



**ENTOMOPATOJEN NEMATOD *Heterorhabditis  
bacteriophora* HBH HİBRİT İRKİNİN *IN VIVO* VE *IN  
VITRO* ÜRETİM SONRASI YÜKSEK SICAKLIĞA VE  
KURAKLIĞA TOLERANS FARKLILIKLARININ  
ARAŞTIRILMASI**

**Elif Özge DÜZENLİ**



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENTOMOPATOJEN NEMATOD *Heterorhabditis bacteriophora* HBH HİBRİT  
IRKININ *IN VIVO* VE *IN VITRO* ÜRETİM SONRASI YÜKSEK SICAKLIĞA  
VE KURAKLIĞA TOLERANS FARKLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI**

**Elif Özge DÜZENLİ**  
0000-0002-4328-4977

Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK  
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

BURSA – 2021  
Her Hakkı Saklıdır

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ENTOMOPATOJEN NEMATOD *Heterorhabditis bacteriophora* HBH HİBRİT  
IRKININ *IN VIVO* VE *IN VITRO* ÜRETİM SONRASI YÜKSEK SICAKLIĞA VE  
KURAKLIĞA TOLERANS FARKLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI

**Elif Özge DÜZENLİ**

Bursa Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Bitki Koruma Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK

Biyolojik mücadele içerisinde önemli bir yere sahip olan entomopatojen nematodlar (EPN) üzerinde yapılan çalışmalar ve ticari üretimler, 1970’li yıllardan günümüze kadar önemli oranda yol almıştır. Etki ettiği zararlı yelpazesinin geniş olması, toprak altında konukçusunu arama yeteneği, çevreye ve insan sağlığına zararlı olmaması alternatif yöntemler arasında yer almasına neden olmuştur. EPN’ler uygun çevre şartları sağlandığında pestisitler kadar etkili olabilse de açık alan uygulamalarında sıcaklık, oksijen miktarı ve toprak nemi gibi abiyotik faktörler yaşamlarını etkilemektedir. Sıcaklık ve kuraklık nematodların yaşamlarını etkileyen en önemli çevresel faktörlerdendir.

EPN’ler genel olarak *in vivo* ve *in vitro* olmak üzere iki ayrı yöntem ile üretilmektedir. Bu tez çalışmasında, *in vivo* veya *in vitro* üretim metodlarıyla elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora* (HBH) ırkına ait infektif juvenillerin (IJ), dayanıklılığa olan toleranslarını belirlemek amacıyla farklı sıcaklık ve kuraklık değerlerine maruz bırakılmışlardır. *In vivo* ve *in vitro* üretim metoduyla elde edilen IJ’lerin 2 saat boyunca 32, 34 ve 36°C’deki sıcaklıklara maruz bırakılması sonucu elde edilen ölüm oranları (yaklaşık %2) istatistiksel açıdan aynı düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Maruz kalınan sıcaklık 37°C’nin üzerine çıktıkça ölüm oranları artmıştır. Kuraklığa karşı toleransı belirlemek amacıyla 24 saatlik süre boyunca, on farklı konsantrasyonda (%10, 20, 30, 40, 50, 55, 57,5, 60, 70 ve 80) IJ’lere karşı PEG 600 uygulanmıştır. *In vivo* veya *in vitro* üretim metoduyla elde edilen IJ’ler %50 ve üzerindeki PEG 600 konsantrasyonuna maruz kaldığında, ölüm oranları istatistiksel olarak artış göstermeye başlamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *In vivo* Üretim, *In vitro* Üretim, Entomopatojen Nematod, *Heterorhabditis bacteriophora*

**2021, vii + 75 sayfa**

## ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION ON COMPARISON OF HEAT AND DROUGHT TOLERANCES OF THE ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE *Heterorhabditis bacteriophora* HBH HYBRID STRAIN AFTER *IN VIVO* AND *IN VITRO* PRODUCTIONS

**Elif Özge DÜZENLİ**

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

**Supervisor:** Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK

Studies and commercial productions on entomopathogenic nematodes (EPN), which have an important place in biological control, have progressed significantly since the 1970s. The wide range of pests it affects, the ability to search for its host under the ground, and the fact that it is not harmful to the environment and human health have caused it to be among the alternative methods. Although EPNs can be as effective as pesticides when suitable environmental conditions are provided, abiotic factors such as temperature, oxygen content and soil moisture affect their lives in open field applications. Temperature and drought are the most important environmental factors affecting the survival of nematodes.

EPNs are generally produced by two different methods, *in vivo* and *in vitro*. In this thesis, infective juveniles (IJs) of *Heterorhabditis bacteriophora* (HBH) strain obtained by *in vivo* or *in vitro* production methods were exposed to different heat and drought values in order to determine their tolerance. Mortality rates (about 2%) obtained by exposing IJs obtained by *in vivo* and *in vitro* production method to temperatures of 32, 34 and 36°C for 2 hours were found to be at the same statistical level. Mortality rates increased as the exposure temperature rose above 37°C. To determine drought tolerance, PEG 600 was applied against IJs at ten different concentrations (10, 20, 30, 40, 50, 55, 57.5, 60, 70 and 80) over a 24-hour period. When IJs obtained by *in vivo* or *in vitro* production method were exposed to PEG 600 concentration of 50% and above, mortality rates started to increase statistically.

**Key words:** *In vivo* Production, *In vitro* Production, Entomopathogenic Nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*

**2021, vii + 75 pages.**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecimde her zaman bilgi ve birikimlerinden faydalanabildiğim, yardımlarını esirgemeyerek çalışmalarımı yönlendiren, bu tez çalışmasının yürütülmesi ve tamamlamasında katkısı olan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK'a teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim süresince eğitim hayatıma katkıda bulunan Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nin değerli hocalarıyla tez çalışmasının yürütülmesinde, laboratuvarındaki çalışmaların hazırlanma sürecinin her aşamasında bilgilerini ve tecrübelerini esirgemeyerek bana her fırsatta yardımcı olan değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Tufan Can ULU, Ar. Gör. Yavuz Selim ŞAHİN, Büşra SADIÇ ve çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Gizem ÖZBUDAK ve Şeyma Hümeyra ÇAKIR'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda finansal destek sağlayan 2190370 nolu proje için TÜBİTAK TOVAG'a teşekkür ederim.

Son olarak eğitim hayatımın başlangıcından itibaren yanımda bulunan ve bana maddi manevi her türlü imkânı sağlayarak hiçbir konuda desteklerini esirgemeyen sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

Elif Özge DÜZENLİ  
.../.../2021

## İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ VE/VEYA TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	7
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	20
3.1. <i>Galleria mellonella</i> Larvalarının Üretilmesi.....	20
3.2. <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HBH Hibrit Irkının <i>In vivo</i> Olarak Üretilmesi.....	22
3.3 <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HBH Hibrit Irkının <i>In Vitro</i> Olarak Üretilmesi.....	26
3.3.1. Çalışma esnasında kullanılan kimyasal maddeler.....	26
3.3.2. <i>Photorhabdus luminescens</i> bakteri izolasyonu.....	29
3.3.3. <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HBH hibrit ırkından yumurta izolasyonu.....	34
3.3.4. Katı nematod kültürünün hazırlanması.....	42
3.4. <i>In vivo</i> ve <i>In vitro</i> Olarak Üretilen HBH Hibrit Irkının Yüksek Sıcaklığa Toleranslılığının Belirlenmesi.....	47
3.5. <i>In vivo</i> ve <i>In vitro</i> Olarak Üretilen HBH Hibrit Irkının Su Kaybına Toleranslılığının Belirlenmesi.....	52
3.6. İstatistiksel Analizler.....	55
4. BULGULAR.....	56
4.1. <i>In Vivo</i> Üretim Sonucu Oluşan <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HBH Irkının Sıcaklığa Toleransı.....	56
4.2. <i>In Vivo</i> Üretim Sonucu Oluşan <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HBH Irkının Kuraklığa Toleransı.....	57
4.3. <i>In Vitro</i> Üretim Sonucu Oluşan <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HBH Irkının Sıcaklığa Toleransı.....	58
4.4. <i>In Vitro</i> Üretim Sonucu Oluşan <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HBH Irkının Kuraklığa Toleransı.....	59
4.5. <i>In Vivo</i> ve <i>In Vitro</i> Üretim Sonucu Oluşan HBH Hibrit Irkının Sıcaklıklara Olan Toleransının Karşılaştırılması.....	60
4.6. <i>In Vivo</i> ve <i>In Vitro</i> Üretim Sonucu Oluşan HBH Hibrit Irkının Kuraklığa Toleransının Karşılaştırılması.....	61
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	63
KAYNAKLAR.....	68

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
g	Gram
kg	Kilogram
l	Litre
ml	Mililitre ( $1 \times 10^{-3}$ l)
$\mu$ l	Mikrolitre ( $1 \times 10^{-3}$ ml)
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
cm	Santimetre ( $1 \times 10^{-2}$ m)
%	Yüzde

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
dk	Dakika
DJ	Dauer Jüvenil
EPN	Entomopatojen nematod
IJ	İnfektif Jüvenil
J3	Üçüncü dönem larva
J4	Dördüncü dönem larva
LC <sub>50</sub>	Popülasyonun %50' sini öldürmesi beklenen konsantrasyon
LC <sub>90</sub>	Popülasyonun %90' nını öldürmesi beklenen konsantrasyon
LT <sub>50</sub>	Popülasyonun %50' sini öldürmesi beklenen sıcaklık
NBTA	Nutrient bromothymolblue agar
MT <sub>10</sub>	Popülasyonun %10' unun hayatta kalabildiği sıcaklık
MT <sub>50</sub>	Popülasyonun %50' sinin hayatta kalabildiği sıcaklık
PEG	Polyethylene Glycol
rh	Relative humidity (Oransal nem)
rpm	Revolutions per minute
spp.	Türler (çoğul)
YS	Yeast extract and salt

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Entomopatojen nematodun gelişim evresi .....	4
Şekil 3.1. Hazırlanmış besin ortamının görüntüsü .....	21
Şekil 3.2. Etüv içerisinde <i>Galleria mellonella</i> larvalarının yetiştirildiği kavanozlar .....	21
Şekil 3.3. Yem içerisinde bulunan <i>Galleria mellonella</i> larvaları.....	22
Şekil 3.4. İnkübasyona bırakılan 24 hücreli kültür kabı .....	23
Şekil 3.5. Üzeri toprakla kapatılmış larvalarının alttan görünüşü.....	23
Şekil 3.6. Larvalara IJ inokule edilmesi .....	24
Şekil 3.7. White Trap düzeneği ve çıkış yapan IJ' ler .....	24
Şekil 3.8. IJ'lerin alındığı flask kutusu .....	25
Şekil 3.9. Buzdolabında stoklanan IJ' ler .....	25
Şekil 3.10. Ringer solüsyonu içerik malzemeleri.....	26
Şekil 3.11. YS sıvı besin ortamının hazırlığı .....	27
Şekil 3.12. NBTA agar hazırlığı ve petrideki görüntüsü .....	27
Şekil 3.13. Wouts agar hazırlanması ve petrideki görünümü .....	28
Şekil 3.14. Sterilizasyon sıvısının görüntüsü .....	28
Şekil 3.15. Larvaların yüzey sterilizasyonu .....	29
Şekil 3.16. Larvanın ventralinin delinip hemolimf sıvısının çıkartılması.....	30
Şekil 3.17. Vücut dışına çıkan hemolinfin steril öze ile alınması.....	30
Şekil 3.18. Hemolimf sıvısının NBTA agara sürülmesi.....	31
Şekil 3.19. Agar üzerinde oluşan koloniler .....	31
Şekil 3.20. YS sıvı besin ortamı.....	32
Şekil 3.21. İnokulasyondan bir gün sonra YS sıvı besin ortamı .....	32
Şekil 3.22. Stoklanmış bakteriler .....	33
Şekil 3.23. Eppendorf tüplerde bakterilerin stoklanması .....	33
Şekil 3.24. Kadavraların topraktan ayırt edilmesi ve iç kısmının çıkartılması .....	34
Şekil 3.25. Disekte işlemine Ringer solüsyonu eklenmesi ve hermafrodit bireylerin cam pipetle ayırt edilmesi .....	35
Şekil 3.26. Ayrılan hermafroditler ve hermafroditlerin nematod iğnesi ile toplanması .....	35
Şekil 3.27. Cam petrilere toplanmış olan hermafroditler.....	36
Şekil 3.28. Döllenen hermafrodit birey.....	36
Şekil 3.29. Hermafrodit bireylerin dibe çökmesi ve Ringer solüsyonunun çekilmesi.....	37
Şekil 3.30. Vortekste jilet ile hermafroditlerin parçalanması .....	38
Şekil 3.31. Parçalanmış hermafroditlerin tülde geçirilmesi .....	38
Şekil 3.32. Ringer solüsyonlu yumurtaların eppendorf tüplere alınması.....	39
Şekil 3.33. Santrifüj cihazı .....	40
Şekil 3.34. Yumurtalar üzerine YS sıvı besin ortamının eklenmesi .....	40
Şekil 3.35. 24'lü hücre kaplarına YS besin ortamının eklenmesi.....	41
Şekil 3.36. İzole edilen yumurtalar .....	41
Şekil 3.37. Oda sıcaklığında eriyen bakterilerin YS sıvı besin ortamına aktarılması.....	42
Şekil 3.38. Bakteri kültürü damlatılmış nutrient agar .....	43
Şekil 3.39. Bakteri ile inokule edilen wouts agar .....	43
Şekil 3.40. Yumurtalardan sağlıklı çıkış yapan birinci dönem juveniller.....	44
Şekil 3.41. Wouts agarda üremiş olan HBH hibrit ırkının görüntüsü.....	44
Şekil 3.42. Wouts agar ortamında üremiş olan hermafrodit bireyler .....	45
Şekil 3.43. Petri kapağının altına çıkış yapan IJ' ler .....	45
Şekil 3.44. Flasklara alınan IJ' lerin görüntüsü .....	46

Şekil 3.45. Flasklara alınan IJ'lerin mikroskop altındaki görüntüsü .....	46
Şekil 3.46. <i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> olarak üretilmiş HBH ırkının dolapta stoklanması.....	47
Şekil 3.47. Bakteri ile inokule edilmiş YS, NBTA agar ve wouts agarın bulunduğu çalkalamalı inkübatör .....	47
Şekil 3.48. 24 kuyulu hücre kültür kabı .....	48
Şekil 3.49. Doz belirlenmesi yapılmış flask kabı.....	48
Şekil 3.50. IJ'lerin flask kabından çekilmesi .....	49
Şekil 3.51. IJ'ler üzerine saf suyun eklenmesi .....	49
Şekil 3.52. Belirlenmiş olan sıcaklık denemesinde tutulan hücre kültür kabı .....	50
Şekil 3.53. IJ'lerin sayıldığı sayım kabı .....	50
Şekil 3.54. IJ'lerin mikroskop altında sayımı .....	51
Şekil 3.55. Sayma kabında bulunan ölü ve canlı IJ'ler.....	51
Şekil 3.56. Polyethylene Glycol 600 ve hazırlanmış %20'lik konsantrasyonu.....	52
Şekil 3.57. PEG 600 konsantrasyonunun hazırlanması .....	53
Şekil 3.58. PEG 600 konsantrasyonunun IJ'ler üzerine eklenmesi .....	54
Şekil 3.59. Filtre kağıdı yapıştırılmış mikropipetler .....	54
Şekil 3.60. PEG 600 konsantrasyonunun çekilmesi .....	55
Şekil 3.61. IJ'lerin yıkama işleminin yapılması .....	55
Şekil 4.1. <i>In vivo</i> üreim sonucu oluşan HBH hibrit ırkının farklı sıcaklıklarda ölüm oranı (F = 1762.595; df = 6, 28; P = <0.0001) .....	56
Şekil 4.2. <i>In vivo</i> üretim sonucu oluşan HBH hibrit ırkının farklı PEG 600 konsantrasyonlarında ölüm oranı (F = 1324.935; df = 9, 40; P = <0.0001) .....	57
Şekil 4.3. <i>In vitro</i> üretim sonucu oluşan HBH hibrit ırkının farklı sıcaklıklarda ölüm oranı (F = 1029.361; df = 6, 28; P = 0<000.1).....	58
Şekil 4.4. <i>In vitro</i> üretim sonucu oluşan HBH hibrit ırkının farklı PEG 600 konsantrasyonlarında ölüm oranı (F = 1380.993; df = 9, 40; P = <0.0001) .....	59
Şekil 4.5. <i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> üretim sonucu oluşan HBH hibrit ırkının farklı sıcaklıklarda ölüm oranının kıyaslanması (F = 1204.702; df = 13, 56; P = <0.0001) ...	60
Şekil 4.6. <i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> üretim sonucu oluşan HBH hibrit ırkının farklı PEG 600 konsantrasyonlarında ölüm oranının kıyaslanması (F = 1287.571; df = 19, 80; P = <0,0001) .....	62

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 3.1. <i>G. mellonella</i> besin içeriği .....	20
Çizelge 3.2. Ringer solüsyonu içeriği .....	26
Çizelge 3.3. YS besin ortamı içeriği .....	26
Çizelge 3.4. NBTA agar içeriği.....	27
Çizelge 3.5. Nutrient Lipid (Wouts) agar içeriği .....	28
Çizelge 3.6. Sterilizasyon solüsyonunun içeriği .....	28



## 1. GİRİŞ

Tarımsal ürünlerin verimini ve kalitesini arttırmak için modern tarım teknikleri ile üretim araçları kullanılmaktadır (Tiryaki ve ark. 2010). Hastalık, zararlı ve yabancı otlarla oluşan bu kayıpları önlemek için farklı canlı gruplarına karşı mücadele yöntem ve teknikleri kullanılmıştır. Fiziksel–mekanik mücadele, biyoteknik mücadele, kimyasal mücadele, kültürel önlemler, biyolojik mücadele ve entegre mücadele günümüzde kullanılan yöntemler olarak sıralanabilir (Uygun ve ark. 2015). Günümüzde hala tarımda hastalık, zararlı ve yabancı otları kontrol altına almak için en fazla kullanılan yöntem kimyasal mücadeledir (Sarwar 2015). Bunun sebebi; diğer yöntemler ile karşılaştırıldığında daha yüksek etkinlikte olması, uygulanabilirliğinin kolay olması, hızlı sonuç vermesi ve kolay temin edilmesinden kaynaklanmaktadır (Delen ve ark. 2015, Sarwar 2015). Fakat kimyasal böcek öldürücüler hedef alınan zararlıları kontrol altına alırken hedefte olmayan canlıları veya yararlı böcekleri de olumsuz etkileyebilmektedir. Bu kimyasallar zararlılar üzerinde direnç oluşturabilir, ikincil bir zararlılığın ana zararlı konumuna geçmesine neden olabilir. Kimyasal böcek öldürücülerin kullanımı insan sağlığı üzerinde akut ve kronik etkilere neden olabilir ve çevreye de birçok sorunu beraberinde getirebilmektedir. Kimyasalların yoğun ve bilinçsiz bir şekilde kullanılması sonucunda gıda maddelerinde ilaç kalıntılarına; toprak, su ve hava da pestisitlerin kendisi ya da dönüşüm hallerinin kalmasına neden olmaktadır (Susurluk ve Ökten 2000, Tiryaki ve ark. 2010).

Dünyada 1960'lı yıllara kadar tarım sektörü çevreyi koruyucu ve düzenleyici olarak bilinmesine rağmen 1970'li yıllardan sonra bu sektör sorgulanmaya ve tartışılmaya başlanmıştır (Kaypak 2011). Sürdürülebilir tarımla uzun vadede doğal kaynakların korunması ve çevreye zarar vermeyen tarımsal teknolojilerin kullanıldığı bir alt yapının oluşturulması sağlanabilmektedir (Turhan 2005). Sürdürülebilir tarım uygulamalarında ek olarak biyolojik mücadele, entegre mücadele ve biyoteknoloji zararlılarla mücadelede ayrı bir önem kazanmıştır. Entegre zararlı yönetimi (IPM) diğer yöntemlerden daha fazla ön plana çıkabilmektedir. IPM eşiklerin belirlendiği bir izleme programı olup kimyasallara yalnızca ihtiyaç olduğunda yer verilir (Lewis ve ark. 1997). Biyolojik mücadelenin ise çevreye ve insanlara karşı hiçbir toksik etkisi bulunmamaktadır. Bu nedenle biyolojik mücadele, IPM'nin temelini oluşturanlar

arasında yer alıp en çok tercih edilen mücadele yöntemlerinden birini oluşturmaktadır (Gaugler ve ark. 1997, Susurluk ve Ökten 2000, Armağan ve ark. 2010). De Bach (1964) biyolojik mücadeleyi; avcılarının, parazitlerin ve patojenlerin eylemi olarak tanımlamaktadır. Canlı organizmaların insan faktörü ile doğru bir şekilde kullanılması sonucunda tarımda zararlı olan popülasyon yoğunluğu baskı altına alınarak daha düşük seviyede tutulmaktadır. (Van den Bosch ve ark. 1982). Biyolojik mücadelede zararlı böceklere karşı kullanılan organizmalara ajan adı verilmektedir. Biyolojik ajanlar içerisinde günümüzde etkili ve aktif bir biçimde kullanılan gruplardan bir tanesi de Entomopatojen Nematodlar'dır (EPN) (Gaugler 2002).

Entomopatojen nematodlar; Nemata şubesi, Secernentea sınıfı, Rhabditida takımının Heterorhabditidae ve Steinernematidae familyalarına bağlı olup yaşamının %90'dan fazlasını toprak altında geçiren ve yaşam döngüsünün devamı için konukçu bir böceğe ihtiyaç duyan ve bu döngü esnasında konukçu böceğin ölümüne neden olan obligat endoparazit canlılardır (Klein 1990, Ehlers 1996). Böcek paraziti nematodların biyolojik mücadelede kullanılmasının fark edilmesi *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvası içinde tespit etmeleriyle ortaya çıkmıştır. Glaser ve Fox tarafından, ilk EPN *Aplectana kraussei* 1923 yılında, ikinci EPN ise *Neoaplectana glaseri* 1929 yılında keşfedilmiştir (Glaser ve Fox 1930).

Heterorhabditidae ve Steinernematidae familyalarına ait bulunan nematodlar doğada obligat böcek patojenidir. Dünya'da Antartika kıtası hariç çoğu yerden izole edilebildiği bulunmuştur (Adams ve ark. 2006). Heterorhabditidae ve Steinernematidae familyalarına bağlı olan nematodlar geniş bir konukçu aralığına sahiptir. Bu nematodların açık alanlardaki uygulaması için *in vivo* ve *in vitro* yöntemlerle kitlesel olarak üretilmeleri, sadece böcekler üzerinde etkinlik göstermeleri, insan ve çevre açısından herhangi bir tehlike oluşturmamalarından burada yer alan nematodlar güvenilir biyolojik mücadele ajanı olarak isimlendirilmelerine neden olmuştur (Gaugler ve Kaya 1990, Köppenhöfer 2000). Heterorhabditidae ve Steinernematidae familyalarına ait olan nematodlar genel olarak birçok firma tarafından ticari olarak üretilmekte ve mikrobiyal insektisit olarak kullanılabilir (Köppenhöfer 2007).

