratuvarında *in vivo* ve *in vitro* olmak üzere iki ayrı metot ile üretilmiştir. Üretilen IJ'ler, kalıcılık süresini belirlemek amacıyla toprak içeren ortamlara ilave edilmiştir. *G. mellonella* içerisinde gelişen IJ birey sayısı açısından *in vivo* üretim metodunun *in vitro* katı ortamdaki üretim metoduna göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Toprağa uygulanacak olan *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkının toprakta kalıcılık süresi daha fazla olması sebebiyle *in vitro* koşullarda üretimi artırılabilir.

Entomopatojen nematodların (EPN) toprakta hayatta kalma sürelerini belirlemek amacıyla Khan ve diğerleri (2016) *Steinernema asiaticum*, *S. glaseri*, *Heterorhabditis indica* ve *H. bacteriophora* ile çalışma yapmıştır. 7 günlük sürede EPN'lerin oranı % 1,87 ile % 7,83 arasında değişmiştir ve istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edilmemiştir. 7 gün sonra ciddi şekilde EPN ölümleri olmuştur. Ancak bu tez çalışmasında, 40-50 gün boyunca süre ilerledikçe, IJ etkinliği artmıştır.

Susurluk (2013), EPN'lerin topraktaki kalıcılığını değerlendirmek için 4 ay boyunca arazi denemesi yapmıştır. Sonuçlara göre, ısıya toleranslı tür toprakta daha kalıcı

olmuştur. Nouh'un (2016) yaptığı çalışmada; EPN'lerin iki türünün *H. bacteriophora* ve *Steinernema abbasi*'nin *G. mellonella*'nın son dönem larvalarına karşı patojenitesi ve kalıcılığı değerlendirilmiştir. Her iki türün hayatta kalması ve IJ'lerin üretimi incelenmiştir. Maruziyet süresi bir haftaya yükseldiğinde ölüm oranı da artmıştır. Ancak larva başına kullanılan IJ sayısı, bu tez çalışmasına kıyasla farklılık göstermektedir.

Benzer bir çalışmada *Heterorhabditis megidis*'in topraktaki kalıcılığı 4 haftalık bir süre boyunca incelenmiştir. *T. molitor* larvalarının enfekte edebilme açısından 0, 2, 14 ve 28. günlerde, IJ'lerin topraktaki canlılık süreleri belirlenmiştir. *T. molitor*'un ölüm oranı 0. günden 2. güne artmış, ancak 28. günden sonra ölüm oranı düşmüştür. Bu tez çalışmasında ise *H. bacteriophora* IJ'lerinin topraktaki kalıcılığı 6 ay boyunca incelenmiştir. 10-180. günlerde, *G. mellonella* larvalarının enfekte edebilme açısından IJ'lerin topraktaki canlılık süreleri belirlenmiştir. Benzer bir şekilde IJ sayısı 40-50 günden sonra düşüş göstermiştir.

Lalramliana ve Yadav (2016) EPN'lerin depolanmasıyla ilgili bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada deneme materyali olarak üç EPN türü (*H. indica*, *S. thermophilum* ve *S. glaseri*) kullanılmıştır. Bu türler üzerinde depolama sıcaklığı, IJ'lerin hayatta kalması ve etkinliği test edilmiştir. IJ'lerin infektivitesi laboratuvar koşullarında petri kapları içerisinde *G. mellonella* larvalarındaki ölüm oranları ile tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, denemede kullanılan üç EPN türünde depolama sıcaklığının IJ'lerde hayatta kalmayı önemli ölçüde etkilediği gözlemlenmiştir. 5 °C'de 15 gün depolama sonucunda IJ'lerin hayatta kalma oranının % 74-86 olduğu tespit edilmiştir. Ancak aynı sıcaklıkta 30 günlük depolamadan sonra *H. indica* ve *S. thermophilum* için hayatta kalma oranı (% 28-32) büyük ölçüde düşmüştür. 25 °C'de incelenen üç EPN türünün IJ'lerinin hayatta kalma süresinin 120 güne kadar olduğu gözlemlenmiştir. *S. thermophilum* ve *S. glaseri* sırasıyla 15 ve 30 günlük denemede IJ'lerin hayatta kalma oranının (>% 75) daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Benzer bir şekilde bu tez çalışmasında, depolama koşullarındaki çalışmamızda *in vivo* ve *in vitro* katı agar metodu ile üretimi gerçekleştirilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı inkübatörde 8,12,16,20 ve 24 °C'lerde 3,6,9 ve 12 gün sırasıyla bekletilmiştir. İstatistiksel açıdan en düşük ölüm oranı (% 0,0548), *in vivo* ortamında üretilen ve 8 °C

sıcaklıkta inkübatörde 3 gün bekletilen *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkı IJ'lerde tespit edilmiştir. Genel olarak sıcaklık derecesi ve sıcaklığa maruz kalınan süre artıkça, IJ'lerdeki ölüm oranları da artmıştır.