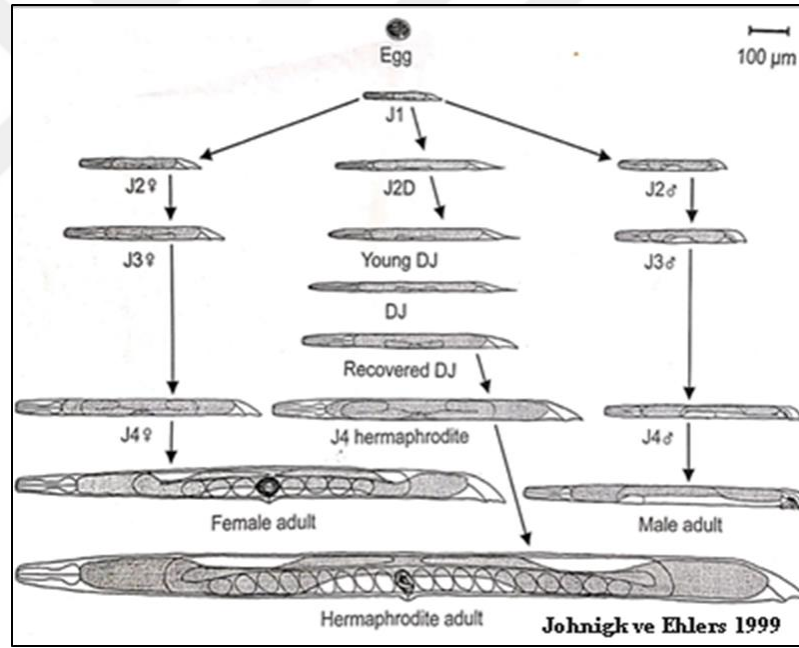
Entomopatojen nematodlarla ilgili çalışmalara ülkemizde de yer verilmiş ve çeşitli alanlarından pek çok türü izole edilip toprak altı zararlılarına karşı etkinlikleri denenmiştir. Ülkemizde tespiti yapılmış olan EPN'lerden biri ise *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae)'dır (Susurluk ve ark. 2001, Kepenekçi 2002, Hazır ve ark. 2003, Kepenekçi ve Susurluk 2003). *H. bacteriophora*; Lepidoptera, Coleoptera, Diptera ve Thysanoptera takımlarında bulunan ve zarar yapan böcek türlerine karşı obligat endoparazit olup biyolojik mücadelede kullanılan bir EPN türüdür (Ehlers 1996).

Entomopatojen nematod; simbiyotik bakteriler ile konukçu ve nematod trrne bağlı olarak konukuklarını kısa süre içerisinde öldüren nematodları ifade etmektedir (Adams ve ark. 2006). EPN yaşam çemberinde yumurta, dört adet juvenil evre (J1, J2, J3, J4) ve ergin evre olmak üzere üç farklı dönem geçirmektedir. Nematodlar konukçunun büyüklüğüne ve kadavradaki besin miktarına bağlı olarak remeye devam edip 1-3 jenerasyon geçirebilmektedir. Kadavra içerisindeki besin miktarı bittiği zaman ise infektif juvenil (J3) evresinde kadavrayı terk ederek yeni bir konukçu aramaya başlamaktadır (Adams ve Nguyen 2002, Hazır ve ark. 2003).

İnfektif (Dauer) juvenil (DJ, IJ, J3) evresi Rhabditid nematodların yaşam çemberinde önemli bir yeri temsil etmektedir. IJ evresi diğer evrelerden farklı olarak besin azlığı gibi olumsuz evre koşullarına karşı daha dayanıklıdır (Endo ve Nickle 1994). EPN'lerin konukçu dışında yaşayabilen nc dönem juvenil evresi (J3) olarak bilinen IJ evresi toprak içerisinde beslenmeden aylarca konukçularını arayabilirler (Glazer 2002). Yaşamlarını toprak içerisinde geçirdikleri dönemde ağız ve anüs bölgeleri kapalı olan IJ'ler besin alma ve üreme geekleştirememektedir (Kaya ve Gaugler 1993). *Heterorhabditis bacteriophora* türüne ait IJ'lerde ise uygun ortam şartları sağlandığında toprak içerisinde 22 ay kalıcı olabildiği tespit edilmiştir (Susurluk ve Ehlers 2008).

İnfektif juveniller, sindirim sistemlerinde özel bir kese içerisinde yer alan ve Enterobacteriaceae familyasına ait gram-negatif (-) bakteriler ile simbiyotik ilişki içerisindedir. IJ'lerin içinde bulunan simbiyotik bakteriler konukçu böceğin ölümünde ve EPN'lerin üremesinde etkili olmaktadır. *Heterorhabditis*'e ait türler konukçu böceği

simbiyotik ilişki içinde olduğu bakteriler olmadan öldüremezken *Steinernema*'ya ait türler simbiyotik bakteriler bulunmadan konukçu böceği öldürebilir fakat böcek içinde üreyememektedirler. Simbiyont bakteriler doğada tek başlarına kalamadıkları için bir EPN türü ile eşleşmektedirler. *Steinernema* türleri *Xenorhabdus* spp. bakterileriyle *Heterorhabditis* türleri ise *Photorhabdus* spp. bakterileriyle simbiyotik ilişki içinde bulunmaktadır (Boemare ve ark. 1996). İki bakteri cinsi olan *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus*'un iki farklı fenotipik formları bulunmaktadır. Birincil faz nematodlardan elde edilirken ikinci faz ise bakteri kültürde olduğunda kendiliğinden ortaya çıkmaktadır. İki aşama arasında morfolojik ve fizyolojik farklılıklarda bulunmaktadır. Faz bir bakterileri; antibiyotik üretebilir, bazı boyaları absorbe edebilir ve kristal proteinleri hücre içerisine dahil edebilirler. Faz iki de ise antibiyotik üretmez, boyaları absorbe edemez ve hücre içine dahil edemezler (Adams ve ark. 2006).



**Şekil 1.1.** Entomopatojen nematodun gelişim evresi

İnfektif juveniller toprakta uygun bir konukçu bulduğu zaman böceğin doğal açıklıklarından (ağız, anüs, stigma) ya da sadece Heterorhabditlerde görülen kütükula yoluyla hemosöl (vücut boşluğu) içerisine girip ortama simbiyont bakterilerini bırakmaktadırlar (Adams ve ark. 2006). Hemosöl içerisinde bulunan IJ'ler ağız ve anüs bölgelerinden simbiyont bakterileri konukçu böceğine aktarırlar. Konukçunun vücut sıvısında (hemolimf) üremeye başlayan bakteriler toksin ve metabolitler üreterek 36-48

saat içinde konukçusunu kan zehirlenmesinden (septisemi) öldürmektedir (Kaya ve Gaugler 1993, Susurluk 2008). EPN'ler konukçu içerisinde yüksek gıda konsantrasyonlarda gelişip buldukları J3 evresinden J4 evresine, daha sonra ise ergin evresine geçiş yapabilirken düşük gıda konsantrasyonlarında ise J2 evresinde kalıp ergin evreye geçemezler. *Heterorhabditis* türlerinin ilk dölde J4 evresinden sonra hermafrodit evresi meydana gelip bu evre kendisini dölleyerek (automictic) üreyebilmektedir. Hermafroditlerin uzunluğu ve bırakılacak olan yumurta sayısı ortamda bulunan gıda miktarı ile ilişkilidir. Hermafroditlere ait yumurtalardan çıkan nematodlar J1 evresinde olup dişi ve erkek ayrımı 12 saat sonra yapılabilmektedir. İkinci ve daha sonra oluşan dölleri de ise dişi ve erkekler eşeyli (amphimictic) üreme gerçekleştirmektedir (Şekil 1.1). Hermafrodit evresinde besin azlığında yumurtaların ebeveyn içinde açılıp rahim içi doğum (endotokia matricida) meydana gelmesi ebeveynin ölümüne neden olmaktadır. *Steinernema* türlerinde ise hermafrodit evresi olmayıp sadece amphimictic üreme gerçekleşmektedir (Poinar 1979, Akhurst ve Boemare 1990, Ehlers 2001).

Entomopatojen nematodların kitlesel olarak üretilibilmeleri *in vivo* ve *in vitro* olarak iki şekilde gerçekleştirilmektedir (Ehlers 2001). *In vivo* üretim küçük boyuttaki çiftçiler, dar bir tüketici grubu olan niş pazarlara odaklanmış işletmelerde kurulumu kolay ve daha az üretim sermayesiyle laboratuvar için kullanılması kabul edilmiştir. Sermaye ihtiyacı daha az olmasına rağmen bu üretim metodu el işçiliği fazla girdi gerektirmektedir. *In vivo* üretim metodunda White Trap düzeneği kullanılmaktadır. Bu yöntem için EPN'lere karşı hassas olan ve yüksek verim sağlayan *Galleria mellonella* (bal mumu güvesi) son dönem larvası en çok kullanılan konukçu böcek olmuştur. Kullanılan konukçuya uygulanan doz miktarı ne kadar az olursa ölüm oranı o kadar az olup yüksek miktarlarda uygulanan doz oranlarında ise ikinci dölleri rekabeti başarısız enfeksiyonlara neden olmaktadır. *H. bacteriophora* konukçu böceğe uygulandıktan sonra larvanın koyu kırmızı renk alması ise enfekte olduğunun belirtisidir (Woodring ve Kaya 1988).

*In vitro* yöntem katı ve sıvı ortamda kitlesel olarak üretilmektedir. Katı ortam, üretim kapasitesini arttırırken işçilik maliyetini arttırmaktadır. Katı ortamlarda üretim

için hayvansal kaynaklı besin maddeleri, agar ve su kullanılmaktayken sıvı ortamlarda ise üretim için biyoreaktör kullanarak iş gücü azaltılıp işletme maaliyeti arttırılmaktadır. Katı ortamlarda kitlesel üretimde EPN'ler agarın yüzey kısmında üremekteyken, sıvı ortamlarda ise tüm alan içerisinde üreyebilmektedir (Ehlers 1996).

Sıcaklık, kuraklık, toprağın yapısı, UV, pH ve tuzluluk gibi faktörler nematodların yaşamlarını etkileyebilmektedir (Kaya 2002).

Sıcaklığın nematodların yaşamlarına etkisi türlerine ve cinslerine göre farklılık oluşturabilmektedir (Grewal ve ark 1994). Düşük sıcaklıklarda (<10-15°C) IJ'ler durgunlaşırken, yüksek sıcaklık derecelerinde ise (>30-40°C) etkinliğini kaybetmektedir. 0°C'nin altında ve 40°C'nin üzerinde bulunan sıcaklıklarda belli bir zaman diliminde tutulan nematodlar için öldürücü olmaktadır (Glazer 2002).

Kuraklıkta nematodların yaşam kalitesini etkileyen diğer bir unsurdur. IJ'ler topraktaki partiküller arasında bulunan boşlukları kaplayan su tabakalarını kullanarak toprakta ilerleyebilmektedir. Bulunan su oranı kurak topraklardaki gibi oldukça az ya da su ile doymuş topraklardaki gibi partiküller arası boşlukların olmaması IJ'lerin hareketlerini kısıtlamaktadır (Kung ve ark 1991, Brown ve Gaugler 1997).

Bu tez çalışmasında, Nematoloji laboratuvarında üretilmiş olan EPN üstün ırk *H. bacteriophora* HBH hibrit ırkının, *in vivo* ve *in vitro* katı ortam olmak üzere iki farklı şekilde üretimi yapılmış, sonucunda ise üretim şekillerine bağlı olarak yüksek sıcaklık ve kuraklığa olan toleranslılıkları belirlenip karşılaştırılması konu olarak ele alınmıştır. EPN'leri biyolojik mücadelede daha verimli kullanabilmek amacıyla *in vivo* ve *in vitro* üretim metodlarıyla elde edilmiş olan IJ'lere farklı sıcaklık dereceleri uygulanmış ve toleranslılıkları karşılaştırılmıştır. Ayrıca EPN'leri biyolojik mücadele içerisinde daha etkili bir şekilde kullanabilmek için, *in vivo* ve *in vitro* üretim sonucu oluşan IJ'lerin kuraklığa toleranslılıkları belirlenip karşılaştırılmaları yapılmıştır. Bunların sonucunda uygulanan farklı işlemlerle hangi üretim yönteminin daha yüksek verimle denemelere cevap verdiği sonucuna ulaşılmayı amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Jagdale ve Gordon (1998), Steinernematidlerin dört izolatını (üç tür) 20°C ve 25°C’de uygun şartlarda ise 10°C ve 15°C’de 2 yıl boyunca çoğaltmış daha sonra yüksek sıcaklıklara ve donmaya olan toleranslılık kapasitelerini belirlemişlerdir. Tüm izolatlarda infeksiif juvenillerin (IJ) %50’sinin öldüğü sıcaklık (LT<sub>50</sub>), yetiştirildiği sıcaklığının yükseltilmesi ile artmıştır. Sonucunda ise; *Steinernema riobravis* en yüksek LT<sub>50</sub> değerinde bulunurken *Steinernema feltiae* en düşük değerinde ve *Steinernema carpocapsae* ise yüksek sıcaklıklara orta derecede tolerans göstermiştir. IJ’lerin %50’sinin -5°C’de öldürüldüğü zamanlarda donmaya olan toleransı, daha yüksek yetiştirildiği sıcaklıklarda azalmıştır. Soğuğa maruz bırakılıp kurtulan nematodların etkinlikleri, soğuğa maruz bırakılmamış olanlardan %10 daha az olduğu tespit edilmiştir. *Steinernema feltiae*, dört izolat arasında soğuğa en dayanıklı izolat olmasına rağmen donmaya dayanma toleransı yüksek sıcaklıklarda yetiştirildiğinde azalmıştır.

Patil ve ark. (2018), EPN’lerin hayatta kalmaları ve etkinlikleri sıcaklıklardan olumsuz etkilenebildiği için *Heterorhabditis indica* ve *Steinernema carpocapsae* EPN’lerin geliştirilmesinde ve hayatta kalmasında değişken sıcaklıkların etkisini incelemişlerdir. Bu nedenle IJ’ler çeşitli sıcaklıklara maruz bırakılmışlardır. *Steinernema carpocapsae* ve *Heterorhabditis indica* 48 saat boyunca 25 ve 40°C sıcaklıklarda tutulmuştur. Sonuç olarak; *Steinernema carpocapsae* için sırasıyla %100-32.93 canlı oranları tespit edilip *Heterorhabditis indica* için 25°C’de ölüm olmazken 40°C’de hepsinin öldüğü bulunmuştur. *Steinernema carpocapsae*, *Heterorhabditis indica* ile karşılaştırıldığında yüksek sıcaklıklara daha toleranslı olup nematod türleri arasında maruziyet sürelerinde önemli derecede farklılıklar oluşturmuştur. IJ’ler çeşitli sıcaklık seviyelerine maruz bırakıldıktan sonra inokulum kaynağı olarak kullanıldığında ise penetrasyon yüzdesi azalmış ve daha önemlisi bal mumu güvesi larvalarının üremesini azaltmıştır. Kuraklıkta ise; *Steinernema carpocapsae* ve *Heterorhabditis indica* önemli bir oranda hayatta kalma yeteneği göstermiştir. *H. indica* IJ’ler *S. carpocapsae*’ye göre farklı kuraklık seviyelerine maruz bırakıldığında önemli daha fazla canlılık göstermiştir.

Ramakuwela ve ark. (2015), depolama sıcaklığı ve süresinin *Steinernema innovationi* (Rhabdita: Steinernematidae) üzerinde hayatta kalma ve etkinliği çalışmışlardır.

Entomopatojen nematod türleri optimum sıcaklık değerleri bakımından farklılıklar gösterebilirler. Bu yüzden, Güney Afrika'da son zamanlarda açıklanan *S. innovationi*'nin hayatta kalması ve enfektivitesi üzerine %0.1 oranında formalin içeren 25 ml sulu süspansiyonda 20000 IJ kullanarak 80 günden fazla (5, 10, 15, 20 ve 25°C) beş depolama sıcaklığında bir çalışma yürütülmüştür. Sonuçlarda; canlılığın ve istikrarın en fazla sağladığı değer 15°C'de olup, 84 gün sonra ise bu oran %84 ile %88 arasında değişkenlik göstermiştir. IJ'lerin *G. mellonella* larvalarına karşı enfeksiyonu 84 gün sonra canlılığın %10'a düştüğü 5°C'deki tüm sıcaklıklarda ise %90'dan fazla olmuştur. Ayrıca, 15 ml'de %0.1 formalin çözeltisi bulunan sünger formülasyonunda 2.5 milyon IJ'yi optimum 15°C'de 84 gün, daha sonra 25°C'de 2 hafta depolamışlardır. IJ'lerin sünger formülasyonu üzerinde 2 hafta boyunca 25°C-15°C'de depolanmasından sonra 84 gün süreyle tutulması, IJ'lerin canlılığı (%87) veya *G. mellonella* (%95) enfeksiyonu üzerine zararlı bir etki oluşturmamıştır.

Ali ve ark. (2007), üç yerli entomopatojen nematod *Steinernema seamae*, *S. masoodi* ve *S. carpocapsae*'nin (Rhabditida: Steinernematidae) farklı sıcaklıklarda (15, 20, 25, 30, 35, 40 ve 45°C) hayatta kalması ve *Helicoverpa armigera* (Hübner) prepupası üzerinde enfeksiyonun etkisini incelemek amacıyla çalışma yapmışlardır. Sıcaklıklarda görülen artış ile nematodlarda canlılık oranını azaltmıştır. Ayrıca, popülasyonun %46.6'sı 6 saat boyunca öldürücü olmayan sıcaklık (45°C) uygulamasında canlılığını koruyup tolere etmeyi başarmıştır. Hayatta kalan popülasyonların dışında *Helicoverpa armigera* prepupasına karşı %43.3 oranında enfekte olduğu gözlemlenmiştir. Hayatta kalanlar 25°C ve 30°C enfekte olmayıp buna rağmen aktiviteleri optimum olarak bulunmuştur. Isı toleranslı bu izolatlar yüksek sıcaklıklarda *H. armigera*'nin duyarlı dönemlerinin yönetiminde ve toprakta pupa olan tarımsal öneme sahip diğer böcek zararlılarının idaresinde hayati rol oynamışlardır.

Gulzar ve ark. (2020), bu çalışmada sulu süspansiyona karşı kadavra yolu ile uygulandığında farklı sıcaklıkların (sıcak ve soğuk), su kaybının uygulanma süreleri (48 ve 72 saat) *Heterorhabditis bacteriophora* ve *Steinernema glaseri*'nin hayatta kalma, virülens ve çoğalma yeteneği üzerindeki etkileri çalışılmıştır. Sıcaklık ve kuruma gibi çevresel faktörler EPN'lerin canlılığını ve enfeksiyonunu etkilemiştir. Isı toleranslı

biyoanalizlerde 30°C, 35°C ve 37.5°C'ye maruz bırakıldıktan sonra kadavra muamelelerindeki her iki türdeki nematodlar sulu uygulamaya oranla daha fazla hayatta kalma ve üreme yeteneği göstermişleridir. Türüne ya da uygulama şekline bakılmaksızın 37.5°C'nin üzerinde canlılık gözlemlenmemiştir. Soğuk toleransta 10°C'den -2°C'ye kadar yöntemler arasında bir farklılık bulunamamıştır. Kuraklık denemelerinde ise; iki veya üç gün süreyle %85 bağıl neme maruz bırakılan her iki nematod türü de kadavra uygulamasında sulu uygulamaya göre daha fazla hayatta kalma ve üreme gösterirken virülenslikte hiçbir farklı durum gözlenmemiştir. Sulu süspansiyonda uygulanan nematodlara karşı enfekte olmuş konakçı kadavradan çıkanlar arasında farklı stres toleransını bulan ilk çalışma olmuştur.

Morton ve Garcia-del-Pino (2009), Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarına ait EPN'leri izole etmek amacıyla İspanya'nın 2 bölgesi olan Katalunya ve Murcia'daki sert çekirdekli meyve üretimi yapan bahçelerden sırasıyla 630 ve 90 adet toprak örneği alınmıştır. Alınmış olan örneklerdeki pozitif EPN oranı sırasıyla %5.2 ve %20 oranında olup morfometrik analizler türlerin *S. feltiae* ve *H. bacteriophora* olduğunu belirlemiştir. Elde edilen ırkların sıcaklığa, kuraklığa ve hipotoksiye karşı dayanıklılıkları belirlenmiştir. IJ'lerin sıcaklığa toleransını belirlemek için iki petri kabına %15 nemlendirilmiş steril kum konulup üzerine 20 µl'de 100 IJ nematod bırakılmış ve karanlık ortamda 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 saat 25, 30, 32, 35, 37, 40 ve 42°C'de inkübe edilmiştir. Uygulamalara maruz bırakıldıktan sonra 24 saat 25°C'de bırakılıp daha sonra mikroskopta sayılmıştır. Kuraklık için 25°C'de doymuş tuz çözeltileri kullanılarak bağıl nem oluşturulup 10000 IJ maruz bırakılmıştır. %97, %93, %88 ve %85 bağıl nem için sırasıyla K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KNO<sub>3</sub>, ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O ve KCl kullanılıp 72 saat sonra nematodlar 24 saat 10 ml steril suda bekletilerek rehidre edilmiş daha sonra sayımları yapılmıştır. Sonuç olarak, *S. feltiae* ve *S. carpocapsae* ırkları 25°C ve 35°C arasında hayatta kalırken *H. bacteriophora* ise 37°C'ye 2 saatlik maruziyette canlılığını yitirmiş ve 40°C'de tüm IJ'ler ölmüştür. Kuraklıkta ise *H. bacteriophora* %97 nemde hayatta kalma oranı %44 ile %70 arasındayken *Steinernema* türlerinde ise %80'den fazlası hayatta kalmıştır. IJ'lerin %93 ve %88 bağıl nemde ölüm oranları artmış ve %85 nem uygulandığında tüm IJ'lerde ölüm gerçekleşmiştir.

Grewal ve ark. (2002), *Heterorhabditis bacteriophora*'nın 15 doğal popülasyonun IJ'leri kullanılarak farklı stres faktörlerinin (sıcaklık, kuraklık, ultraviyole ve oksijen yetersizliği) etkisini araştırmışlardır. Bunun için; farklı popülasyonlarda bulunan IJ'ler sıcaklık denemesinde 2 saat 40°C'ye maruz bırakılmıştır. 5000 IJ, 5 cm çaptaki petri kaplarındaki 5 ml su içerisine konulmuştur. 40°C'ye maruz bırakılan IJ'ler sıcaklıktan kurtulmaları için 25°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Nematod popülasyonlarının kuraklığa olan toleransın belirlenmesinde ise 0.5 ml suda bulunan 5000 IJ üzerine %50 gliserol solüsyonundan 0.5 ml eklenmiştir. 25°C'de 72 saat inkübasyon sonra nematodlar 10 ml suda 24 saat rehidre olmaları için beklenmiştir. Sonuç olarak; sıcaklık denemesinde *H. bacteriophora*'nın 15 popülasyonundan %16 ile %92 arasında hayatta kalırken, kuraklık denemesinde ise popülasyonların sadece %23 ile %95 arasında canlılık gözlemlenmiştir.