Strauch ve diğerlerinin (2000) yaptığı çalışmada, EPN'lerin canlılık oranı 5-25°C arasındaki sıcaklıklarda test edilmiştir. *H. indica*'nın hayatta kalabileceği optimum sıcaklık 15°C'de iken en fazla ölüm oranının 5°C'de olduğu tespit edilmiştir. *H. bacteriophora* en iyi 7,5°C'de ve en az 25°C'de canlılığını sürdürmüştür. Bu tez çalışmasında ise, *H. bacteriophora* için optimum değerler 8 °C sıcaklıkta tespit edilmiştir. Farklı bir çalışmada, *H. sonorensis* IJ'lerinin 24 hafta depolanmasından sonra çeşitli depolama sıcaklıklarında (10-25 °C) yüksek canlılık oranına (% 80'in üzerinde) sahip olduğu tespit edilmiştir (Kusakabe vd., 2019). Bu çalışmada ise 8-24 °C sıcaklığa maruz bırakılan EPN'lerin ölüm oranı % 0,0548- % 11,238 arasında olduğu gözlemlenmiştir.

Acevedo ve Pablo, (2006) altı EPN türünden, üç Steinernematid *S. carpocapsae*, *S. glaseri* ve *S. arenarium* türlerinin depolama çalışmalarında hayatta kalma oranları belirlenmiştir. Üç heterorhabdit: *H. bacteriophora*, *H. bacteriophora* HP88 ve *H. baujardi* türleri ise denemede, beş farklı sıcaklıkta (8, 12, 16, 20 ve 24 °C'de) ve iki farklı dozda (1000 ve 10000 IJ/ ml) ve iki farklı süre boyunca (15 gün ve 3 ay) kullanılmıştır. Bu tez çalışmasına benzer bir şekilde Heterorhabdit'lerin 20 ve 24 °C'lik yüksek sıcaklıklarda % 78 ile % 92 arasında yüksek oranda hayatta kaldığı gözlemlenmiştir.

Bu tez çalışmasında, *in vivo* ve *in vitro* metodu ile üretilen EPN'ler aynı türe sahip olsa bile, toprakta kalıcılık ve etkinlik bakımından istatistiksel olarak önemli farklılıklar gösterebilecekleri tespit edilmiştir. Ayrıca EPN'lerin depolanmasında sıcaklığın kritik bir öneme sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen veriler biyolojik mücadele kapsamında, kitlesel EPN üretimini hedefleyen çalışmalara yön gösterici niteliğinde olabilir.

KAYNAKLAR

- Acevedo, M., & Pablo, J. (2006). Effect of temperature, concentration and storage time on the survival of entomopathogenic nematodes. *Revista Colombiana de Entomología*, 32(1), 24–30.
- Akhurst, R. J. (1980). Morphological and Functional Dimorphism in *Xenorhabdus* spp., Bacteria Symbiotically Associated with the Insect Pathogenic Nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *Journal of General Microbiology*, 121(2), 303–309. <https://doi.org/10.1099/00221287-121-2-303>
- Aktümsek, A., Nurullahoğlu, Z. Ü., & Kalyoncu, L. (2000). *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera:Pyralidae) Larva ve Pupunun Yağ Asidi Bileşimi. *S. Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 17, 29–32.
- Boemare, N. E., Akhurst, R. J., & Mourant, R. G. (1993). DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43(2), 249–255. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-2-249/CITE/REFWORKS>
- Boff, M. I. C., Wiegers, G. L., & Smits, P. H. (2000). Influences of host size and host species on the infectivity and development of *Heterorhabditis megidis* (strain NLH-E87.3). *BioControl*, 45(4), 469–482. <https://doi.org/10.1023/A:1026560208285>
- Burges, H. D. (2012). Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments.
- Charriere, J.-D., & Imdorf, A. (1999). Protection of honey combs from wax moth damage. *American bee journal*, 139(627–630), 629.
- Dowds, B. C. A., & Peters, A. (2002). Virulence Mechanisms. *Entomopathogenic nematology*, 1(1), 79–98.
- Duchaud, E., Rusniok, C., Frangeul, L., Buchrieser, C., Givaudan, A., Taourit, S., ... Kunst, F. (2003). The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nature Biotechnology*, 21(11), 1307–1313. <https://doi.org/10.1038/nbt886>
- Dye, D. W. (1968). A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The 'amylovora' group. *New Zealand Journal of Science*, 11(4), 590–607.
- Ehlers, R.-U. (2003). Biocontrol nematodes. İçinde *Environmental Impacts of Microbial Insecticides*. (ss. 177–220).
- Ehlers, R., & Peters, A. (2010). Entomopathogenic nematodes in biological control: feasibility, perspectives and possible risks. İçinde H. M. T. Hokkanen, And, & J. M. Lynch (Ed.), *Biological Control Benefits and Risks* (ss. 119–136). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511661730.013>
- Ehlers, R. U., & Shapiro-Ilan, D. I. (2005). Mass Production. *Nematodes as biocontrol agents*, 65–78. <https://doi.org/10.1079/9780851990170.0065>
- Ehlers, Ralf-Udo, & Peters, A. (1995). Entomopathogenic nematodes in biological control: feasibility, perspectives and possible risks: *Biological Control, Benefits*