Ma ve ark. (2013), Kuzey Çin'in çeşitli yerlerden toplamış oldukları 30 izolatin biyolojik özelliklerinde karakterizasyonunu yapmışlardır. IJ'lerin sıcaklığa, donmaya ve kuraklığa olan dirençlerinde türler arasında önemli oranda farklılıklar gösterdiğini bulmuşlardır. IJ'lerin sıcaklığa olan toleransını belirlemek için 3 adet çalışma yapılmıştır. İlk olarak 24 hücreli kaptaki her kuyucuğa 1 ml steril su damlatılmış daha sonra 1000 IJ eklenip 40°C ve 70 rpm'de 2 saat karanlık ortamda hafifçe sallanmıştır. Sonucunda izolatlarda %0 ile %100 ölüm oranı gözlemlenmiştir. İkinci denemede ise sınırlı sayıdaki izolatin ısı toleransında nematod konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. 24 hücreli kabta her kuyucuğa 1 ml steril su damlatılmış daha sonra 1000, 2000, 4000, 8000, 12000, 24000 ve 36000 IJ eklenip 40°C'de 70 rpm'de 2 saat inkübe edilmiştir. Sonucunda 8000 IJ altındaki nematod konsantrasyonlarında test edilen tüm izolatların canlılıklarında önemli bir farklılık bulunamamıştır. Son olarak 40°C'de maruz kalma süresinin etkisi denenmiştir. 1 ml suya 1000 IJ ilave edilip 1, 2, 2.5, 3 ve 4 saat 40°C'de inkübe edilmiştir. Nematodların ısı şokundan çıkmaları için 9 ml steril suda 25°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Sonucunda ise test edilen tüm izolatlar için süre arttıkça canlılık azalmıştır. IJ'lerin kuraklığa olan toleranslılık denemesinde ise; 0.5 ml su içerisinde 1000 IJ ilave edilmiş %50 gliserol çözeltisinden 0.5 ml eklenerek karıştırılmıştır. Hazırlanan nematodlar 72 saat 25°C'de 70 rpm'de çalkalanmış ve 10 ml

suda rehidre edilmiştir. Sonuç olarak elde edilen izolatlar için %10 ile %99 arasında ölüm oranı gözlemlenmiştir.

Anbesse ve ark. (2012), *Heterorhabditis bacteriophora*'nın özel olarak üremesini sağlayan çalışmalarda bulunmuşlardır. *In vivo* ve *in vitro* olarak üretilen nematodların ilk olarak kuruma stresine adaptasyonu sağlanmış sonrasında ise daha yüksek stres seviyelerine maruz bırakılmıştır. Kuruma stresini sağlayabilmek için polyetilen glikol (PEG) 600'ün sıvı çözeltilerine maruz bırakılmıştır. PEG; berrak, noniyonik olup IJ'ler için toksik bir etki yapmamaktadır. *In vivo* olarak üretilen  $10000 \pm 3000$  IJ 5 ml (%30 PEG) çözelti içerisinde  $25^{\circ}\text{C}$ 'de 72 saat aktarılarak kuraklığa adapte edilmiştir. *In vitro* kültürler için nematod popülasyonun üremesi durduğunda (popülasyonun %95'i IJ aşamasında olduğunda) %30 PEG konsantrasyonu ile ayarlanarak kültür şişlerine alınmış ve 72 saat  $25^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. *In vivo* üretimde adaptasyon sağlandıktan sonra  $10000 \pm 3000$  IJ *in vivo* çoğaltılıp ayarlanmış PEG çözeltisine eklenmiş ve 2 saat boyunca sadece %10 canlılık gözlemlenmiştir. *In vitro* üretilen IJ'lerin adaptasyonu sağlandıktan sonra 2 saat sonunda %30'unun hayatta kalabildiği değere ulaşılmıştır.

Patel ve ark. (1997), EPN'lerin *Steinernema* spp. (Rhabditida: Steinernematidae) kuruma canlılığı ve su içeriklerini incelemişlerdir. Dört *Steinernema* türüne ait IJ'lerin *S. glaseri*, *S. feltiae*, *S. carpocapsae* ve *S. riobravis* canlılığını sırasıyla cam slaytlar ve %1 agaroz üzerinde hızlı ve yavaş kuruma sağlandıktan sonra değerlendirmişlerdir. Yeni elde edilmiş ve 75 günlük IJ'lerden yüzeysel suyun uzaklaştırılmasından sonra %0, 20, 40, 60 ve 80 bağıl nemde cam slaytlar üzerinde kurutmuşlardır. Canlılıkları suyla rehidre edildikten sonra hareketlenmeleriyle anlaşılmıştır. Test edilen tüm bağıl nemlerde *S. carpocapsae* en yüksek canlılık ve en yavaş su kaybı oranına sahip olduğunu bulmuşlardır. Örneğin; %80 bağıl nemde *S. carpocapsae* ait IJ'lerin %50'si için hayatta kalma süresi 45 dakika, diğer türler ile kıyaslandığında 5-20 dakika olduğunu bulmuşlardır. Yaşlı IJ'lerin canlılığı *S. carpocapsae* ve *S. riobravis* türlerinde daha az oranda *S. feltiae* ve *S. glaseri* türlerinde önemli oranda azalma olmuştur. İkinci evre juvenillerin kütiikulasının *S. carpocapsae* ve *S. feltiae*'nin kuru ortamda hayatta kalması için önemli bir yardımı bulunmamıştır. IJ'lerin %80 bağıl nemde %1 agaroz

üzerinde yavaşça kurutulması 4 türün özellikle de *S. glaseri* ve *S. feltiae*'nin hayatta kalmasını büyük bir oranda iyileştirmiştir.

Mason ve ark. (1997), Malezya'dan izole edilen EPN'leri, biyolojik kontrol ajanları olarak potansiyellerini değerlendirmek için elmas sırtlı güve (DBM), *Plutella xylostella* larvalarına karşı test etmişlerdir. Bunun için bir dizi izolat seçilmiş ve yaprak zararlılarına karşı kullanılan EPN'lerin su kaybına toleransını belirlemek için bazı çalışmalar yapmışlardır. Bu abiyotik etkiyi *Steinernema* spp. (M87)'nin iki izolatu, *Steinernema* spp. (SSL85)'nin iki izolatu, *Heterorhabditis* n.sp. ve *Heterorhabditis indicus*'a ait IJ'leri üzerinde test etmişlerdir. % 40 bağıl nemde IJ'ler arasındaki canlılık oranında önemli ölçüde farklılık gözlemlenmemesine rağmen 30 dakika sonra IJ'lerin canlılığı %0 ile %20 arasında değişmiştir. %80 bağıl nemde ise izolatlar arasında canlılıkta önemli farklar olmamasına rağmen 40 dakika sonra canlılık %13 ile %45 arasında değişmiştir. *Steinernema* sp. (SSL85/ 25) hem %40 hem de % 80 oranlarında üstün bir canlılık sergilemiştir. Her iki Heterorhabditid türü ise geri kalan Steinernematid türlerinde daha fazla canlılık göstermiştir. Laboratuvar tabanlı bu denemeler ile EPN'lerin yaprak ortamında karşılaştığı abiyotik faktörleri belirli sınırlarda tolere edebileceğini ortaya koymuşlardır.

Mukuka ve ark. (2010a), *Heterorhabditis bacteriophora*'nın yüksek sıcaklıklara toleranslılığını belirlemek amacıyla 37 adet doğal ve 18 adet hibrit nematod ile çalışma yapmışlardır. Tüm ırklar ilk olarak 3 saat boyunca 35°C'ye adapte edilmiş, ardından rehidrasyon için 1 saat 25°C'de tutulmuş ve son olarak 2 saat 32°C ile 41°C arasındaki değişken sıcaklık derecelerinde test edilmişlerdir. Çalışma sonucunda canlı ve ölü bireyler sayılarak sıcaklığa olan toleranslılıkları tespit edilmiştir. Sıcaklığa adapte edilmemiş ırkların toleranslılığı 33.3°C'den 41.1°C'ye değişiklik gösterirken, sıcaklığa adapte edilen ırklar için 34.8°C'den 39.2°C'ye değişkenlik gösterdiği bulunmuştur. İlk olarak *Heterorhabditis indicaen*'in sıcaklıklara toleranslı olduğu ardından ise *Heterorhabditis baceriophora* ve *Heterorhabditis megidis*'in sıcaklıklara toleranslı olduğu bulunmuştur.

Mukuka ve ark. (2010b), EPN *Heterorhabditis bacteriophora*'ya dayalı biyolojik kontrol ürünlerinin raf ömrü oldukça kısa olduğu için ırka ait IJ'ler su kaybına uğratarak raf ömrünün uzatılması sağlanmıştır. *H. bacteriophora*'nın 37 adet doğal ve 18 adet hibrit ırkı ile yaptıkları denemelerde, 200 IJ, 1 ml'de bulunan farklı konsantrasyon değerlerindeki PEG 600 solüsyonu içerisinde 24 saat 25°C'de tutulmuş daha sonra 24 saat rehidrasyon için 1 ml saklama çözeltisi içerisinde tutulmuştur. Adaptasyondan sonra tolere edilen kuraklık değerini belirlemek için IJ'ler 72 saat 25°C'de PEG 600 konsantrasyonlarında tutulmuş ve aynı işlemler tekrarlandıktan sonra sayım yapıp toleranslılıkları belirlenmiştir. Deneme sonucunda kuraklığa adapte edilmemiş ırkların toleranslılığı 0.90 ile 0.95 arasında değişirken adaptasyonu sağlanan ırklar 0.67 ile 0.99 arasında toleranslılık göstermektedir.

Mukuka ve ark. (2010c), *H. bacteriophora*'nın sıcaklığa ve kuraklığa toleranslı olan ırkları arasında çaprazlama ve genetik seleksiyon yaparak faydalı özellikleri arttırmayı amaçlamışlardır. Bunun için 60 farklı *H. bacteriophora* izolatını sıcaklığa ve kuraklığa olan toleransını belirlemek amacıyla denemeye almışlardır. Sıcaklığa karşı adaptasyonu sağlanmış bir nematodun ortalama sıcaklık toleransında 5.5°C'lik bir genel artış elde edilmiştir. Sıcaklığa adapte edilmemiş olanlarda ise 40.1°C'den 43.1°C'ye 3°C'lik bir artış gözlemlenmiştir. Kuraklığa toleransının belirlenmesinde ise, değerlendirme yapabilmek için ortalama su aktivitesi ölçülmüştür. Irkların kuraklığa adaptasyonundan sonra toleranslılığı 0.67'den 0.65'e, adaptasyon sağlanmadan önce ise 0.9'dan 0.7'ye düşmüştür.

Solomon ve ark. (1999), üç adet *Steinernema feltiae* izolatının (IS-6, IS-15, N8) kuraklığa olan toleranslılığını test etmişlerdir. Yavaş bir dehidrasyon rejiminde (23°C'de %97 bağıl nemde 3 gün boyunca ön koşullarında) tüm ırkların anhidrobiyoz durumuna neden olup daha az kurak şartlarda (%75 ve %85 bağıl nem) daha iyi hayatta kalmalarını sağlamıştır. İsrail'in çöl bölgesi Negev'den izole edilmiş IS-6 ırkı su kaybına en iyi dayanıklılığı göstermiş olup yine İsrail'in kuzey bölgesi Celile'den izole edilmiş olan IS-15 ırkı ise ikinci olarak en iyi dayanıklılığı göstermiştir. Irklar arasında en az dayanıklılığa ise Almanya'dan izole edilmiş olan N8 ırkı göstermiştir.

Wang ve Grewal (2002), yeni izole edilmiş *Heterorhabditis bacteriophora* GPS11 ırkının stres toleransına (UV, sıcaklık ve kuraklık) ve fizyolojik olarak uygunluğa (depolama stabilitesi, üreme potansiyeli ve virülans) etkisini belirlemek amacıyla bu çalışmayı yapmışlardır. Sıcaklığa toleransı belirlemek için 50 mm çaplı 5000 IJ saf suda 40°C'de 2 saat boyunca bekletilmiştir. Sıcaklıktan çıkarılan nematodlar uyusuk olduğu için bir gece boyunca oda sıcaklığında bekletilerek canlı ve ölü ayrımı yapılmıştır. Kuraklığa toleransında ise 24 hücreli kültür kabına 0.5 ml'lik nematod süspansiyonu (5000 IJ) konulmuş ve üzerine 0.5 ml (%50'lik) gliserol eklenilmiştir. Hazırlanmış olan 1 ml nematod süspansiyonu 25°C'de 72 saat inkübasyonda tutulmuştur. Uyuşuk hale geçen nematodların doğru bir şekilde sayım yapılabilmesi için 90 mm çaptaki petri kaplarında 9 ml saf su içerisinde tutulmuştur. *Galleria mellonella*'dan üç geçişten sonra nematodların sıcaklığa, kuraklığa ve UV'ye olan toleranslılığında, depolamasında ve üremesinde önemli derecede azalma meydana gelmiştir.

Liu ve Glazer (2000), İsrail'den izole edilen *Heterorhabditis* cinsine ait EPN'lerin kuraklığa olan toleranslılığını belirlemek amacıyla çalışmalar yapmışlardır. Bunun için ilk olarak *H. bacteriophora* HP88 ırkı izole edilmiş ve anhidrobiyosise girmesi için en uygun kuraklık şartları sağlanmıştır. IJ'lerin %97 ve %93 bağıl neme 96 saat maruz bırakıldıktan sonra hayatta kalma oranı %70 bulunurken bunun aksine HP88 ırkına ait IJ'ler %88 ve %85 bağıl neme maruz bırakıldıklarında bu oran %10'nun altına düşmüş hatta %100 ölümlerle sonuçlanmıştır. Bu çalışmalara ek olarak IJ'ler %97 ve %93 bağıl neme sırasıyla 24, 48, 72 ve 96 saat maruz bırakılmış ve hayatta kalma oranları %68-%79 arasında bulunmuş olmasına rağmen maruz bırakılan sürelerde istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunamamıştır. Bağıl nemin 24 ve 72 saat aralıklarla aşamalı olarak azaltılması (%97> %93> %88> %85) IJ'lerin hayatta kalma oranını (%30) arttırdığı gözlemlenirken doğrudan %85 neme maruz bırakılması (%0) ya da %85 bağıl neme maruz bırakılmadan önce daha yüksek nem seviyelerine maruz bırakılmasında bu oran (%15) daha fazla olmuştur. *H. bacteriophora* HP88 ırkı adaptasyon sağlandıktan sonra en az 18 gün canlı kalmayı başarabilmiştir. IJ'lerin %97 bağıl nemde canlılıkları %70-%85 arasında yer alırken %93 bağıl nemde ise %37-%60 arasında yer almıştır. Elde edilmiş olan bu veriler nematodun gövdesinden uzaklaştırılan suyun oranı ve minimum bağıl nem seviyesinin (>%93) IJ'lerin hayatta kalmalarını etkilediğini göstermiştir.

Bunun yanında İsrail'deki farklı iklim bölgelerinden izole edilmiş 12 adet Heterorhabditid popülasyonunun %97 bağıl nemde 72 saat boyunca adaptasyonu sağlandıktan sonra en fazla canlılık (%64) HIS-19 ırkında, HP88 dahil yedi izolatta (%40-%55) ortalama bir canlılık ve diğer ırklarda ise (<%25) daha az oranda canlılık kaydedilmiştir.

Kung ve ark. (1991), *Steinernema carpocapsae* ve *Steinernema glaseri*'nin hayatta kalma ve patojenite yeteneklerinde toprak sıcaklığı, nem ve bağıl nem etkilerini laboratuvar ortamında denemişlerdir. *S. carpocapsae*'nin hayatta kalma oranı ve patojenitesi düşük sıcaklıklarda (5-25°C) yüksek sıcaklıklardan (35°C) önemli derecede daha iyi sonuçlanmıştır. Bunun aksine *S. glaseri*'de ise hayatta kalma oranı ve patojenitesi yüksek sıcaklıklarda (15-35°C) düşük sıcaklıklardan (5°C) daha iyi sonuçlanmıştır. *S. carpocapsae* ve *S. glaseri*'nin sırasıyla %2 ve %4'lük az toprak nemlerinde hayatta kalma oranı daha yüksek bulunmuştur. Daha sonra test edilen nem oranları %16'ya çıkarılmış ve iki nematod türü *G. mellonella*'nın ölümüne neden olmuştur. Bu iki nematod türünün 32 günlük deneme sonucunda bağıl nemi %100'den %25'e düştüğü için hayatta kalma oranında ve patojenitesinde azalma meydana gelmiştir. *S. carpocapsae* ve *S. glaseri* %100 bağıl nemde hayatta kalmış fakat bağıl nem oranı azaldıkça her iki nematod türünde de canlılık azalmıştır. Örneğin, %25 bağıl nem oranında *S. carpocapsae* iki gün, *S. glaseri* ise sadece dört saat hayatta kalabilmiştir. Bu iki nematod türünün hayatta kalmalarında ve patojenitesinde görülen farklılıkların, nematodlara ait iklimsel özelliklerinden veya toprak habitatlarından kaynaklandığı söylenebilir.

Susurluk ve ark. (2013), EPN'lerin açık hava uygulamalarında yüksek sıcaklık ve su kaybı, nematodların arazideki etkinliğini ve hayatta kalmasını olumsuz etkilemektedir. EPN'lerin hibridizasyonu, bu iki olumsuz faktörün etkisini geride bırakmaktadır. Bunun için, Türkiye'nin çeşitli coğrafik bölgelerinden izole edilmiş birbirinden farklı 6 yerli ırk hibritlenmiş ve oluşan 10 hibrit ırkın yüksek sıcaklık ve su kaybına olan toleranslarını incelemişlerdir. Sıcaklığa toleranslılığını belirlemek için 24'lü hücre kültür kaplarına 500 IJ ve 500 µl saf su eklenerek tüm hibrit ırklar 2 saat boyunca 6 sıcaklığa (32, 34, 36, 38, 40 ve 42°C) maruz bırakılmıştır. Daha sonra tüm ırklar 24

saat oda sıcaklığına adaptasyonu sağlanıp ölü ve canlı sayımı yapılmıştır. Su kaybına olan toleranslılığı belirlemek için ise 24'lü hücre kültür kaplarına 500 IJ ve 500 µl PEG 600'ün %10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80 konsantrasyonları eklenerek 24 saat boyunca 25°C'de tutulmuştur. Dehidrasyon nedeniyle uyusuk döneme giren nematodların rehidrasyonu için IJ'ler saf su ile yıkanıp 24 saat bekletildikten sonra canlı ve ölü sayımı yapılmıştır. Denemeler sonucunda yüksek sıcaklık için popülasyonun %50'sinin ve %10'nun canlı kalabildiği ortalama sıcaklık sırasıyla (MT<sub>50</sub> ve MT<sub>10</sub>) olarak belirlenmişken su kaybı için lethal konsantrasyon ise sırasıyla (LC<sub>50</sub> ve LC<sub>90</sub>) olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar hibrit ırkların ebeveynlerine göre yüksek sıcaklığa biraz daha tolerans gösterebilirken hibrit ırklar su kaybına ebeveynlerine göre daha fazla tolerans gösterdiği bulunmuştur.

Tarasco ve Triggiani (2010), Cezayir'den elde edilen EPN'lerin kuraklığa toleransını test etmişlerdir. IJ'lerin membran filtrelerde iki bağıl neme doğrudan maruz bırakılması üzerine 6 adet Cezayir EPN ırkının hayatta kalmasını değerlendirmek için laboratuvar deneyleri yapılmıştır. İrklar Cezayir'de farklı biyotoplardan izole edilip iki türe ait; *Steinernema feltiae* (4 ırk) ve *Heterorhabditis bacteriophora* (2 ırk) bulunmuştur. Elde edilen IJ'ler 20°C'de 5 güne kadar %84 ve %76 bağıl nem oranlarına maruz bırakılıp canlılıkları günde iki defa kontrol edilmiş ve deneyler üç defa tekrarlanarak yapılmıştır. Denemeler sonucunda IJ'lerin hayatta kalması bağıl nem azaldıkça ve maruz bırakılma süresi arttıkça azaltmıştır. Nematodların kuraklığa karşı toleransı, özellikle en uzun hayatta kalma yeteneği sergileyen *H. bacteriophora* ırkı için daha fazla olmuştur. %84 bağıl nemde *H. bacteriophora* ırkında en az beş günlük kuruma toleransı ile %26-33'lük oranda canlılık gözlemlenirken, diğer nematodlarda ise beş gün sonra daha düşük oranda (%8-11) bir canlılık gözlemlenmiştir. %76 bağıl nemde *H. bacteriophora* ırkı en az beş gün (%12-18) yaşarken, *S. feltiae* ırkı sadece 3 gün ( hayatta kalan IJ'lerin %5-10'u) hayatta kalmıştır.

Shapiro ve ark. (1997), hibridizasyon yoluyla *Heterorhabditis bacteriophora* ile yaptıkları bir denemede ısıya olan toleransın genetik olarak iyileştirilmesini incelemişlerdir. Bunun için beş *H. bacteriophora* ırkının sıcaklığa toleransı denenmiştir. Bunlar; IS5 ırkı, HP88 ırkı, mutant HP88 ırkı, IS5 ve HP88 arasındaki çaprazlamadan

oluşan ırk, IS5 ve mutant arasındaki çaprazlamadan oluşan ırk olup kolaylık sağlamak amacıyla bu ırklar sırasıyla IS5, HP, HPM, IH ve IM olarak anılmıştır. Elde edilen 1000 IJ 40°C’de 2 saat çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. *H. bacteriophora*, IS5 ve HP88 ırkı arasındaki çaprazlamadan oluşan ırk gelişmiş bir ısı toleransı sergilemiştir. 40°C’de IH ve IM hibrit ırklarının hayatta kalması HP ve HPM ırklarından daha fazla ve IS5 ile benzer olduğu bulunmuştur. HP ve HPM ırkları arasında ısıya toleransta herhangi bir farklılık bulunamamıştır. Bu veriler IS5’teki ısı toleransı özelliğinin baskın olduğunu göstermiştir.

Shapiro-Ilan ve ark. (2005), yeni keşfedilen EPN *Heterorhabditis mexicana* (MX4) ırkı biyolojik mücadeledeki potansiyelini laboratuvar ortamında araştırmak amacıyla diğer EPN türleri ile etkinlik, çevre şartlarına toleranslılık (sıcaklık, su kaybı ve düşük oksijen seviyeleri) ve konukçu arama yeteneklerinin karşılaştırılması üzerine denemeler yapmışlardır. Yüksek sıcaklık denemelerinde 2000 IJ 40°C’de 2 saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakılırken, su kaybı denemelerinde ise 2000 IJ %85 bağıl neme 48 saat maruz bırakılmıştır. Yüksek sıcaklık denemelerinde *S. riobrave* diğer EPN ırklarına göre 5 kat daha fazla toleranslılık gösterirken geri kalan ırklar arasında istatistiksel olarak bir farklılık bulunamamıştır. Su kaybına toleranslılık denemelerinde ise *H. bacteriophora*, *S. carpocapsae* ve *S. feltiae* geriye kalan *H. indica* ve *H. mexicana* ırklarından daha iyi sonuç vermiştir.

Shapiro-Ilan ve ark. (2009), yeni keşfedilen EPN *Heterorhabditis georgiana*’nın (Kesha ırkı) biyolojik mücadeledeki potansiyelini laboratuvar ortamında araştırmak amacıyla diğer EPN türleri ile etkinlik, çevre şartlarına toleranslılık (sıcaklık, su kaybı ve donmaya) ve konukçu arama yeteneklerinin karşılaştırılması üzerine denemeler yapmışlardır. Yüksek sıcaklık denemelerinde 2000 IJ 37°C’de 3 ve 4 saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Üç saatlik maruziyet sonucunda en yüksek tolerans *S. carpocapsae* ve *S. riobrave*, ardından *H. bacteriophora* ve *H. indica*, en düşük tolerans ise *H. georgiana* ve *S. feltiae* bulunurken 4 saatlik maruziyet sonrası *S. riobrave*’in *S. carpocapsae*’den daha fazla tolerans göstermesi dışında 3 saatlik maruziyetle aynı sonuçlar bulunmuştur. Su kaybı denemelerinde ise 2000 IJ %85 bağıl nem de 24 ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bir ve iki günlük maruz bırakma sonucunda sırasıyla *S.*

*carpocapsae*, *S. feltiae* ve *S. riobrave* en iyi toleransı gösterirken geri kalan üç *Heterorhabditis* türü istatistiksel olarak aynı olup en az toleransı göstermiştir. Yüksek sıcaklık ve su kaybı denemelerinde *Steinernema* türleri, *Heterorhabditis* türlerine göre daha iyi sonuçlar vermiştir.

Nimkingrat ve ark. (2013), *Steinernema* cinsi entomopatojen nematodların su kaybına toleransını belirlemek için çalışmalar yapmışlardır. Su kaybına tolerans; PEG 600 konsantrasyonuna adaptasyonu sağlanarak ve doğrudan uygulama yapılarak değerlendirilmiştir. Su kaybı oluşturabilmek için 250 IJ değişken su aktiviteli PEG 600'ün 1 ml solüsyonuna maruz bırakılmıştır. Su kaybına toleransı adaptasyon uygulamadan değerlendirebilmek için IJ'ler 25°C'de 24 saat 0.982, 0.949, 0.943, 0.938, 0.93 ve 0.92  $a_w$  değerlerine maruz bırakılmıştır. Adaptasyondan sonra ise stres koşullarına toleransı değerlendirmek için; IJ'ler ilk olarak 25°C'de 48 saat 0.95'lik  $a_w$  değerine daha sonra ise 10 farklı PEG 600 konsantrasyonlarına (0.982, 0.949, 0.933, 0.909, 0.883, 0.851, 0.814, 0.79, 0.761 ve 0.725) aktarılmıştır. IJ'ler rehidre edildikten sonra hayatta kalan nematod sayısı belirlenmiş ve türler arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Adaptasyon uygulanmamış ve stres koşullarına en toleranslı tür *S. carpocapsae* olup ardından *S. abbasi* olmuştur. En az toleranslı türler ise; *S. krausseii*, *S. glaseri* ve *S. ethiopiense* olmuştur. Adaptasyon sağlandıktan sonra stres koşullarına toleranslılık daha artarken türlerin tolerans sıralamasında bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Salame ve ark. (2010), İsrail'in farklı yerlerinden Heterorhabditidae ve Steinernematidae familyalarına ait yeni EPN popülasyonları izole etmişlerdir. Elde edilen bu nematodların çevresel streslere toleranslılığını belirleyip üstün bir izolatın seçilmesi için sıcaklığa ve kuraklığa toleranslılık deneyleri yapmışlardır. Nematodların sıcaklığa toleransını belirlemek için 5000 IJ, 15 ml saf su içerisinde 37°C'de 6 saat boyunca 40 rpm'de çalkalanmıştır. Elde edilen sonuçlar; Steinernematid ve Heterorhabditid ırkı %70'den daha fazla canlılık gösterirken çoğu popülasyon orta seviyelerde ısı toleransı göstermiştir. Kuraklığa toleranslılığın belirlenmesinde ise hızlı ve yavaş olmak üzere iki değerlendirme yapılmıştır. Hızlı su kaybında 5000 IJ, 80 dakika boyunca oda sıcaklığında %55-65 bağıl neme maruz bırakılmıştır. Yavaş su

kaybının değerlendirilmesinde ise çeşitli popülasyonlardan gelen IJ'ler 72 saat boyunca %97 bağıl neme maruz bırakılmıştır. Nematodlar bu işlem sırasında suyun vücutlarından yavaşça çıkarılmasının neden olduğu anhidrobiyotik duruma girmiştir. IJ'ler ek olarak 48 saat %93 bağıl nemde kurutucularda inkübe edilip daha sonra rehidrasyonları sağlanmıştır. IJ'lerin hızlı kuruması sonucunda Steinernematid familyasına ait nematodların çoğunda canlılıklarında ciddi bir düşüş (> %30) olmuştur. Heterorhabditid familyasında en fazla canlılık Devora'dan elde edilen izolatta olmuştur. IJ'lerin yavaş kuruması sonucunda Steinernematidae familyasına ait en fazla canlılık Susita Kineret'ten elde edilen izolatta olurken diğer Steinernematidae ve Heterorhabditidae popülasyonlarının canlılığı %30 ile %50 arasında değişmiştir.



### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. *Galleria mellonella* Larvalarının Üretilmesi

Laboratuvar denemeleri için yapılan *in vivo* ve *in vitro* üretimlerinde EPN'lere karşı duyarlılık gösteren, çok sayıda yumurta bırakabilen, üretilmesi kolay olan ve petek güvesi olarak adlandırılan *Galleria mellonella*'nın (L.) (Lep: Pyralidae) son dönem larvası kullanılmıştır (Woodring ve Kaya 1988, Ehlers 1996, Shapiro-Ilan ve Gaugler 2002). *G. mellonella* yumurtaları 1 kg'lık cam kavanozlar içerisine konulup üzerine sık gözenekli tel örtü geçirilip 30-32°C'ye ayarlı inkübatöre yerleştirilmiştir. Yumurtadan çıkan larvaların gelişmesi için besin ortamı hazırlanmıştır. Besin ortamı için önerilen tarifin düzenlenmesi ile bal, kepek, gliserin, mısır unu, soya unu, süt tozu ve maya kullanılmıştır (Çizelge 3.1). İlk olarak mısır unu, süt tozu, soya unu ve kepek büyük bir kapta karıştırılmıştır. Bal ve gliserin besin yapılacak olan kap içerisine alınıp 200°C üzerinde kaynayana kadar karıştırılır, kaynadıktan sonra üzerine maya ilave edilerek mayanın iyice erimesi sağlanır. Maya eriyip hafifçe köpürmeye başladıktan sonra diğer malzemeler yavaş yavaş eklenir ve homojen bir görünüm sağlanana kadar karıştırılır. Hazırlanan besin soğuduktan sonra 1 kg'lık cam kavanozların üçte ikisine kadar doldurulur (Şekil 3.2). Besin içerisinde bulunan yumurtalar 4-6 hafta gözlemlenmiş ve son larva dönemine ulaştığında ayıklanarak bir kısmı tez kısmında yer alan denemeler için bir kısmı ile de kültürlerin yenilenmesinde kullanılmıştır. *G. mellonella*'nın yumurta, larva ve ergin evreleri daima laboratuvar ortamında bulundurulmuştur.

**Çizelge 3.1.** *G. mellonella* besin içeriği

200 g bal
200 g kepek
200 g gliserin
150 g mısır unu
100 g soya unu
100 g süt tozu
50 g maya



**Şekil 3.1.** Hazırlanmış besin ortamının görüntüsü



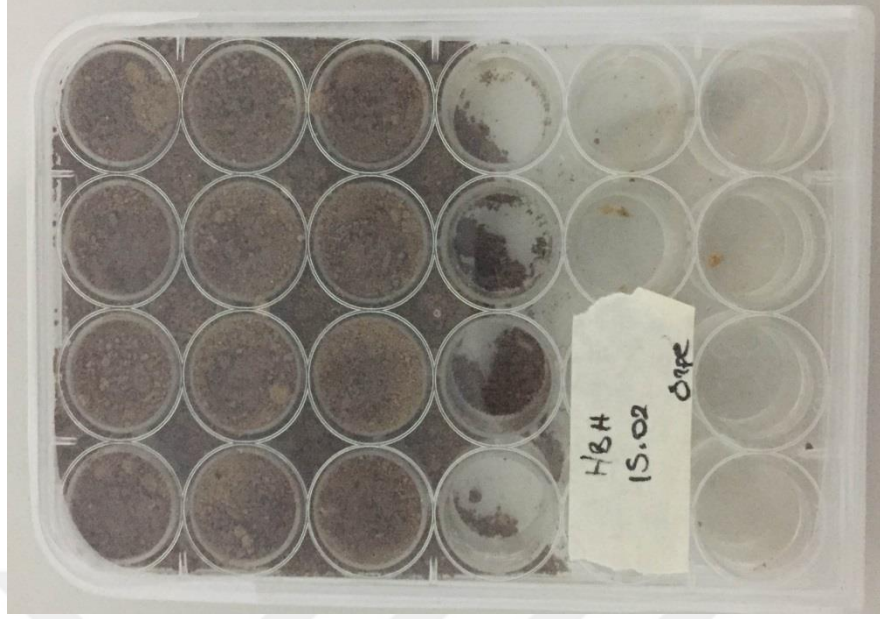
**Şekil 3.2.** Etüv içerisinde *G. mellonella* larvalarının yetiştirildiği kavanozlar



Şekil 3.3. Yem içerisinde bulunan *G. mellonella* larvaları

### 3.2. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının *In vivo* Olarak Üretilmesi

Çalışmalarda daha öncesinden elde edilmiş *H. bacteriophora* HBH hibrit ırkı sürekli *in vivo* olarak yenilenmiş ve 4°C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir. *In vivo* üretimde *G. mellonella*’nın son dönem larvası ve 24 kuyulu hücre kültür kapları kullanılmıştır (Şekil 3.4). Denemede her biri 2 cm derinliğinde ve 1,5 cm çapından bulunan hücrelere 1 adet larva konulmuş ve üzeri %10 steril Ringer solüsyonu nemlendirilmiş olan steril kum ile kaplanmıştır (Şekil 3.5). Hücrelerde ki her bir larva başına 100 adet IJ inokule edilerek plate’ler parafilm ile kapatılmıştır (Şekil 3.6) (Susurluk ve ark. 2001, 2003). Kapatılan kaplar 24°C’de inkübasyona bırakılmış ve inokulasyonu takip eden 4 gün içerisinde larvalar ölmüştür. Ölen larvalar (kadavra) steril Ringer solüsyonu ile yıkayıp White Trap düzeneğine alınmıştır. White Trap düzeneğinde 9 cm çaplı büyük cam petri içerisine 6 cm çaplı cam petri ters çevrilerek üzerine filtre kâğıdı konulmuş ve EPN’ler ile enfekteli olan larvalar bu filtre kâğıtlarının üzerine konulmuştur. Ardından 9 cm çaplı petri içerisine 15 ml steril Ringer solüsyonu eklenip 14 gün boyunca gözlemlenmiştir (Şekil 3.7). Yeterince çıkış yapıp steril Ringer içerisinde biriken IJ’ler pastör pipet ile alınıp flaslara konulmuştur (Şekil3.8). Flaslara alınan IJ’ler 4°C’de buzdolabında saklanmıştır (Şekil 3.9) (Kaya ve Stock 1997).



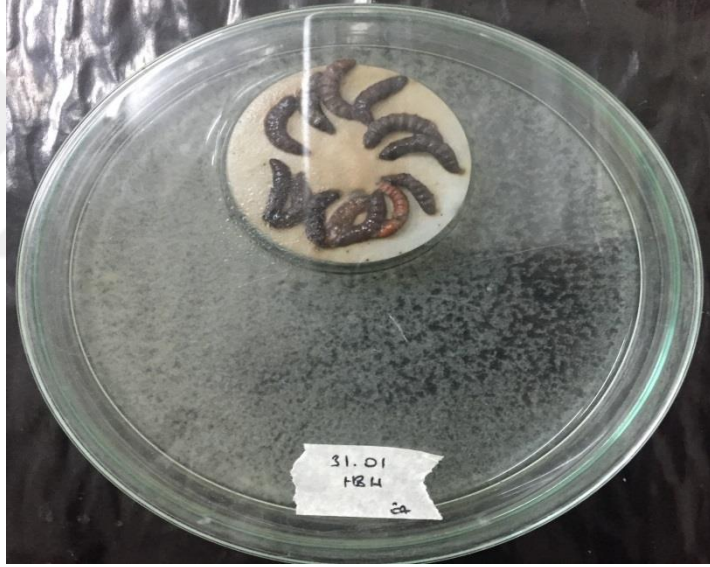
Şekil 3.4. İnkübasyona bırakılan 24 hücreli kültür kabı



Şekil 3.5. Üzeri toprakla kapatılmış larvaların alttan görünüşü



Şekil 3.6. Larvalara IJ inokule edilmesi



Şekil 3.7. White Trap düzeneği ve çıkış yapan IJ'ler



Şekil 3.8. IJ'lerin alındığı flask kutusu



Şekil 3.9. Buzdolabında stoklanan IJ'ler

### 3.3 *Heterorhabdites bacteriophora* HBH Hibrit Irkının *In Vitro* Olarak Üretilmesi

#### 3.3.1. Çalışma esnasında kullanılan kimyasal maddeler

Çizelge 3.2. Ringer solüsyonu içeriği

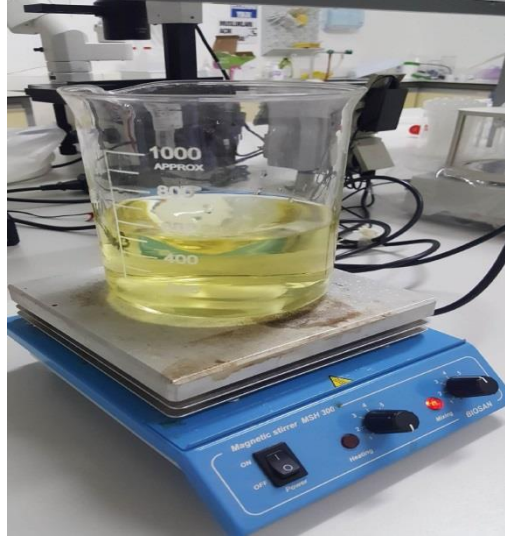
Kimyasal madde adı	Miktar (g)
NaCl	9.00
KCl	0.42
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.37
NaHCO <sub>3</sub>	0.20
Saf su	1000 ml



Şekil 3.10. Ringer solüsyonu içerik malzemeleri

Çizelge 3.3. YS besin ortamı içeriği

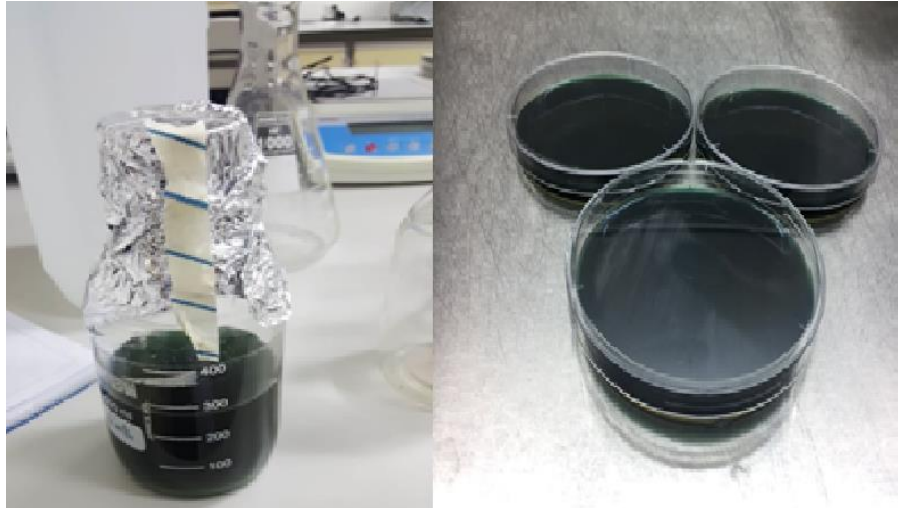
Kimyasal madde adı	Miktar (g)
Yeast extract	5.0
NaCl	5.0
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.2
Saf su	1000 ml



Şekil 3.11. YS sıvı besin ortamının hazırlığı

Çizelge 3.4. NBTA agar içeriği

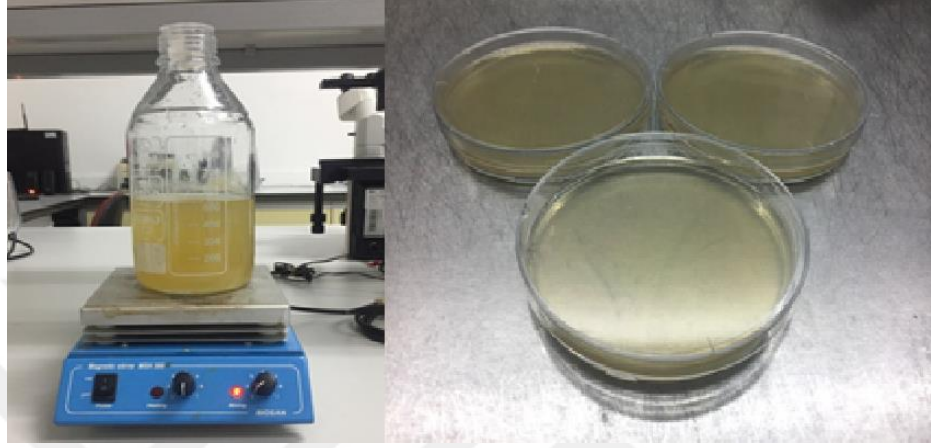
Kimyasal madde adı	Miktar (g)
Standard-I-Nurient Agar	37.0
Bromthymolblue	0.025
2,3,5-Triphenyl-tetracolumchloride solution	4
Saf su	1000 ml



Şekil 3.12. NBTA agar hazırlığı ve petrideki görüntüsü

**Çizelge 3.5.** Nutrient Lipid (Wouts) agar içeriği

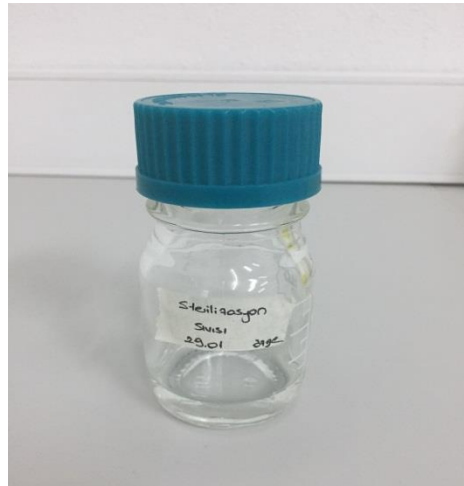
<b>Kimyasal madde adı</b>	<b>Miktar (g)</b>
Nutrient Broth	16.0
Agar powder, Bacteriological	12.0
Ayçiçek yağı	5.0
Saf su	1000 ml



**Şekil 3.13.** Wouts agar hazırlanması ve petrideki görünümü

**Çizelge 3.6.** Sterilizasyon solüsyonunun içeriği

<b>Kimyasal madde adı</b>	<b>Miktar (ml)</b>
NaOCl	1
4 M NaOH	1
Saf su	10



**Şekil 3.14.** Sterilizasyon sıvısının görüntüsü

### 3.3.2. *Photorhabdus luminescens* bakterisi izolasyonu

Entomopatojen nematodların yaşamlarına devam edebilmesi, üreyebilmesi ve konukçu böceği öldürebilmesi için simbiyont bakteriye ihtiyacı vardır (Poinar 1975, Forst ve ark. 1997). Özel bir kese içerisinde yer alan bu bakteri *Photorhabdus luminescens*, barsak kısmının ön kısmında bulunan *H. bacteriophora* ile simbiyont ilişki içerisinde (Endo ve Nickle 1994, Duchaud ve ark. 2003). Bu sebeple EPN'lerin *in vitro* olarak üretilmelerinde önemli bir yer almaktadır. *P. luminescens* bakterisi izolasyonu için, hücre kültür kaplarının her bir kuyucuğuna bir adet gelecek şekilde toplamda 5 adet son dönem *G. mellonella* larvası kullanılmıştır. Her bir kuyucuğa konulmuş larva üzerine %10 oranında steril Ringer solüsyonu ile nemlendirilmiş steril kum ile kaplandıktan sonra üzerine 100 adet IJ gelecek şekilde inokulasyona bırakılmıştır. Plate'lerin kapağı kapatılıp parafilm ile sarıldıktan sonra 1 gün 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Belirtilen gün sonunda hareketleri yavaşlayan larvalar plate içerisinden çıkartılarak Ringer solüsyonu ile yıkanıp eppendorf tüplere 1 adet konulmuştur. Eppendorf tüpler içerisinde ki larvaların üzerine %70'lik etil alkol eklenerek 5 dakika bekletilmiş ve yüzey sterilizasyonu sağlanmıştır (Şekil 3.15). Süre sonunda eppendorf tüpler steril kabin içerisinde açılarak larvalar çıkartılıp kurutulmuştur.



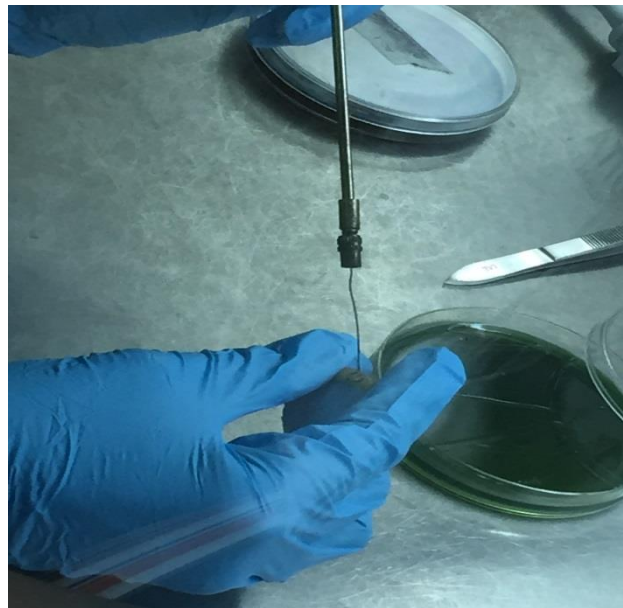
Şekil 3.15. Larvaların yüzey sterilizasyonu

Kuruyan larvalar parmak arasına alınarak steril iğnenin ucu ile ventralinden delinerek larvanın vücut sıvısı olan hemolinf vücut dışına çıkartılmıştır (Şekil 3.16).



**Şekil 3.16.** Larvanın ventralinin delinip hemolinf sıvısının çıkartılması

Vücut dışına çıkan hemolinf steril bir öze alınarak (Şekil 3.17) NBTA agara sürülmüş (Şekil 3.18) ve etrafı parafilm ile kapatılarak 25°C’de 3 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır.