- and Risks. *Plant and microbial biotechnology research series*, 119–136.
- Ehlers, Ralf Udo. (1996). Current and future use of nematodes in biocontrol: Practice and commercial aspects with regard to regulatory policy issues. *Biocontrol Science and Technology*, 6(3), 303–316. <https://doi.org/10.1080/09583159631299>
- Ehlers, Ralf Udo. (2001). Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 623–633. <https://doi.org/10.1007/s002530100711>
- Ehlers, Ralf Udo, Lunau, S., Krasomil-Osterfeld, K., & Osterfeld, K. H. (1998). Liquid culture of the entomopathogenic nematode-bacterium-complex *Heterorhabditis megidis/Photorhabdus luminescens*. *BioControl* 1998 43:1, 43, 77–86. <https://doi.org/10.1023/A:1009965922794>
- Endo, B. Y., & Nickle, W. R. (1994). Ultrastructure of the Buccal Cavity Region and Oesophagus of the Insect Parasitic Nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*. *Nematologica*, 40(1–4), 379–398. <https://doi.org/10.1163/003525994X00274>
- Gaugler, R. (1990). Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. İçinde H.K.KAYA (Ed.), *Google Books* (ss. 365–366). CRC Press.
- Gaugler, R., Brown, I., Shapiro-Ilan, D., & Atwa, A. (2002). Automated technology for *in vivo* mass production of entomopathogenic nematodes. *Biological Control*, 24, 199–206.
- Grewal, P. S., & Georgis, R. (1998). Entomopathogenic nematodes. In “Methods in Biotechnology”. *Biopesticides: Use and Delivery*, 5.
- Grewal, Parwinder S., Ehlers, R.-U., & Shapiro-Ilan, D. I. (2005). Nematode Morfology and Taxonomy. İçinde *Nematodes as biocontrol agents* (ss. 3–40).
- Grewal, Parwinder S., Selvan, S., & Gaugler, R. (1994). Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: Niche breadth for infection, establishment, and reproduction. *J .Therm. Biol.*, 19(4), 245–253. [https://doi.org/10.1016/0306-4565\(94\)90047-7](https://doi.org/10.1016/0306-4565(94)90047-7)
- Griffin, C. T., Downes, M. J., & Block, W. (1990). Tests of Antarctic soils for insect parasitic nematodes. *Antarctic Science*, 2(3), 221–222. <https://doi.org/10.1017/S095410209000030X>
- Gulati, R., & Kaushik, H. (2004). Enemies of honeybees and their management. *Agricultural Reviews*, 25(3), 189–200.
- Hass, B., Griffin, C. T., & Downes, M. J. (1999). Persistence of *Heterorhabditis* Infective Juveniles in Soil: Comparison of Extraction and Infectivity Measurements. *Journal of Nematology*, 31(4), 508–516.
- Hominick, W. M. (2002). Biogeography. İçinde *Entomopathogenic nematology* (ss. 115–143). CABI Publishing.
- Hominick, W. M., Reid, A. P., Bohan, D. A., & Briscoe, B. R. (1996). Entomopathogenic Nematodes: Biodiversity, Geographical Distribution and the Convention on Biological Diversity. *Biocontrol Science and Technology*, 6(3), 317–331. <https://doi.org/10.1080/09583159631307>
- Kaya, H. K., & Stock, S. P. (1997). Techniques in insect nematology: Manual of