**Şekil 3.17.** Vücut dışına çıkan hemolfin steril öze ile alınması

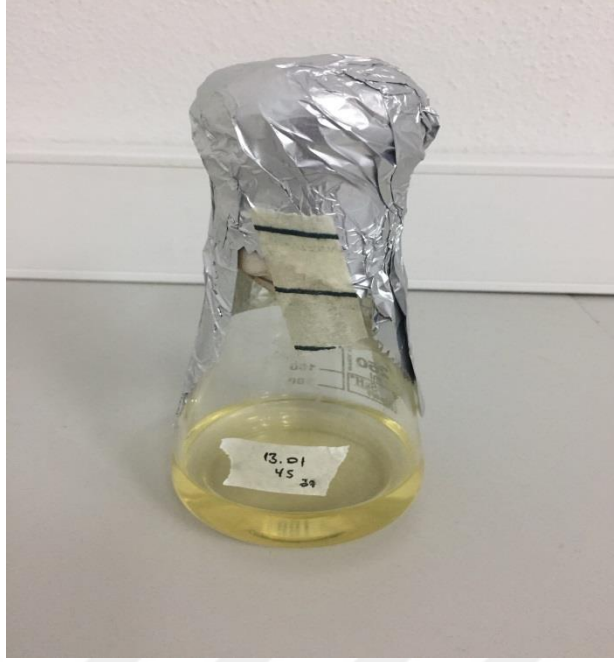


**Şekil 3.18.** Hemolinf sıvısının NBTA agara sürülmesi

Üç gün sonunda agar üzerinde bakteri kolonileri oluşmaya başladığında (Şekil 3.19) koloniden örnek alınarak mikroskop altında hücre şekli, boyu gibi morfolojik özelliklerine bakılırken, agar yüzeyinde ise rengi ve koloni şekli gibi özellikleri incelenip simbiyotik bakteri teşhisi yapılmıştır. Teşhis edilen kolonilerden steril bir öze yardımı ile biraz alınarak 250 ml'lik erlen içerisinde bulunan 80 ml'lik steril YS sıvı besin ortamına (Şekil 3.20) bırakılmış ve bakteri üretimi gerçekleştirilmiştir.

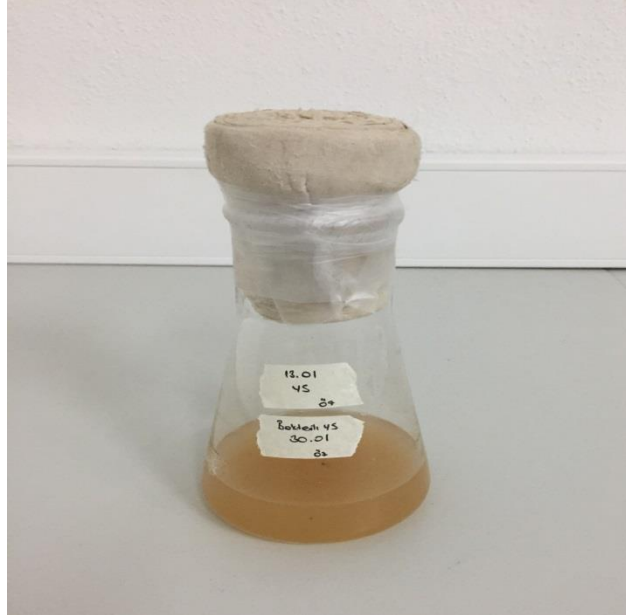


**Şekil 3.19.** Agar üzerinde oluşan koloniler



**Şekil 3.20.** YS sıvı besin ortamı

Agar yüzeyinden bakteri ilave edilen YS besin ortamı 25°C’de 180 rpm’e ayarlanmış olan orbital çalkalayıcıya yerleştirilerek karanlık ortamda 1 gün bekletilmiş ve bakterilerin YS sıvı besin ortamında çoğalması sağlanmıştır (Şekil 3.21).



**Şekil 3.21.** İnokulasyondan bir gün sonra YS sıvı besin ortamı

Bir gün sonunda orbital alkalcıda üreyip çoğalan bakteriler stok oluşturmak için bakteri kültürü steril kabinde ağzı açılarak içerisine %10 oranında steril gliserin eklenmiştir. Bakteri ve gliserin karıştırıldıktan sonra 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine 1ml'lik aktarılarak -20°C'de stoklanmıştır (şekil 3.22).



şekil 3.22. Stoklanmış bakteriler



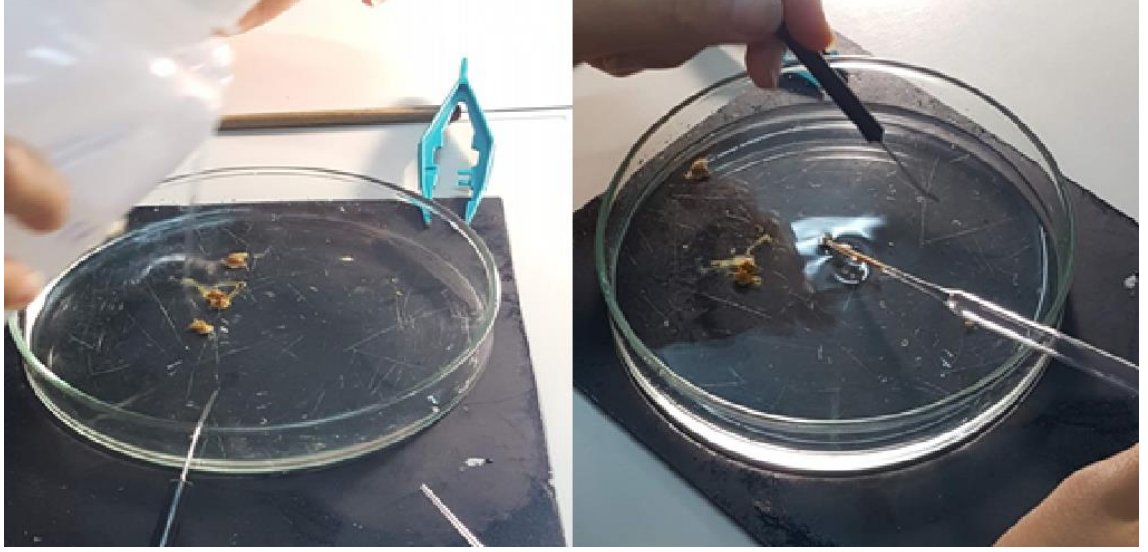
şekil 3.23. Eppendorf tüplerde bakterilerin stoklanması

### 3.3.3. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH hibrit ırkından yumurta izolasyonu

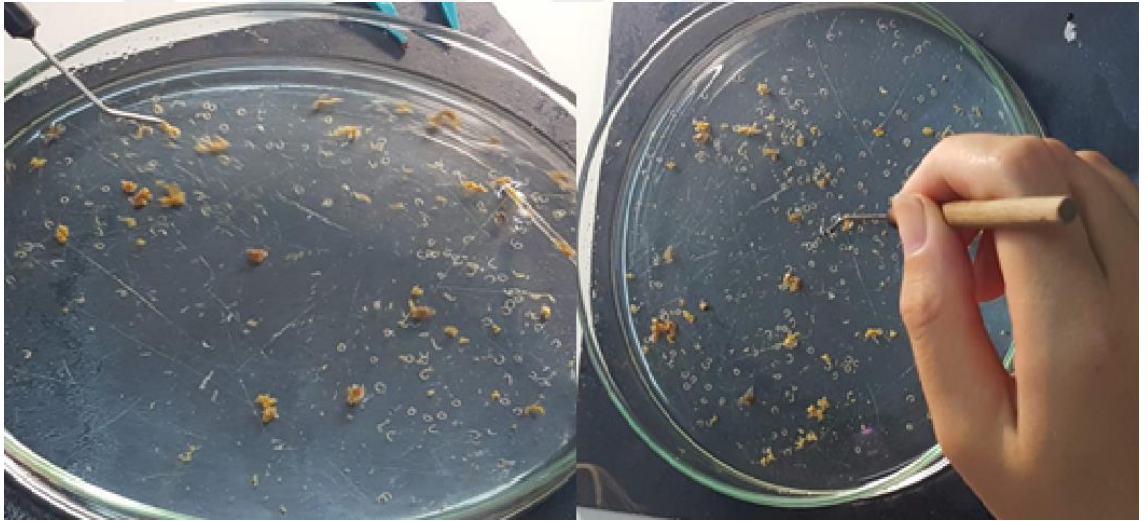
Entomopatojen nematodların *in vitro* olarak üretimi, bakteri izolasyonundan sonra yumurta izolasyonunun yapılması bu işlemlerin birleşmesi ile son bulmaktadır. Yumurtaların izole edilebilmesi için hermafrodit veya döllenmiş dişi bireylere ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun için öncelikle *in vivo* üretimde olduğu gibi 24 kuyulu hücre kültür kaplarında her bir hücreye bir adet larva konulup %10 Ringer solüsyonu ile nemlendirilmiş toprak ile kapatıldıktan sonra her bir larva başına 100 adet IJ ilave edilmiştir. İnokulasyondan sonra plate parafilm ile kapatılarak 24°C'de 3-4 gün inkübasyona bırakılmıştır. Üçüncü ve dördüncü günlerde larvalar çıkartılıp disekte edilerek hermafroditlerin döllenip döllenmediği kontrol edilmiştir. Disekte işlemi için ölen larvalar (kadavra) kumdan ayrılıp 12 cm çaplı cam petriye alınarak pens ve iğne yardımı ile baş kısmı kesilip iç kısmı dışarıya çıkartılmıştır (Şekil 3.24). Üzerine Ringer solüsyonu eklenerek cam pipetler ile hermafroditlerin içersindeki pisliklerden ayrılması sağlanmıştır (Şekil 3.25). Bu işlemden sonra 6 cm çaplı cam pipet içerisine Ringer solüsyonu eklenip yaklaşık 250-300 adet hermafrodit birey nematod iğnesi ile toplanarak (Şekil 3.26) 6 cm'lik cam petriye alınmıştır (Şekil 3.27). Alınan hermafroditlerin mikroskop altında döllenip döllenmediği tekrar kontrol edilmiştir (Şekil 3.28).



Şekil 3.24. Kadavraların topraktan ayırt edilmesi ve iç kısmının çıkartılması



**Şekil 3.25.** Disekte işlemine Ringer solüsyonu eklenmesi ve hermafrodit bireylerin cam pipetle ayrılması



**Şekil 3.26.** Ayrılan hermafroditler ve hermafroditlerin nematod iğnesi ile toplanması



**Şekil 3.27.** Cam petrilere toplanmış olan hermafroditler



**Şekil 3.28.** Dölllenmiş hermafrodit birey

6 cm'lik cam petri içerisinde bulunan 250-300 adet hermafrodit birey pastör pipet ile cam tüp içerisine alınmış ve üzerine 5 ml steril Ringer solüsyonu eklenmiştir. Hermafrodit bireyler dibe çöktükten sonra pisliklerin arındırılması için cam tüpten Ringer solüsyonu çekilip tekrar 5 ml kadar steril Ringer solüsyonu eklenmiştir (Şekil 3.29). Bu işlem hermafrodit bireylerin temizlenmesi için birkaç kez tekrar edilmiştir.



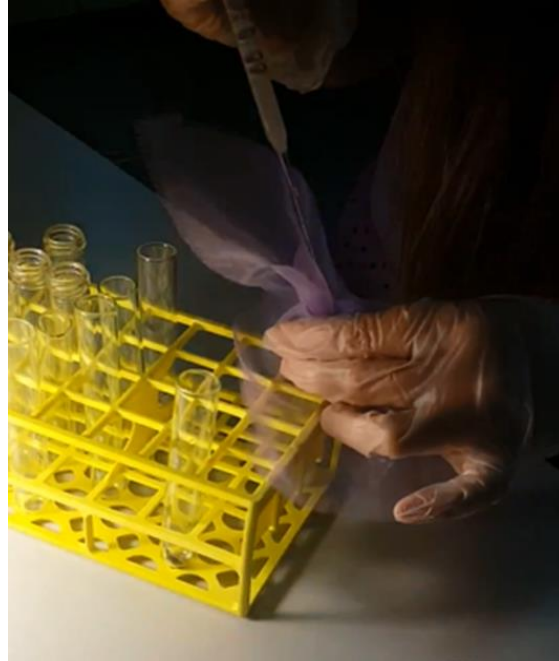
**Şekil 3.29.** Hermafrodit bireylerin dibe çökmesi ve Ringer solüsyonunun çekilmesi

Hermafroditlerin yüzey yıkama işlemi bittikten sonra makas ile ufak parçalara ayrılmış jilet tüp içerisine ilave edilip vorteks veya manyetik karıştırıcıda 1 dakika tutularak hermafroditlerin parçalanması (Şekil 3.30) sağlanmıştır. Parçalanmış hermafroditlerin içerisinde bulunan yumurtalar bu sayede ortaya çıkmaktadır. Vortekste veya manyetik karıştırıcıda tutulan bu sürenin daha az veya daha fazla olamamasına dikkat edilmelidir. Daha az tutulduğunda hermafroditler parçalanamazken daha fazla tutulmasında ise yumurtalarda parçalanabilmektedir. Daha öncesinde şeffaf renkli olan Ringer solüsyonu beyazımsı bir renk aldığı anda işlem yeterli olmaktadır.



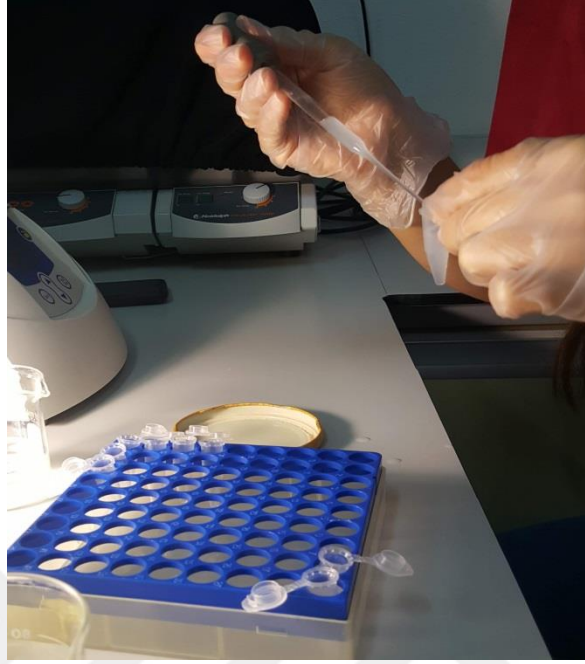
**Şekil 3.30.** Vortekste jilet ile hermafroditlerin parçalanması

Bu işlemin ardından açığa çıkan yumurtalar daha sonra tül geçirilmiş başka bir tüpe cam pipet (Şekil 3.31) yardımı ile aktarılmıştır. Bu sayede hermafrodit kalıntılarında ve jilet parçalarından filtrelenmiş olmaktadır.



**Şekil 3.31.** Parçalanmış hermafroditlerin tülenden geçirilmesi

Cam tüpe alınmış olan yumurtaların da yüzey temizliğinin yapılabilmesi için 1.5 ml'lik eppendorf tüpler içerisine 1 ml kadar aktarılmıştır (Şekil 3.32).



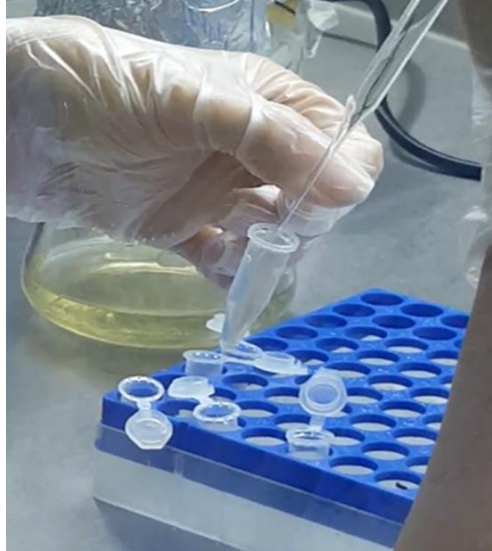
**Şekil 3.32.** Ringer solüsyonlu yumurtaların eppendorf tüplere alınması

Tüpler 2000 rpm'de bir dakika boyunca santrifüj edilmiştir (Şekil 3.33). Santrifüj sonrasında yumurtalar dibe çökmüş (pellet) ve üstte kalan sıvı (supernatant) ise cam pipet yardımı ile alınarak üzerine tekrar steril Ringer solüsyonu eklenmiştir. Bu işlem yumurtaların yüzeyinde kalan hermafrodit ve diğer artıkların temizlenmesi amacıyla 3-4 kez aynı işlem tekrarlanmıştır. Santrifüj işlemi sırasında yumurtaların bir kısmı kaybedilmektedir. İşlemin çok sayıda tekrar edilmesi ise tüm yumurtaların kaybına neden olabilmektedir. Son kez yapılan santrifüj işlemi ile yumurtalar dibe çökmüş ve supernatant tamamen temizlenmiştir. Bu işlemden sonra kalan sıvı cam pipet ile çekilmiş ardından yumurtaların yüzey sterilizasyonu için eppendorf tüplere sterilizasyon solüsyonu eklenmiştir. Sterilizasyon işleminin yedi dakikadan daha kısa veya daha uzun sürmemesine dikkat edilmelidir. Daha kısa sürede yapılması durumunda kontaminasyon problemi oluştururken daha fazla sürede yapılmasında yumurtalar ölmektedir. Yüzey sterilizasyonu eppendorf tüplere eklendikten sonra ilk olarak dört dakika boyunca nazikçe elde çalkalanmış ve daha sonra 3000 rpm'de iki dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Sterilizasyon solüsyonu ile santrifüj işlemi bir kez yapılmıştır.



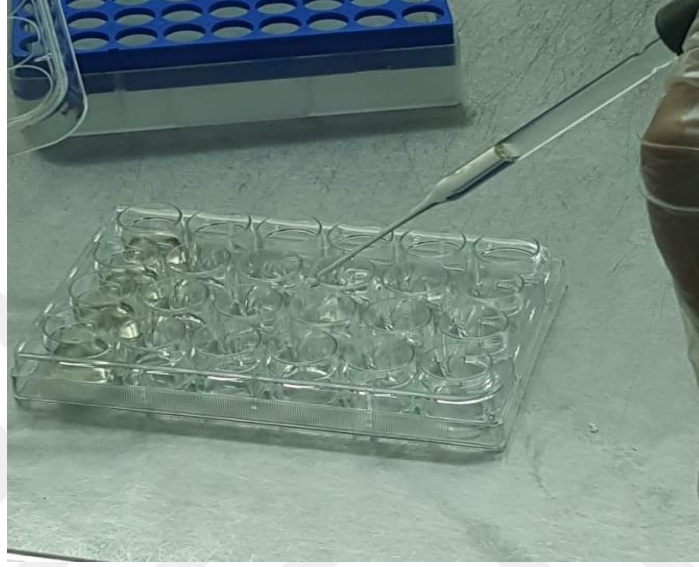
**Şekil 3.33.** Santrifüj cihazı

Santrifüj sonrası yumurtalar dibe çökmüş üzerinde sterilizasyon sıvısı kalmıştır. Sterilizasyon sıvısının alınması için eppendorf tüplerin çalkalanmamasına dikkat edilerek tüp standına dizilip steril kabine getirilmiştir. Steril kabin içerisinde eppendorf tüplerin kapağı açılıp yumurtaların üzerinde kalan sterilizasyon sıvısı steril cam pipet ile alınmış ve üzerine steril YS sıvı besin ortamı eklenmiştir (Şekil 3.34).



**Şekil 3.34.** Yumurtalar üzerine YS sıvı besin ortamının eklenmesi

Tüplerin içerisinde bulunan yumurtalar son olarak 3000 rpm'de iki dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası eppendorf tüpler steril kabine alınmış ve 300 µl steril YS besin ortamı eklenmiş olan steril 24'lü hücre kültür kaplarına eşit miktarda aktarılmıştır (Şekil 3.35). Plate'nin kapağı kapatılarak etrafı parafilm ile sarılmış ve izole edilen yumurtalar 24°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.36).



Şekil 3.35. 24' lü hücre kaplarına YS besin ortamının eklenmesi



Şekil 3.36. İzole edilen yumurtalar

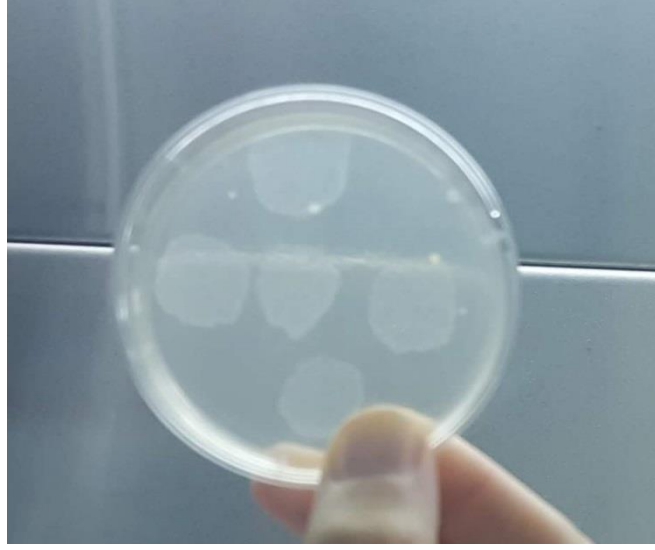
#### 3.3.4. Katı nematod kültürünün hazırlanması

Agar ortamında monoksenik kültür şeklinde EPN'lerin *in vitro* üretimleri gerçekleştirilmektedir. Monoksenik kültürde simbiyotik bakteri ve EPN'ler kullanarak kontrollü üretim sağlanmaktadır. Katı kültürün hazırlanmasında yer alan EPN hem yumurta izolasyonu hem de bakteri izolasyonunda ileri derecede önem taşımaktadır. HBH hibrit ırkının *in vitro* üretimi için ilk işlem daha önceden izole edilip 1.5 ml'lik eppendorf tüplere konan ve  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de stoklanan *P. luminescens* simbiyont bakterisinden iki adet çıkartılıp oda sıcaklığında eritilmiştir. Oda sıcaklığında eritilen simbiyont bakteri 250 ml'lik erlen içerisindeki 70 ml olan steril YS sıvı besin ortamına aktarılmıştır (Şekil 3.37).

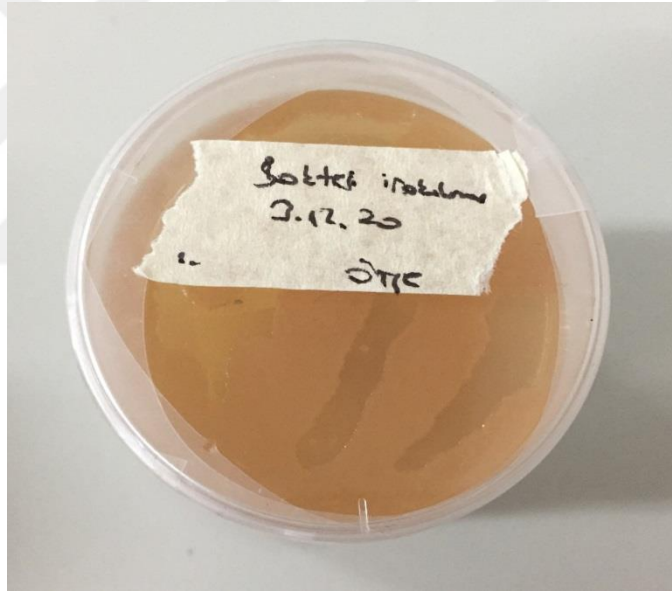


**Şekil 3.37.** Oda sıcaklığında eriyen bakterilerin YS sıvı besin ortamına aktarılması

$25^{\circ}\text{C}$ 'de 180 rpm'e ayarlanmış ısıtmalı orbital çalkalayıcı içerisinde karanlık ortamda 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve simbiyont bakterilerin üremesi gerçekleştirilmiştir. Steril YS sıvı besin ortamında gelişen bakteri kültüründen yaklaşık 5-6 damla ( $100\ \mu\text{l}$ ) alınmış (Şekil 3.38) ve 6 cm çaplı plastik petri kaplarında bulunan nutrient lipid agar (wouts agar) bu simbiyont bakteri ile bir gün boyunca inokule edilmiştir (Şekil 3.39).

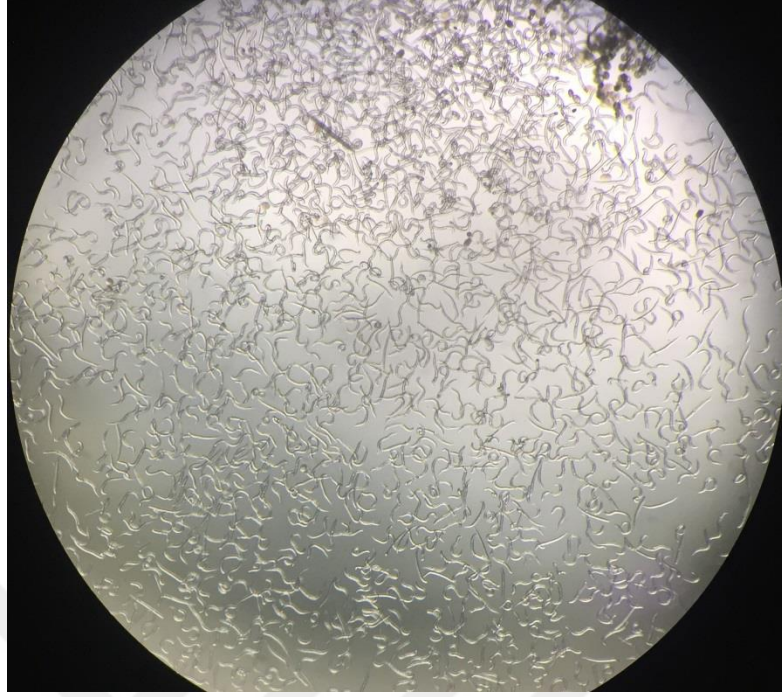


**Şekil 3.38.** Bakteri kültürü damlatılmış nutrient agar



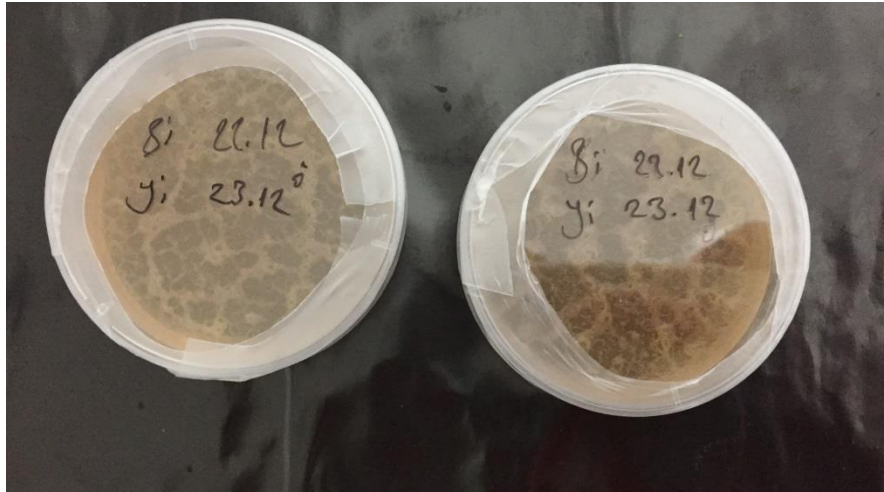
**Şekil 3.39.** Bakteri ile inokule edilen wouts agar

İnokulasyon işleminden sonra hermafrodit bireylerden izole edilen yumurtalar 48 saatlik inkübasyon sürecinden sonra sağlıklı bir şekilde açılmış (Şekil 3.40) ve çıkış yapan birinci dönem juveniller (J1), bakteri ile inokule edilmiş wouts agar ortamına aktarılmıştır.



**Şekil 3.40.** Yumurtalardan sağlıklı çıkış yapan birinci dönem juveniller

Petrliler kapatılarak parafilm ile sarılmış ve 25°C’de karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Agarda bulunan bireyler bakteri ile beslendiğinden, bakteri ile karşılaştığında besin sinyalini almış ve üremeleri sağlanmıştır (Şekil 3.41).



**Şekil 3.41.** Wouts agarda üremiş olan HBH hibrit ırkının görüntüsü

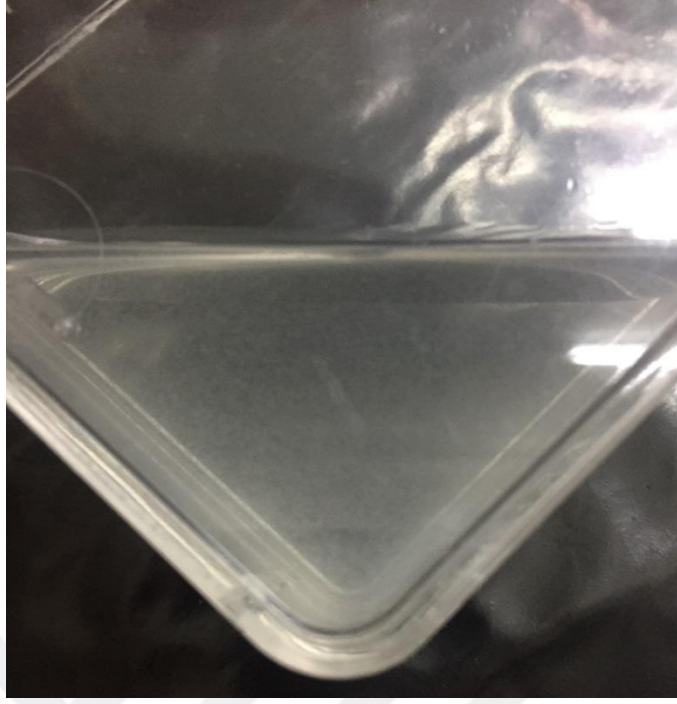
İnkübasyona bırakılan tüm petriler IJ'lerin gelişiminin gözlenmesi amacıyla iki hafta boyunca günlük olarak kontrol edilmiştir. Petrilerin kapağına ve yanlarına çıkan IJ'lerin (Şekil 3.43) alınması için petri açılarak kapağı steril Ringer ile yıkanıp flasklara alınmıştır (Şekil 3.44). Bu işlemler ile EPN'ler *in vitro* katı ortam üzerinde üretilmiştir



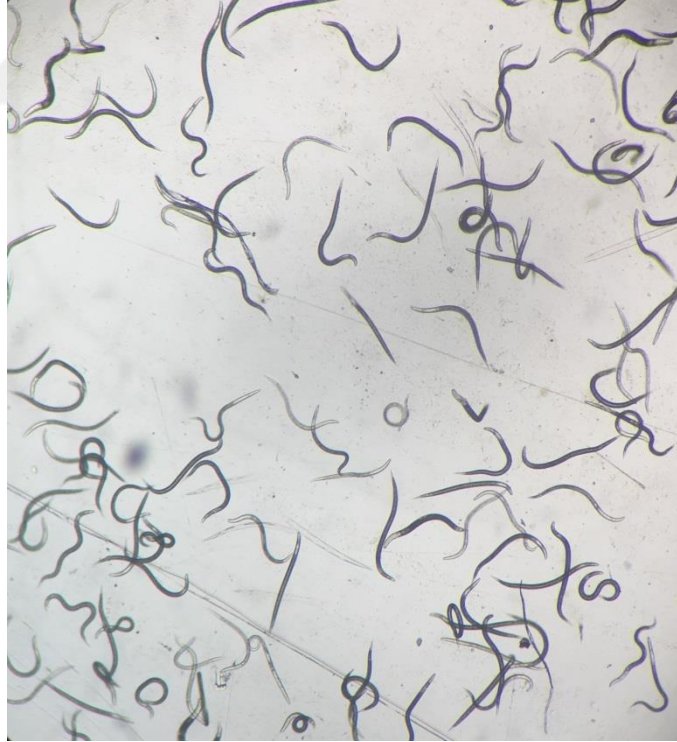
Şekil 3.42. Wouts agar ortamında üremiş olan hermafrodit bireyler



Şekil 3.43. Petri kapağının altına çıkış yapan IJ'ler



**Şekil 3.44.** Flasklara alınan IJ'lerin görüntüsü



**Şekil 3.45.** Flasklara alınan IJ'lerin mikroskop altındaki görüntüsü



Şekil 3.46. *In vivo* ve *in vitro* olarak üretilmiş HBH ırkının dolapta stoklanması



Şekil 3.47. Bakteri ile inokule edilmiş YS, NBTA agar ve wouts agarın bulunduğu çalkalamalı inkübatör

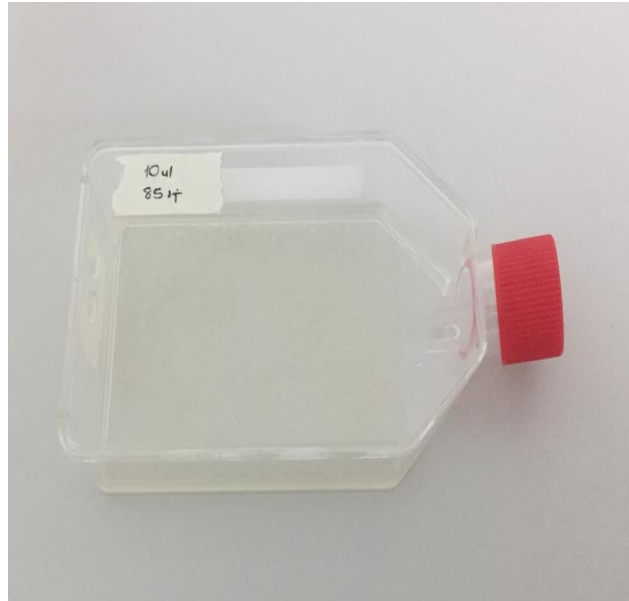
### 3.4. *In vivo* ve *In vitro* Olarak Üretilen HBH Hibrit İrkinin Yüksek Sıcaklığa Toleranslılığının Belirlenmesi

*In vivo* ve *in vitro* olarak iki şekilde üretimi yapılmış olan HBH hibrit ırkının 32, 34, 36, 38, 40 ve 42°C'lerde yüksek sıcaklığa toleranslılık denemeleri yapılmıştır. Denemelerde her biri 2 cm derinliğinde ve 1.5 cm çapında hücreleri bulunan 24 kuyulu hücre kültür kapları kullanılmıştır (Şekil 3.48). Deneme için öncelikle, *in vivo* ve *in vitro* olarak üretilip +4°C'de flask kaplarında stoklanmış olan IJ'ler (Şekil 3.49) çıkartılıp iki saat boyunca oda sıcaklığında adapte olmaları sağlanmıştır. Daha öncesinden flask kaplarında bulunan bu IJ'lerin sayımı yapılp 1000 IJ adet için dozu belirlenmiştir. Doz

belirlenmesi için flask kaplarından 10 µl alınmış ve invert mikroskop altında sayımı yapılmıştır. 10 µl ile yapılan sayım beş tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve ortalaması alınarak flask kabı üzerine not edilmiştir. Bu sayede uygulanacak doz belirlenmiş (ortalama 110-140 µl sıvı içerisinde) ve 24 kuyulu olan hücre kültür kabının bir kuyusuna 1000 adet IJ gelecek şekilde flask kaplarından mikropipet ile çekilerek (Şekil 3.50) kuyucuklara konulmuştur.



**Şekil 3.48.** 24 kuyulu hücre kültür kabı

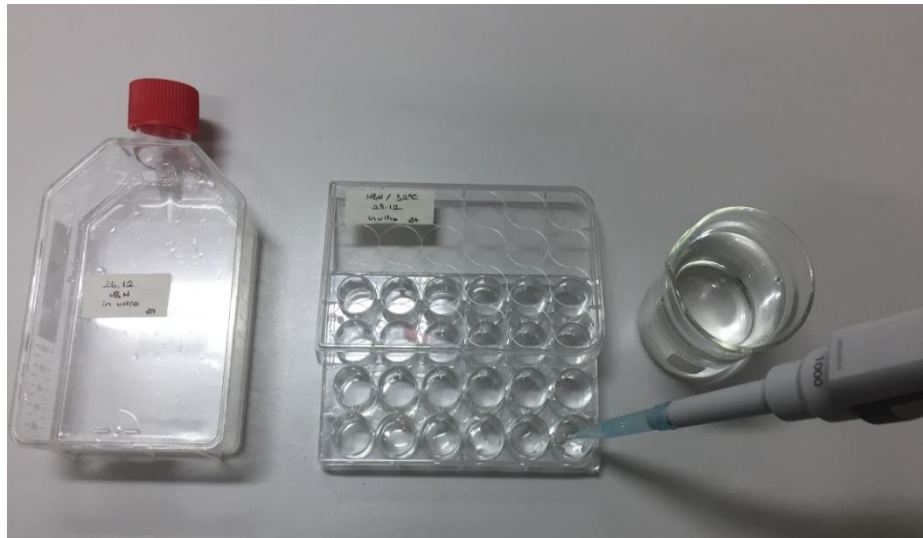


**Şekil 3.49.** Doz belirlenmesi yapılmış flask kabı



**Şekil 3.50.** IJ'lerin flask kabından çekilmesi

Kuyucuklarda bulunan 1000 adet IJ üzerine oda sıcaklığında bulundurulmuş saf sudan 500 µl mikropipet ile çekilerek eklenmiş (Şekil 3.51) ve etrafı parafilm bant ile sarılmıştır. Bu işlemlerin haricinde sıcaklık uygulamasında kullanılacak olan inkübatörde uygulamadan 2 saat önce uygun sıcaklığa ayarlanarak çalıştırılmıştır (Şekil 3.52). İstenilen sıcaklığa ulaşması için iki saat boş bir şekilde çalıştırılan inkübatör içerisine daha sonra hazırlanan hücre kültür kabı yerleştirilmiş ve iki saat boyunca belirlenen sıcaklığa maruz bırakılmıştır.

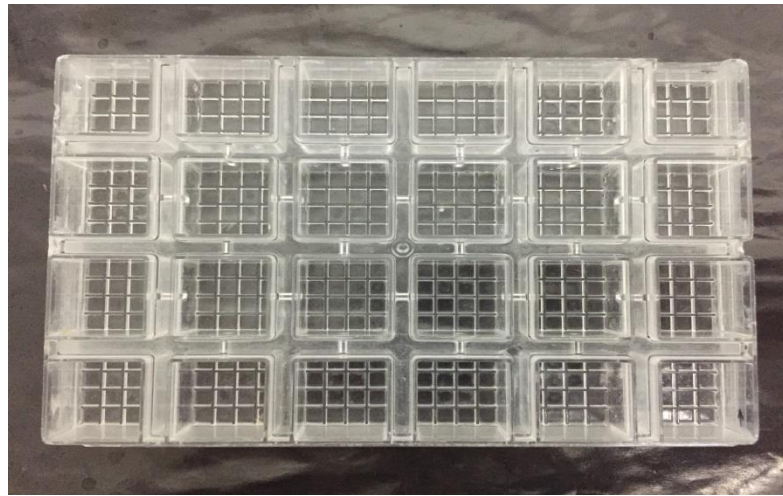


**Şekil 3.51.** IJ'ler üzerine saf suyun eklenmesi

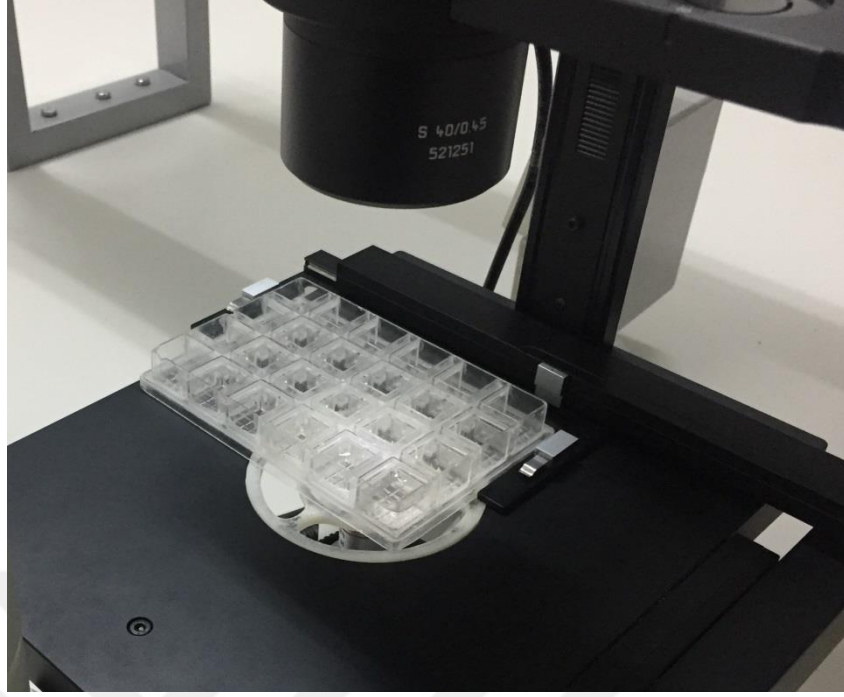
Yüksek sıcaklıklardaki belirlenmiş olan derecelere iki saat boyunca maruz kalan IJ'ler çıkarıldıklarında estivasyona (yazlama) girmiş olurlar. Bu durumdaki IJ'ler herhangi bir hareket belirtisi göstermedikleri için sayım sırasında canlı-ölü ayrımı yapılamamaktadır. Daha doğru bir sayım elde edebilmek için sıcaklık uygulamasından çıkarılan IJ'ler 24 saat boyunca oda sıcaklığında tutularak estivasyondan çıkıp hareket etmeleri sağlanmıştır. Bu sayede sayım kabına (Şekil 3.53) alınan bireylerin canlı ve ölü ayrımı kolaylıkla yapılabilmiş, mikroskop altında sayımları tamamlanmıştır (Şekil 3.54) Elde edilen sonuçlar not edilmiştir.



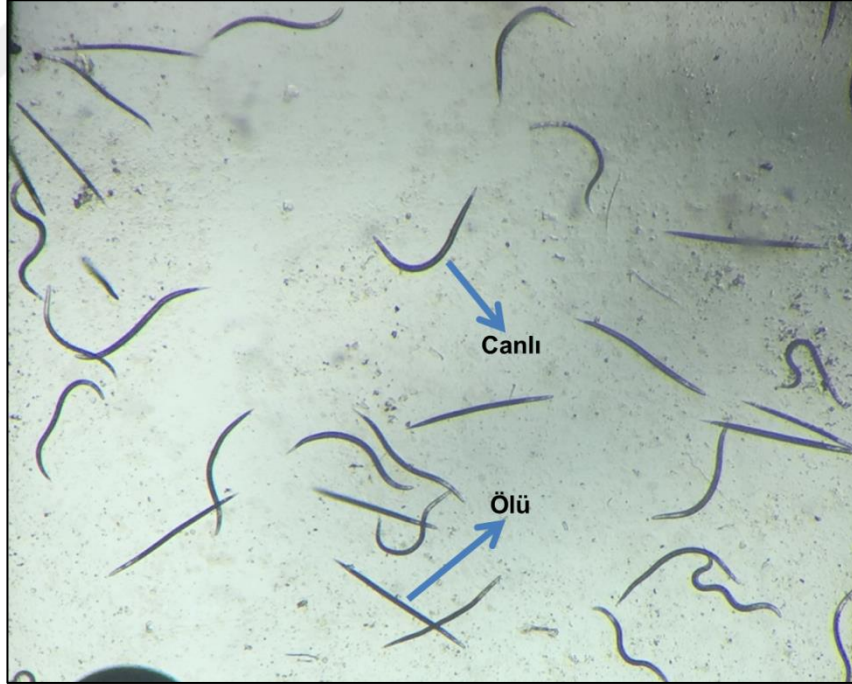
Şekil 3.52. Belirlenmiş olan sıcaklık denemesinde tutulan hücre kültür kabı



Şekil 3.53. IJ'lerin sayıldığı sayım kabı



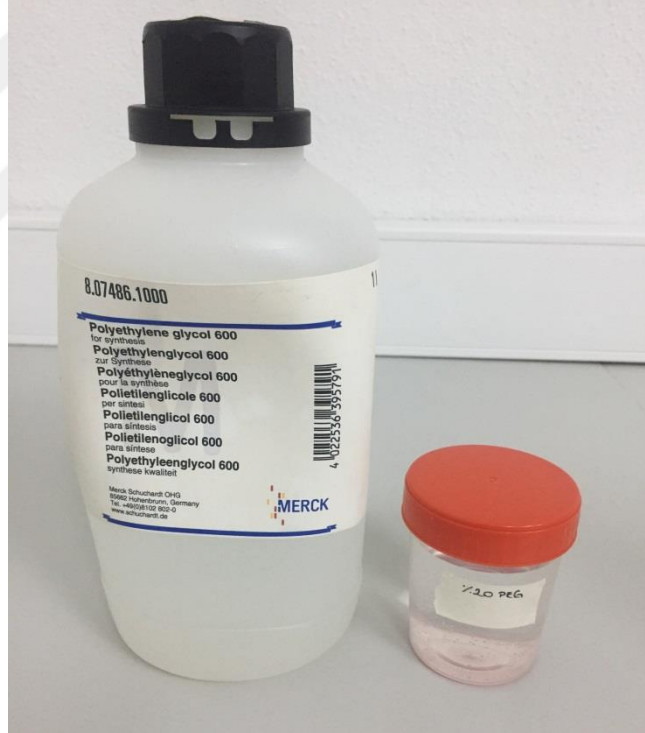
**Şekil 3.54.** IJ'lerin mikroskop altında sayımı



**Şekil 3.55.** Sayma kabında bulunan ölü ve canlı IJ'ler

### 3.5. *In vivo* ve *In vitro* Olarak Üretilen HBH Hibrit Irkının Su Kaybına Toleranslılığının Belirlenmesi

*In vivo* ve *in vitro* olarak iki şekilde üretimi yapılmış olan HBH hibrit irkının su kaybına dayanıklılığı için denemeler yapılmıştır. Bu denemelerde zehirsiz, kokusuz ve canlı hücrelerden su çekme özelliği bulunan Polyethylene Glycol (PEG) kullanılmıştır (Şekil 3.56). Entomopatojen nemaodlar için PEG 600 (g/mol) formu belirlenmiştir (Mukuka ve ark. 2010). Denemeler 24 kuyulu hücre kültür kaplarında, PEG 600'ün %10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80 konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiştir. Denemeler sonucunda %50 ve 60 arasındaki konsantrasyonlarda ölü ve canlı IJ'ler arasındaki farklar fazla olduğundan % 55 ve 57.5 konsantrasyonları da denenmiştir. PEG 600'ün konsantrasyonları hazırlanırken, daha öncesinde oda sıcaklığında bulundurulmuş saf su hassas terazide ölçülerek konsantrasyona ilave edilmiştir (Şekil 3.57).