- techniques in insect pathology, Ed.: Lacey, L.A., Academic Press, London, UK. *Manual of Techniques in Insect Pathology*, 1, 281–324. [https://doi.org/10.1016.B978-012432555-5/50016-6](https://doi.org/10.1016/B978-012432555-5/50016-6).
- Khan, S. A., Javed, N., Ali Anwar, S., Ul Haq, I., Naveed, K., Ullah, Z., & Safdar, A. (2016). Survival of Entomopathogenic Nematodes in Sterilized vs Non-Sterilized Soil. *Pakistan J. Zool*, 48(5), 1349–1352.
- Kilinçer, N., Yiğit, A., Kazak, C., Kubilay Er, M., Kurtuluş, A., & Uygun, N. (2010). Teoriden Pratiğe Zararlılarla Biyolojik Mücadele. *Türkiye biyolojik mücadele dergisi*, 1(1), 15–60.
- Klein, M. G. (1990). Efficacy Against Soil-Inhabiting Insect Pests. İçinde *Entomopathogenic nematodes in Biological Control* (1. baskı, ss. 22–38). CRC Press.
- Koltai, H., Glazer, L., & Segal, D. (1995). Reproduction of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976: hermaphroditism vs amphimixis. *Fundam. appl. Nematol*, 18(1), 55–61.
- Kusakabe, A., Peterson, B. F., Rivera Orduño, B., & Stock, S. P. (2019). Ecological characterization of *Heterorhabditis sonorensis* (Caborca strain) (Nematoda: Heterorhabditidae), an entomopathogenic nematode from the Sonoran Desert. *Zoology*, 135, 125689. <https://doi.org/10.1016/J.ZOOL.2019.05.001>
- Kvvs, K. K., Yadav, S., & Patil, J. (2020). *In vitro* mass production of entomopathogenic nematodes on solid media: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 8(3), 565–570.
- Kwadha, C. A., Ong’amo, G. O., Ndegwa, P. N., Raina, S. K., Fombong, A. T., Stout, M. J., Beuzelin, J. M. (2017). The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. *Insects*, 8(2), 61. <https://doi.org/10.3390/INSECTS8020061>
- Lacey, L. A., & Georgis, R. (2012). Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production. *Journal of Nematology*, 44(2), 218–225.
- Lalramliana, & Yadav, A. K. (2016). Effects of storage temperature on survival and infectivity of three indigenous entomopathogenic nematodes strains (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Meghalaya, India. *Journal of Parasitic Diseases*, 40(4), 1150–1154. <https://doi.org/10.1007/s12639-014-0639-8>
- Lewis, E. E., Gaugler, R., & Harrison, R. (1992). Entomopathogenic nematode host finding: response to host contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitology*, 105(2), 309–315. <https://doi.org/10.1017/S0031182000074230>
- Lewis, Edwin E., & Clarke, D. J. (2012). Nematode Parasites and Entomopathogens. *Insect Pathology*, (2), 395–424. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384984-7.00011-7>
- Lewis, Edwin E., & Grewal, P. S. (2005). Interactions with plant-parasitic nematodes. İçinde *Nematodes as Biocontrol Agent*. <https://doi.org/10.1079/9780851990170.0349>
- Lunau, S., Stoessel, S., Schmidt-Peisker, A. J., & Ehlers, R. U. (1993). Establishment of Monoxenic Inocula for Scaling Up *in vitro* Cultures of the Entomopathogenic

- Nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp. *Nematologica*, 39(1–4), 385–399. <https://doi.org/10.1163/187529293X00330>
- McMullen, J. G., & Stock, S. P. (2014). *In vivo* and *in vitro* rearing of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae). *Journal of Visualized Experiments*, (91), 1–7. <https://doi.org/10.3791/52096>
- Nielsen, R. A., & Brister, C. D. (1979). Greater Wax Moth: Behavior of Larvae. *Annals of the Entomological Society of America*, 72(6), 811–815. <https://doi.org/10.1093/AESA/72.6.811>
- Nouh, G. M. (2016). Impact of Sandy Soil on Persistence, Host Finding and Pathogenicity of Entomopathogenic Nematodes. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 26(2), 293–297.
- Özaktan, H., Aysan, Y., Yıldız, F., & Kınay, P. (2010). Fitopatolojide Biyolojik Mücadele. *Türk. biyo. мү. derg*, 1(1), 61–78.
- Paddock, F. B. (1918). The beemoth or waxworm. İçinde *Texas Agricultural and Mechanical College Station. TX. USA*.
- Pal, K. K., & Gardener, B. M. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*, 25(1), 2–3. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>
- Peters, A. (1996). The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations. *Biocontrol Science and Technology*, 6(3), 389–402. <https://doi.org/10.1080/09583159631361>
- Ringer, S. (1882). Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle. *The Journal of Physiology*, 3(5–6), 380. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1882.SP000111>
- Rovesti, L., & Deseö, K. V. (1990). Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* Weiser and *S. feltiae* Filipjev (Nematoda: Steinernematidae). *Nematologica*, 36(2), 237–245.
- Shapiro-Ilan, D. I., Han, R., & Qiu, X. (2014). Production of Entomopathogenic Nematodes. İçinde *Mass Production of Beneficial Organisms: Invertebrates and Entomopathogens* (ss. 321–355). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391453-8.00010-8>
- Shapiro-Ilan, D. I., Lewis, E. E., Behle, R. W., & McGuire, M. R. (2001). Formulation of Entomopathogenic Nematode-Infected Cadavers. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78, 17–23. <https://doi.org/10.1006/jipa.2001.5030>
- Shapiro-Ilan, D. I., & Gaugler, R. (2002). Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 137–146. <https://doi.org/10.1038/SJ/JIM/7000230>
- Stock, S. P., Griffin, C. T., & Chaerani, R. (2004). Morphological and molecular characterisation of *Steinernema hermaphroditum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Indonesia, and its phylogenetic relationships with other members of the genus. *Nematology*, 6(3), 401–412. <https://doi.org/10.1163/1568541042360555>
- Strauch, O., Niemann, I., Neumann, A., Schmidt, A. J., Peters, A., & Ehlers, R. U.

- (2000). Storage and formulation of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis indica* and *H. bacteriophora*. *BioControl*, 45(4), 483–500. <https://doi.org/10.1023/A:1026528727365>
- Strauch, Olaf, Stoessel, S., & Ehlers, R.-U. (1994). Culture conditions define automictic or amphimictic reproduction in entomopathogenic rhabditid nematodes of the genus *Heterorhabditis*. *Fundam. appl. Nematol.*, 17(6), 575–582.
- Susurluk, A., Dix, I., Stackebrandt, E., Strauch, O., Wyss, U., & Ehlers, R. U. (2001). Identification and ecological characterisation of three entomopathogenic nematode-bacterium complexes from Turkey. *Nematology*, 3(8), 833–841. <https://doi.org/10.1163/156854101753625326>
- Susurluk, A. and Ehlers, R.-U. (2008). Field persistence of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* in different crops. *BioControl*, 53: 627–641
- Susurluk, I. A. (2013). Persistence and foraging behaviour of heat tolerant *Heterorhabditis bacteriophora* strain in soil. *Russian Journal of Nematology*, 21(1), 51–57.
- Susurluk, I. A., Unlu, I. O., & Kepenekci, I. (2003). Host finding behavior of two different Turkish isolates of entomopathogenic nematode species, *Heterorhabditis bacteriophora*, Poinar 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Turkish Journal of Biology*, 27(4), 203–207.
- Vashisth, S., Chandel, Y. S., & Sharma, P. K. (2013). Entomopathogenic nematodes-A review. *Agricultural Reviews*, 34(3), 163–175. <https://doi.org/10.5958/j.0976-0741.34.3.001>
- Weisner, A. (1993). *Die Induktion der Immunabwehr eines Insekts (Galleria mellonella, Lepidoptera) durch synthetische Materialien und arteigene Haemolymphfaktoren* (Doctoral dissertation, Verlag nicht ermittelbar).
- White, G. F. (1927). A Method for Obtaining Infective Nematode Larvae from Cultures. *Scientific Apparatus and Laboratory Methods*, 66(1709), 302–303. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.66.1709.302.B>
- Woodring, J. L., & Kaya, H. K. (1988). Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: a handbook of biology and techniques. *Southern cooperative series bulletin (USA)*, (331), 30.
- Wouts, W. M. (1981). Mass Production of the Entomogenous Nematode *Heterorhabditis heliothidis* (Nematoda: Heterorhabditidae) on Artificial Media. *Journal of nematology*, 13(4), 467–469.
- Zehnder, G., Gurr, G. M., Kühne, S., Wade, M. R., Wratten, S. D., & Wyss, E. (2006). Arthropod Pest Management in Organic Crops. *Annual Review of Entomology*, 52, 57–80. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ENTO.52.110405.091337>
- Zervos, S., Johnson, S. C., & Webster, J. M. (1991). Effect of temperature and inoculum size on reproduction and development of *Heterorhabditis heliothidis* and *Steinernema glaseri* (Nematoda: Rhabditoidea) in *Galleria mellonella*. *Canadian Journal of Zoology*, 69(5), 1261–1264.