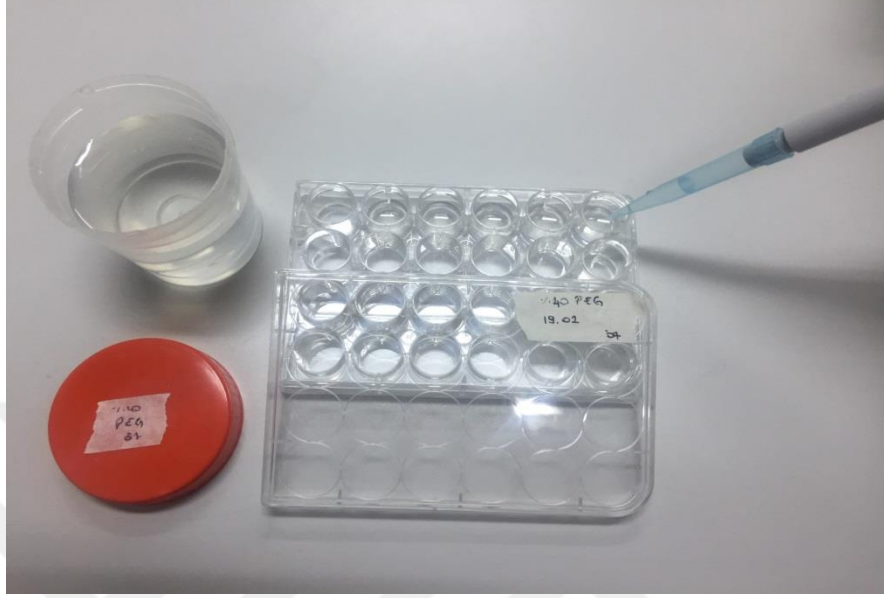
Şekil 3.56. Polyethylene Glycol 600 ve hazırlanmış %20'lik konsantrasyonu



**Şekil 3.57.** PEG 600 konsantrasyonunun hazırlanması

Denemeler için öncelikle, yüksek sıcaklığa tolerans denemesinde olduğu gibi + 4°C’de flask kaplarında stoklanmış IJ’ler buzdolabından çıkartılarak oda sıcaklığında iki saat tutulmuş ve adapte olmaları beklenilmiştir. Adapte olan ve daha öncesinden sayımı yapıp 10 µl’deki miktarı belirlenen flask kaplarından 1000 adet IJ ( yaklaşık 130-140 µl) mikropipet ile çekilerek 24 kuyulu hücre kaplarına eklenmiştir. Kaplarda bulunan IJ’ler üzerine ise daha öncesinde hazırlanmış olan PEG 600’ün konsantrasyonunda 500 µl eklenip (Şekil 3.58) etrafı parafilm ile sarılmıştır. Daha sonra 24 saat boyunca 25°C’ye ayarlı inkübatörde tutulup PEG 600’ün konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. 24 saat sonunda IJ’ler inkübatörden çıkartılmış ve oda sıcaklığında tutulan saf su ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi için öncelikle mikropipet uçları kesilerek filtre kağıtları yapıştırılmıştır (Şekil 3.59). Kuyucuklarda bulunan IJ’ler ile PEG 600 konsantrasyonu, filtre kağıdı yapıştırılan mikropipet çekilmiştir (Şekil 3.60). Filtre kağıtta kalan IJ’ler 18 ml saf su ile 6 cm çaplı petri kaplarına yıkanmıştır. PEG 600 konsantrasyonunun canlı hücrelerden su çekme özelliği olduğu için saf su ile yıkama sonrasında IJ’ler uyuşuk döneme geçmiş ve hareketsiz kalmaktadır. Hareketsiz olan IJ’leri ölü olan bireylerden ayırt etmek güç olduğu için doğru bir sayım yapılamamaktadır. Bunun için IJ’ler yıkandıktan (Şekil 3.61) sonra 24 saat boyunca saf su içerisinde tutulup uyuşuk dönemden çıkmaları sağlanmıştır. Hareketlenmiş bireylerin

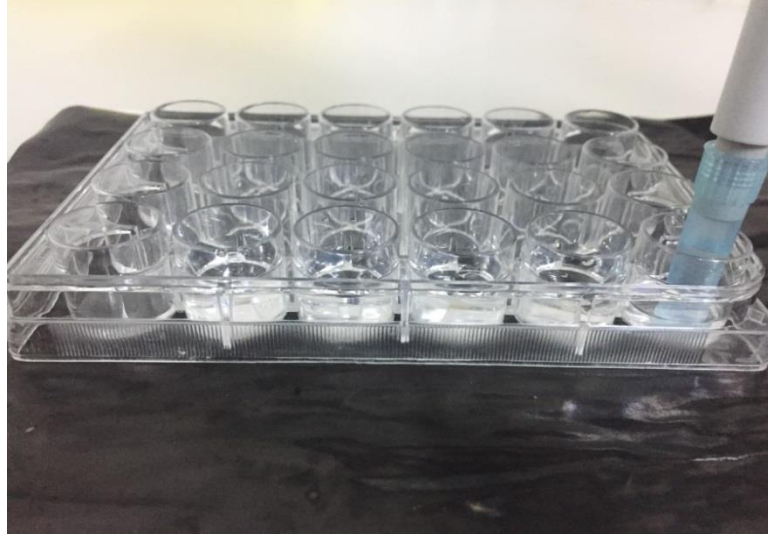
ölü bireylerden ayırımı kolaylıkla yapılmış ve sayma kabında sayımı yapılmış ve not alınmıştır.



**Şekil 3.58.** PEG 600 konsantrasyonun IJ'ler üzerine eklenmesi



**Şekil 3.59.** Filtre kağıdı yapıştırılmış mikropipetler



Şekil 3.60. PEG 600 konsantrasyonunun çekilmesi



Şekil 3.61. U'lerin yıkama işleminin yapılması

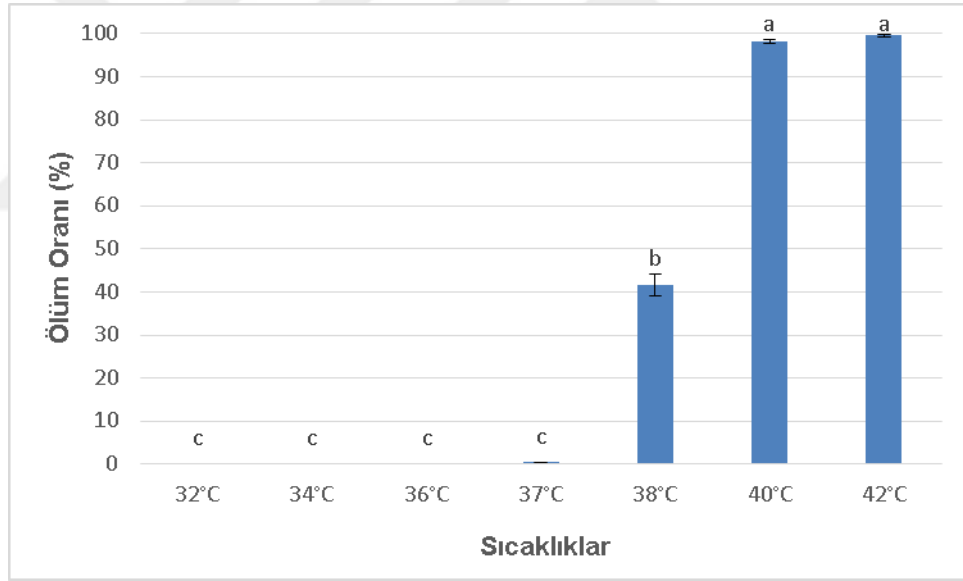
### 3.6. İstatistiksel Analizler

*Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkının *in vivo* ve *in vitro* üretim sonrası sıcaklığa ve su kaybına olan toleransının belirlenmesinde, istatistiksel farklılıkları tespit etmek amacıyla tek yönlü ANOVA (varyans analizi) testi kullanılıp ortalamalar arasındaki farkın belirlenmesinde ise LSD (Least Significant Differences) testi uygulanmıştır. Tüm veri analizleri için JMP 7.0 programı kullanılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. *In Vivo* Üretim Sonucu Oluşan *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkının Sıcaklığa Toleransı

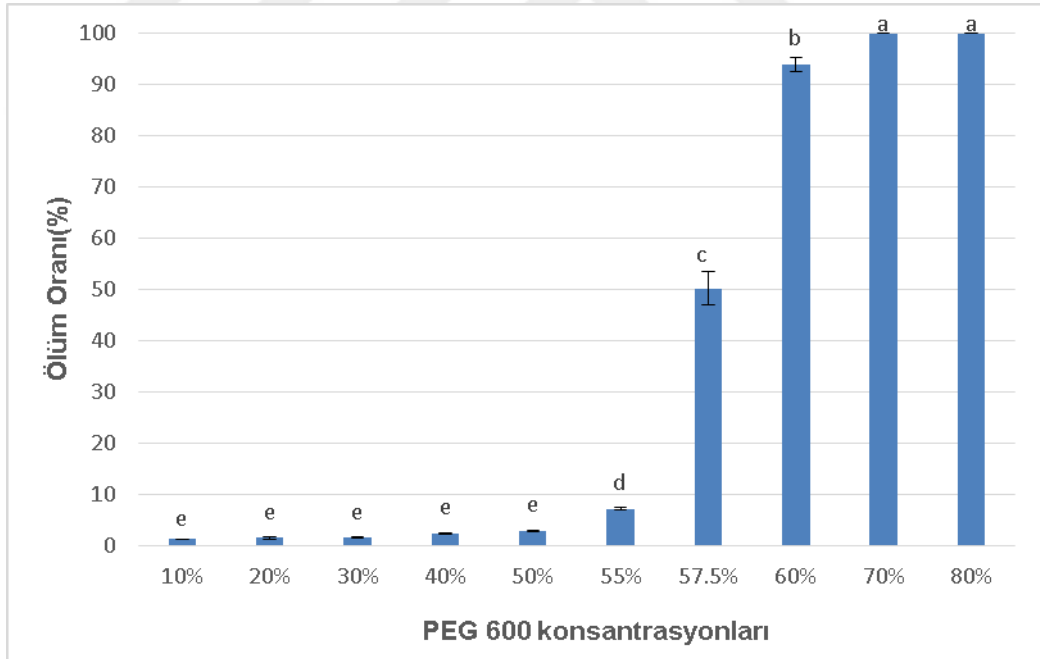
Yapılan sıcaklık denemeleri sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde, *in vivo* üretim metoduyla elde edilen HBH hibrit ırkının ölüm oranı sıcaklıklara bağlı olarak istatistiksel olarak farklılıklar göstermiştir. HBH hibrit ırkının 32, 34, 36 ve 37°C’lerde ölüm oranı %1’in altında olup istatistiksel olarak bir farklılık bulunamamıştır. Denemede belirlenmiş olan 36°C ile 38°C sıcaklıkları arasında ölüm farkının fazla olmasından 37°C sıcaklık uygulamasına da yer verilmiştir. 37°C’den sonra ise ölüm oranı ve ölüm oranı arasındaki farklılıklar artmaya başlamıştır. En yüksek sıcaklık 42°C ise ölüm oranı %99’un üzerinde olup istatistiksel olarak 40°C ile arasında bir farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *In vivo* üretim sonucu oluşan HBH hibrit ırkının farklı sıcaklıklarda ölüm oranı (F = 1762.595; df = 6, 28; P = < 0.0001 )

#### 4.2. *In Vivo* Üretim Sonucu Oluşan *Heterorhabditis bacteriophora* HBH İrkinin Kuraklığa Toleransı

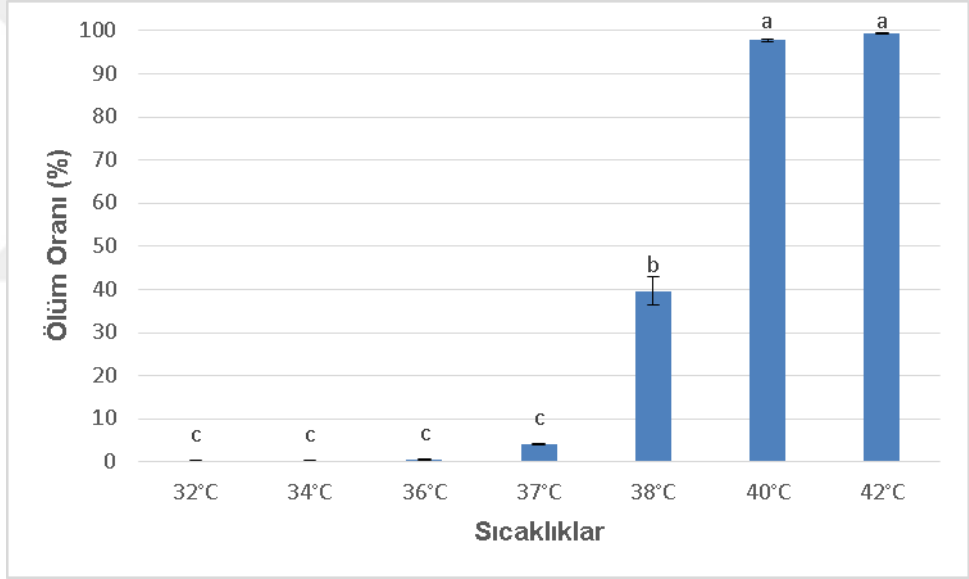
*In vivo* üretim metoduyla elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkının kuraklığa toleransını belirlemek amacıyla farklı konsantrasyonlarında ki PEG 600'e maruz bırakılmıştır. Elde edilen veriler, HBH hibrit ırkının ölüm oranı, su kaybına bağlı olarak istatistiksel farklılıklar göstermiştir. PEG 600'ün %10, 20, 30, 40 ve 50 konsantrasyonlarında HBH ırkının ölüm oranı %1-3 arasında değişkenlik göstermiş ve bu konsantrasyonlar arasında istatistiksel açıdan farklılık bulunamamıştır. Ölüm oranının %50 ile %60 PEG 600 konsantrasyonları arasında çok farklı olması nedeniyle %55 ve %57.5 ara konsantrasyon değerleri de uygulanmıştır. HBH ırkının ölüm oranı %55 PEG 600 konsantrasyonunda %7'ye ulaşırken %57.5 PEG 600 konsantrasyonunda ise %50 ölüm oranına ulaşmıştır. Daha sonraki konsantrasyonda ise ölüm oranı %90 üzerine çıkmış, %70 ve %80 PEG 600 konsantrasyonlarında ölüm oranı %100'e ulaşmıştır (Şekil 4.2.).



**Şekil 4.2.** *In vivo* üretim sonucu oluşan HBH hibrit ırkının farklı PEG 600 konsantrasyonlarında ölüm oranı (F = 1324.935; df = 9, 40; P = < 0.0001)

#### 4.3. *In Vitro* Üretim Sonucu Oluşan *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkının Sıcaklığa Toleransı

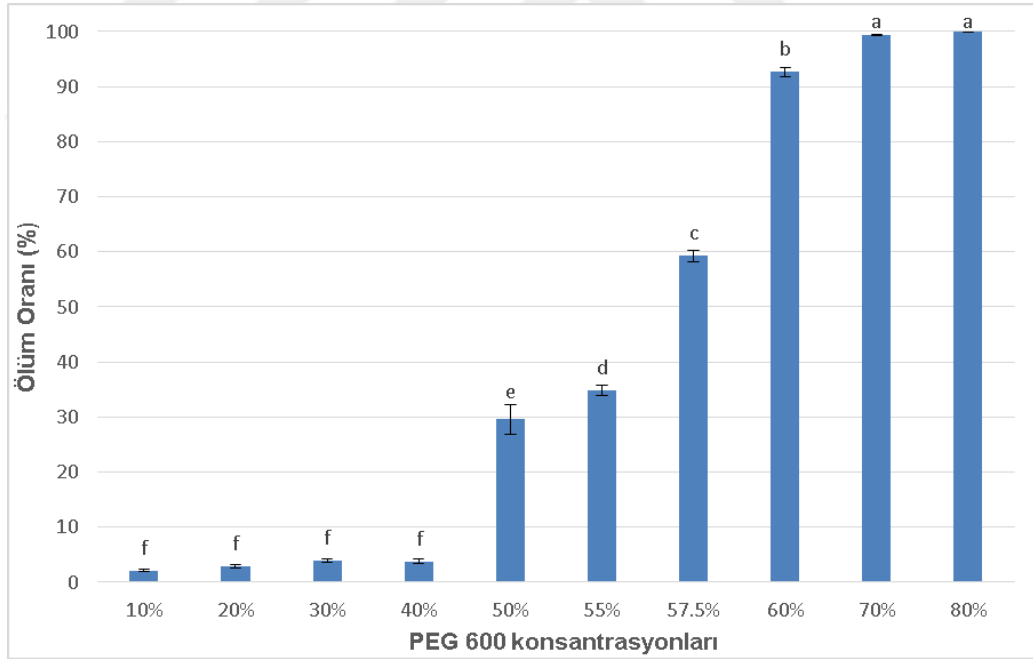
Yapılan sıcaklık denemeleri sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde, *in vitro* üretim metoduyla elde edilen HBH hibrit ırkının ölüm oranı sıcaklıklara bağlı olarak istatistiksel farklılıklar göstermiştir. HBH hibrit ırkının 32, 34 ve 36°C’lerde ölüm oranı %1’in altında olup istatistiksel olarak bir farklılık bulunamamıştır. 36°C’den sonra ise ölüm oranı ve ölüm oranı arasındaki farklılıklar artmaya başlamıştır. Denemede belirlenmiş olan 36°C ile 38°C sıcaklıkları arasında ölüm farkının fazla olmasından 37°C sıcaklık uygulamasına da yer verilmiş ve ölüm oranı %4 üzerinde bulunmuştur. En yüksek sıcaklık 42°C ise ölüm oranı %99’un üzerinde olup istatistiksel olarak 40°C ile arasında bir farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *In vitro* üretim sonucu oluşan HBH hibrit ırkının farklı sıcaklıklarda ölüm oranı ( F = 1029.361; df = 6, 28; P = < 0.0001)

#### 4.4. *In Vitro* Üretim Sonucu Oluşan *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkının Kuraklığa Toleransı

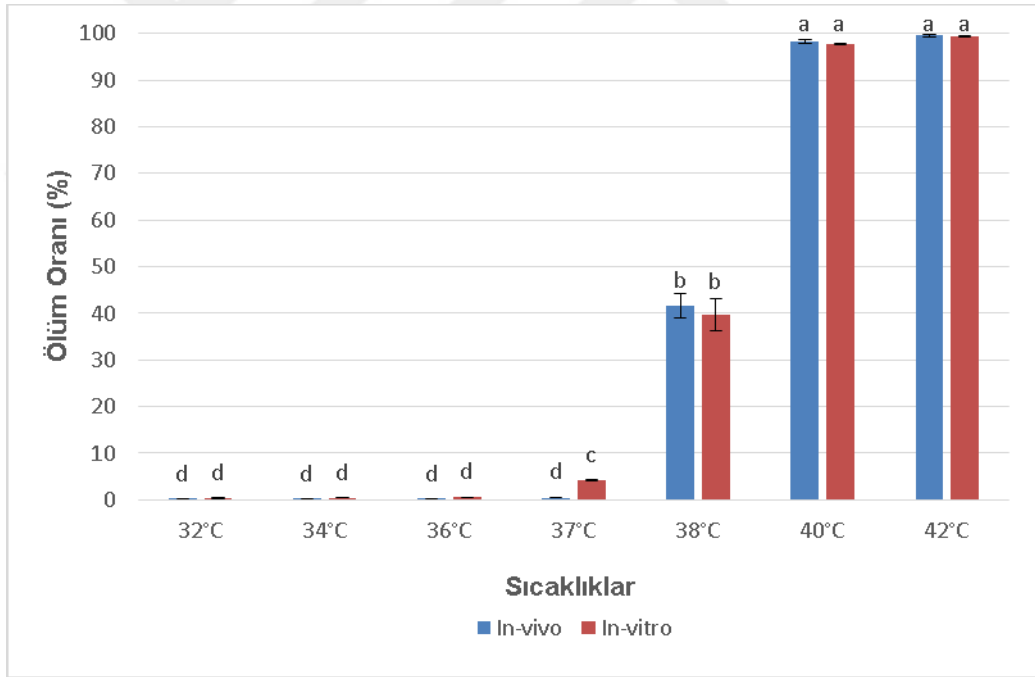
*In vitro* üretim metoduyla elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkının kuraklığa toleransını belirlemek amacıyla farklı konsantrasyonlarında ki PEG 600'e maruz bırakılmıştır. Elde edilen veriler, HBH hibrit ırkının ölüm oranı su kaybına bağlı olarak istatistiksel farklılıklar göstermiştir. PEG 600'ün %10, 20, 30 ve 40 konsantrasyonlarında HBH ırkının ölüm oranı %2-4 arasında değişkenlik göstermiş ve bu konsantrasyonlar arasında istatistiksel açıdan farklılık bulunamamıştır. Ölüm oranının %50 ile %60 PEG 600 konsantrasyonları arasında çok farklı olması nedeniyle %55 ve %57.5 ara konsantrasyon değerleri de uygulanmıştır. HBH ırkının ölüm oranı %50 ve %55 PEG 600 konsantrasyonunda %29' un üzerindeyken %57.5 PEG 600 konsantrasyonunda ise %59 ölüm oranına ulaşmıştır. Daha sonraki konsantrasyonda ise ölüm oranı %90 üzerine çıkmış, %70 ve %80 PEG 600 konsantrasyonlarında ölüm oranı %99'un üzerine ulaşmıştır (Şekil 4.4.).



**Şekil 4.4.** *In vitro* üretim sonucu oluşan HBH hibrit ırkının farklı PEG 600 konsantrasyonlarında ölüm oranı (F = 1380.993; df = 9, 40; P = < 0.0001)

#### 4.5. *In Vivo* ve *In Vitro* Üretim Sonucu Oluşan HBH Hibrit İrkinin Sıcaklıklara Olan Toleransının Karşılaştırılması

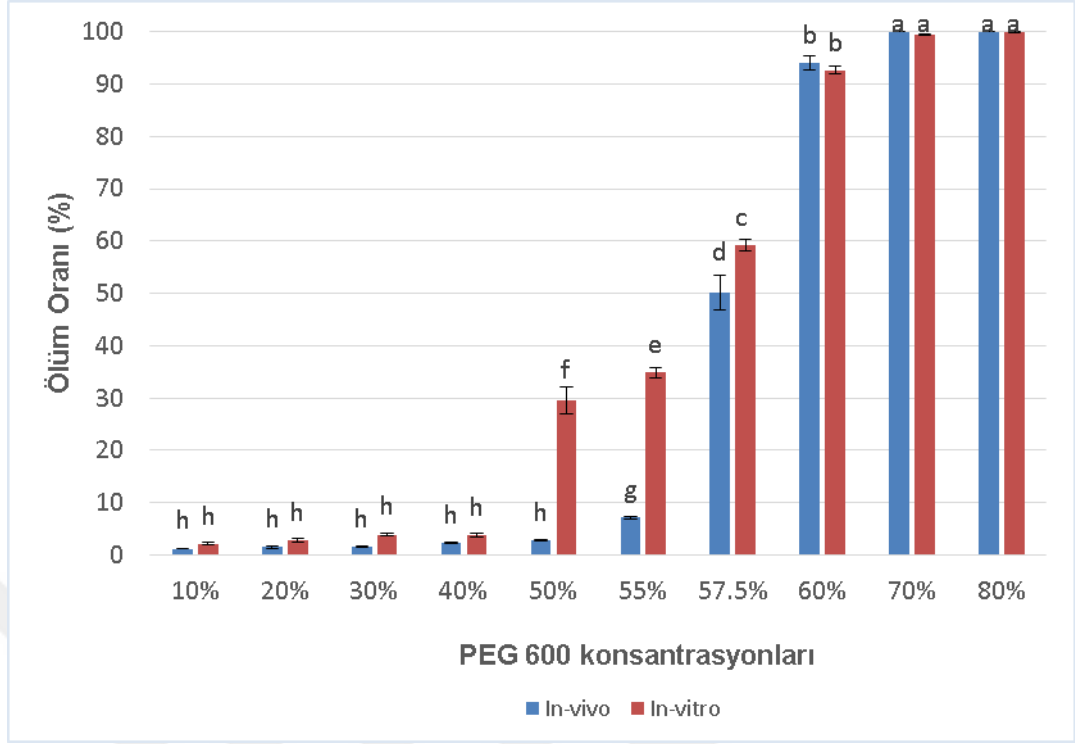
*In vivo* ve *in vitro* üretim sonucu oluşan HBH hibrit ırkında, ölüm oranları sıcaklıklara bağlı olarak farklı olmasına rağmen istatistiksel olarak incelendiğinde sadece 37°C’de üretimler arasında farklılıkların olduğu tespit edilmiştir. Her iki şekilde üretilen İJ’lerin 32, 34, 36°C’de ölüm oranı %2’nin altında kalmış ve bu oran sıcaklıklar ve üretimler arasında istatistiksel bir farklılık oluşturmamıştır. 38°C’de ise İJ’lerin ölüm oranı %39-41 arasında olup istatistiksel bir farklılık bulunamamıştır. Son olarak 40 ve 42°C’de ölüm oranı %95 üzerinde olup hem üretim şekilleri hem de sıcaklıklar arasında istatistiksel bir farklılık gözlemlenmemiştir. İJ’lerin ölüm oranlarındaki artış incelendiğinde, bu oranın *in vivo* üretimde 38°C ile başlayıp sonraki sıcaklıklarda artarak devam ederken, *in vitro* üretimde 37°C ile başlayıp sonraki sıcaklıklarda arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5.).



**Şekil 4.5.** *In vivo* ve *in vitro* üretim sonucu oluşan HBH hibrit ırkının farklı sıcaklıklarda ölüm oranının kıyaslanması (F = 1204. 702; df = 13, 56; P = <0.0001)

#### 4.6. *In Vivo* ve *In Vitro* Üretim Sonucu Oluşan HBH Hibrit Irkının Kuraklığa Toleransının Karşılaştırılması

*In vivo* ve *in vitro* üretim sonucu oluşan HBH hibrit ırkında, kuraklığa bağlı olarak ölüm oranlarında uygulanan PEG 600 konsantrasyonları arasında farklılıklar göstermiş olmasına rağmen istatistiksel olarak bakıldığında sadece %50, 55 ve 57,5 PEG 600 konsantrasyonlarında farklılıklar tespit edilmiştir. Her iki şekilde üretilen IJ'lerin %10, 20, 30, 40 PEG 600 konsantrasyonlarında ölüm oranı %1-4 arasında kalmış ve bu oran sıcaklıklar ve üretimler arasında istatistiksel bir farklılık oluşturmamıştır. PEG 600'ün %50, 55 ve 57,5 konsantrasyonundaki ölüm oranı, *in vivo* üretimde sırasıyla %2, 7, 50 üzerindeyken *in vitro* üretimde ise sırasıyla %29, 34, 59 üzerinde bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar bu üç konsantrasyon ve üretim şekilleri arasında istatistiksel farklılıkların olduğunu göstermiştir. Her iki üretim sonucu oluşan IJ'lerde % 60 PEG 600 konsantrasyonunda ölüm oranı %90 üzerine çıkmış ve üretimler arasında istatistiksel bir farklılık bulunamamıştır. Son olarak %70 ve 80 PEG 600 konsantrasyonlarında ölüm oranı *in vivo* üretim şeklinde %100 ulaşmış, *in vitro* üretim şeklinde ise %99 üzerinde bulunmuş ve hem üretim şekilleri hem de bu iki konsantrasyon arasında istatistiksel bir farklılık göstermemiştir. IJ'lerin ölüm oranlarındaki artış incelendiğinde, bu oranın *in vivo* üretimde %55 PEG 600 konsantrasyonundan başlayıp sonraki konsantrasyonlarda artarak devam ettiğini ve *in vitro* üretimde ise %55 konsantrasyonundan başlayıp sonraki konsantrasyonlarda arttığını tespit edilmiştir (Şekil 4.6.).



**Şekil 4.6.** *In vivo* ve *in vitro* üretim sonucu oluşan HBH hibrit ırkının farklı PEG 600 konsantrasyonlarında ölüm oranının kıyaslanması (  $F = 1287.571$ ;  $df = 19, 80$ ;  $P < 0.0001$ )

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Entomopatojen nematodlar izole edildikleri bölgelerin farklı iklimsel yapılarının olmasından dolayı yüksek sıcaklık ve su kaybı gibi çevresel faktörlerde farklılıklar gösterebilmektedirler (Ehlers 2001, Susurluk ve ark. 2003). Ayrıca, aynı EPN türünün farklı ırkları arasında da çevresel faktörlere farklı sonuçlar veren nematodları da bulunmaktadır (Gaugler ve ark. 1989, Glazer ve ark. 1991). Örneğin; Ankara'dan izole edilen *Heterorhabditis bacteriophora* ırkı soğuk koşullarda dayanıklılık gösterebilirken Antalya'dan izole edilen aynı ırk ise yüksek sıcaklıklara dayanıklılık gösterebilmektedir (Ulu ve Susurluk 2014). Fakat bu çalışmaların aksine son yıllarda yapılan hibridizasyon çalışmalarıyla elde edilen EPN türlerinin çevresel şartlara adaptasyon sağlayan ırkları ortaya çıkmıştır (Hiltpold ve ark. 2010). Bu tez çalışmasında ise sırasıyla Antalya ve Şanlıurfa Bölgelerinden izole edilen HB1138 ve HB4 ebeveynlerinin hibridizasyonu sonucunda oluşan HBH hibrit ırkı kullanılmış olup bu ırkın sıcaklığa ve kuraklığa olan toleranslılıkları belirlemek amaçlanmıştır.

Hibridizasyon çalışmalarıyla elden edilen yeni ırklar ebeveynleri ile karşılaştırıldığında, yüksek sıcaklık ve su kaybı gibi çevresel faktörlere karşı daha dayanıklı olduğu gözlemlenmiştir. Su kaybına toleranslılığın belirlenmesinde farklı iklim koşullarına adapte olmuş *H. bacteriophora* ırkına ait dayanıklılık sonraki döllere aktarılmaktadır (Mukuka ve ark. 2010b,c) Yüksek sıcaklığa dayanıklılıkta kalıtımsal bir özellik olup genlerin döllere aktarılmasıyla sıcaklığa toleranslı bireyler elde edilebilmektedir. (Somasekhar ve ark. 2002, Mukuka ve ark. 2010a,c). EPN'lerin hibridizasyon çalışmaları kapsamında *H. bacteriophora* üzerinde yapılan çalışmaların az olması, bu tez çalışmasını daha önemli hale getirmektedir.

Avrupa'da kullanılan EPN'lerin sera yetiştiriciliğinde uygulanmasında yüksek sıcaklık ve kuraklık büyük sorunlar teşkil etmektedir. Bu faktörler ayrıca EPN'lerin etkinlik ve depolanma ömürlerini de etkilemektedir (Grewal ve ark. 1994, Strauch ve ark. 2000). Ortalama 35-40°C ve üstü sıcaklıklar, EPN'lerin türüne ve bulunduğu bölgeye göre üremelerinde, gelişimlerinde ve hayatta kalmalarında olumsuz etkiler yapmaktadır (Grewal ve ark. 1994). Türkiye'de bazı bölgelerimizde yaz aylarında sıcaklık 45°C ve üstüne çıkabilmekteyken, bu bölgelerde sera yetiştiriciliği yapılan alanlarda ise sıcaklık

50°C ve üstüne çıkabilmektedir. Sıcaklık ve yaz aylarının susuz geçmesi sonucu oluşan kuraklık; topraktaki nemin azalmasına, sıcaklığının ise artmasına neden olmaktadır. EPN'lerin yüksek sıcaklığa ve kuraklığa olan toleranslarının belirlenmesi, arazi uygulamalarında IJ'lerin canlılığını önemli ölçüde etkileyen faktörlerdendir. Daha önceleri Türkiye'nin çeşitli bölgelerden izole edilen *H. bacteriophora* ırkları yüksek sıcaklık ve su kaybı gibi stres faktörlerine maruz bırakılıp toleranslılıkları belirlenmiştir (Susurluk ve ark. 2013). Bu tez çalışmasında ise *in vivo* ve *in vitro* üretim metodlarıyla elde edilen *H. bacteriophora* HBH hibrit ırkının yüksek sıcaklığa ve su kaybına olan toleransları tespit edilip farklılıkları karşılaştırılmıştır.

Morton ve Garcia-del-Pino (2009), yaptıkları denemede *S. feltiae* ve *S. carpocapsae* ırkları 25°C ve 35°C arasında hayatta kalırken *H. bacteriophora* ise 37°C'ye 2 saatlik maruziyette canlılığını yitirmiş ve 40°C'de tüm IJ'ler ölmüştür. Sonuçlar incelendiğinde, bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ile benzerlikler ve farklılıklar olduğu gözlemlenmiştir. Bu tez çalışmasında, yapılan çalışmadan farklı olarak *in vivo* üretim metodlarıyla elde edilen HBH ırkı bireylerin 37°C'deki ölüm oranı %1'in altında, *in vitro* üretim metoduyla elde edilen bireylerin ölüm oranı %5 altında bulunmaktadır. Yapılan çalışmaya benzer olarak her iki üretim metoduyla elde edilen HBH hibrit ırkının 40°C' de ölüm oranı yaklaşık %99 oranlarına çıkmıştır. Kuraklık ile ilgili yaptıkları çalışmalarda ise *H. bacteriophora*'nın %97 bağıl nem (~ %45 PEG 600) şartlarında hayatta kalma oranlarının %44-70 arasında farklılıklar gösterdiğini bulmuşlardır. *Steinernema* türlerinde ise elde edilen sonuçlar %80'nin üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Irklardaki ölüm oranlarının, bağıl nem oranlarının %93 ile %88 seviyelerine düşürülmesiyle arttığı gözlemlenmiş ve nem oranı %85'e düştüğünde ölümler %100 oranlarına ulaşmıştır. Bu tez çalışmasında ise benzer şekilde PEG 600 konsantrasyonunun arttırılmasıyla ölümlerde artış gözlemlenmiş ve son olarak %70 ve %80 PEG 600 konsantrasyonlarda %100 ölüm meydana gelmiştir.

Grewal ve ark. (2002), ise yaptığı çalışmada *Heterorhabditis bacteriophora*'nın 15 doğal popülasyonun IJ'lerini 2 saat 40°C'ye maruz bırakmış, hayatta kalma oranları %16 ile %92 arasında bulunmuştur. Bu tez çalışmasında ise, *in vivo* ve *in vitro* üretim

metodlarıyla elde edilen HBH ırkı 2 saat 40°C'ye maruz bırakılmış ve ölüm oranı yaklaşık %99 bulunmuştur.

Ulu (2012) tarafından yapılan çalışmada, Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden izole edilen EPN türlerinin sıcaklık ve su kaybına olan dayanıklılıklarını test etmiştir. 36°C'deki sıcaklıkta *H. bacteriophora* 876 ırkının ölüm oranı yaklaşık %15 olurken, bu tez çalışmasında *in vivo* ve *in vitro* üretim sonucu oluşan *H. bacteriophora* HBH ırkının 36°C sıcaklıktaki ölüm oranları %2'nin altında olmuştur. 38°C'de yapılan çalışmada ise 876 ve HB11 ırklarının ölüm oranı bu tez çalışmasına benzer olarak ölüm oranı yaklaşık %40 tespit edilmiştir. Fakat bu tez çalışmasından farklı olarak yapılan çalışmada EPN ırklarının maruz bırakıldığı sıcaklık derecesi arttırıldığında, sıcaklığa toleransı yüksek olan bireylerin olduğu tespit edilmiştir. Örneğin; 40°C'de 17, HB6, HSU ve HIZ ırklarının ölüm oranları yaklaşık %20 oranlarında olurken, bu tez çalışmasında *in vivo* ve *in vitro* üretim sonucu elde edilen HBH ırkının 40°C sıcaklıktaki ölüm oranları yaklaşık %100 olmuştur. Su kaybına toleranslarını tespit etmek amacıyla yapılan çalışmada ise Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilen 10 farklı *H. bacteriophora* izolatını PEG 600'ün farklı konsantrasyonlarına (%10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80) 24 saat boyunca maruz bırakılmış ve toleranslılıkları belirlenmiştir. Yapılan çalışmada PEG 600'ün %30 ve %40 konsantrasyonlarında HAN ırkının ölüm oranı yaklaşık olarak %30 oranında bulunmuşken, yapılan çalışmadan farklı olarak bu tez çalışmasında *in vivo* ve *in vitro* üretim sonucu oluşan *H. bacteriophora* HBH ırkının ölüm oranı %4'ün altında bulunmuştur. PEG 600'ün %50 konsantrasyonunda ise 17, HB6 ve HAN ırklarında ölüm oranı %75 üzerinde bulunmuşken diğer ırklarda ölüm oranı %100'e ulaştığı tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında ise, *in vivo* ve *in vitro* üretim sonucu oluşan *H. bacteriophora* HBH ırkının ölüm oranı sırasıyla yaklaşık olarak %3 ve %30 oranlarında bulunmuştur. PEG 600'ün %60 konsantrasyonunda tüm ırklarda ölüm oranı %100 bulunmuşken, bu tez çalışmasında *in vivo* ve *in vitro* üretim sonucu oluşan *H. bacteriophora* HBH ırkının ölüm oranı yaklaşık olarak %95 oranında bulunmuştur. Yapılan çalışmada EPN ırklarının maruz bırakıldığı PEG 600 konsantrasyon oranı arttırıldığında, su kaybına toleransı daha düşük olan bireylerin olduğu tespit edilmiştir. Örneğin; PEG 600 %50 ve sonrasındaki konsantrasyonlarında %100 ölüm meydana

gelmişken bu tez çalışmasında ise PEG 600 %70 ve %80 konsantrasyonlarında %100 ölüm meydana gelmiştir.

Liu ve Glazer (2000), izole ettikleri *H. bacteriophora* HP88 ırkını %97 (~ % 45 PEG 600) ve %93 (~ % 50 PEG 600) bağıl neme sırasıyla 24, 48, 72 ve 96 saat maruz bırakılmış ve hayatta kalma oranları %68-79 arasında bulunmuş olmasına rağmen maruz bırakılan sürelerde istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunamamıştır. Maruz bırakıldıkları bağıl nem oranları %88 (~ % 60 PEG 600) ile %85 (~ 65 PEG 600) olan IJ'lerin canlılıkları %10'dan daha az olmuş ve bazılarında ölüm oranı %100'e ulaşmıştır. Bu tez çalışmasında *in vivo* ve *in vitro* üretim metotlarıyla elde edilen HBH ırkının %50 PEG 600 konsantrasyonunda ölüm oranları sırasıyla yaklaşık olarak %3 ve %30 oranında bulunmuş ve %60 PEG 600 konsantrasyonunda her iki üretim şeklinde de ölüm oranları %90'nın üzerine çıkmıştır. Elde edilen bu sonuçlar, IJ'lerden kaybedilen suyun kurak bir ortam sağlayıp bireylerin canlılıklarını olumsuz yönde etkilediğini göstermiştir.

Nimkingrat ve ark. (2013), *Steinernema* cinsi nematodların su kaybına toleransını belirlemek için PEG 600 konsantrasyonu ile uygulama yaparak değerlendirmişlerdir. İlk olarak IJ'ler 25°C'de 48 saat 0.95'lik  $a_w$  değerine daha sonra ise 10 farklı PEG 600 konsantrasyonlarına (0.982, 0.949, 0.933, 0.909, 0.883, 0.851, 0.814, 0.79, 0.761 ve 0.725) aktarılmıştır. Stres koşullarına en toleranslı tür *S. carpocapsae* olup ardından *S. abbasi* olmuştur. En az toleranslı türler ise; *S. kraussei*, *S. glaseri* ve *S. ethiopiense* olmuştur. Bu tez çalışmasında ise *in vivo* ve *in vitro* üretim metodlarıyla elde edilen *H. bacteriophora* HBH ırkı %10, 20, 30, 40 ve 50 PEG 600 konsantrasyonlarına tolerans gösterirken %60 PEG konsantrasyonunda tolerans seviyeleri azalmaya başlayıp %70 ve %80 PEG 600 konsantrasyonlarında sonlanmıştır.

Bu tez çalışmasında, yapılmış olan çalışmalardan farklı olarak *Heterorhabditis bacteriophora* HBH hibrit ırkının *in vivo* olarak üretilmesinin dışında *in vitro* üretim şekline de yer verilmiş ve her iki şekilde üretilen EPN'lerin yüksek sıcaklığa ve kuraklığa olan toleransları arasındaki farklılıklar belirlenmiştir. EPN'lerin sıcaklığa ve kuraklığa olan toleranslarını, üretim metodlarının da etkileyebileceği ve aynı zamanda

sıcaklığın ve kuraklığın EPN'lerin canlılıkları üzerine etkisi tespit edilmiştir. İki farklı üretim metoduyla elde edilen aynı ırka ait IJ'lerin sıcaklığa ve su kaybına olan toleranslarının da farklılık gösterebileceği kanıtlanmıştır. Bunların haricinde; kullanılan ırk, zaman ve konsantrasyon miktarının denemeler üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Ayrıca *in vitro* da üretilen IJ'lerin sıcaklığa ve kuraklığa dayanmada *in vivo*'ya göre daha iyi olması, EPN'lerin *in vitro* olarak üretilmesi sonucu herhangi bir özellik kaybının olmayacağı aksine daha iyi sonuçlar vereceği dikkate alınmalıdır. Arazi uygulamalarında en çok etkili olan sıcaklık ve kuraklığa karşı üretim yöntemlerini geliştirerek uygulamaları daha ekonomik ve daha etkili hale getirebilir. Böylelikle biyolojik mücadele içerisinde yer alan EPN kullanımının daha yaygın olması sağlanabilir.

## KAYNAKLAR

- Adams, B.J., Fodor, A., Koppenhöfer, H.S., Stackebrandt, E., Stock, S.P., Klein, M.G. 2006.** Reprint of Biodiversity and systematics of nematode–bacterium entomopathogens. *Biological control*, 37: 32–49.
- Adams, B.J., Nguyen, K.B. 2002.** Taxonomy and systematics. *Entomopathogenic nematology*, Ed.: Gaugler, R., CABI Publishing, Wallingford, UK, pp: 1-33.
- Akhurst, R.J., Boemare, N.E. 1990.** Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In *Entomopathogenic nematodes in biological control* (pp. 75-90). CRC press.
- Ali, S.S., Pervez, R., Hussain, M.A., Ahmad, R. 2007.** Effect of temperature on survival of *Steinernema seemae*, *S. masoodi* and *S. carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) and their subsequent infectivity to prepupa of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 40(3): 183-187.
- Anbessa, S., Sumaya, N.H., Dörfler, A. V., Strauch, O., & Ehlers, R.U. 2013.** Selective breeding for desiccation tolerance in liquid culture provides genetically stable inbred lines of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(2), 731-739.
- Armağan, B., Ulu, T.C., İkizer, T. 2010.** Bursa İli Nilüfer İlçesi Görükle Mevkii Topraklarında Entomopatojen Nematod Sürveyi. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 24(1): 91-98
- Boemare, N., Laumond, C., Mauleon, H. 1996.** The entomopathogenic nematode bacterium complex: Biology, life cycle and vertebrate safety. *Biocontrol Science and Technology*, 6(3), 333-346.
- Brown, I.M., Gaugler, R. 1997.** Temperature and humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematodes. *Nematologica*, 43(5): 363-376.
- Delen, N., Tiryaki, O., Türkseven, S., Temur, C. 2015.** Türkiye’de pestisit kullanımı, kalıntı ve dayanıklılık sorunları, çözüm önerileri. *Türkiye Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı*, 2, 12-16.
- Duchaud, E., Rusniok, C., Frangeul, L., Buchrieser, C., Givaudan, A., Taourit, S., Bocs, S., Boursaux-Eude, C., Chandler, M., Charles, J.F. Kunst, F. 2003.** The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nature biotechnology*, 21(11): 1307-1313.
- Ehlers, R.U. 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.
- Ehlers, R.U. 2001.** Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(5): 623-633.

**Endo, B.Y., Nickle, W.R. 1994.** Ultrastructure of the buccal cavity region and oesophagus of the insect parasitic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*. *Nematologica (Leiden)*, 40(3): 379-398.

**Forst, S., Dowds, B., Boemare, N., Stackebrandt, E. 1997.** *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annual review of microbiology*, 51(1): 47-72.

**Gaugler, R. 2002.** Preface: Entomopathogenic nematology, Ed.: Gaugler, R., Kaya, H.K., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 195-214.

**Gaugler, R., Campbell, J.F., McGuire, T.R. 1989.** Selection for host-finding in *Steinernema feltiae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 54(3): 363-372.

**Gaugler, R. Kaya, H.K., 1990.** Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press. Inc. Boca Raton. FL.

**Gaugler, R., Lewis, E., Stuart, R.J. 1997.** Ecology in the service of biological control: the case of entomopathogenic nematodes. *Oecologia*, 109(4): 483-489.

**Glaser, R. W., Fox, H. 1930.** A Nematode Parasite of the Japanese Beetle (*Popillia japonica*, Newm.). *Science (Washington)*, 71: 16-17.

**Glazer, I. 2002.** Survival biology. *Entomopathogenic Nematology* (Gaugler, R. ed). CABI Publishing, Wallingford UK. 167-187 pp.

**Glazer, I., Gaugler, R., Segal, D. 1991.** Genetics of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* strain HP88: The diversity of beneficial traits. *Journal of Nematology*, 23(3): 324-333.

**Grewal, P.S., Selvan, S., Gaugler, R. 1994.** Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: Niche breadth for infection, establishment, and reproduction. *Journal of Thermal Biology*, 19: 245-53.

**Grewal, P.S., Wang, X., Taylor, R.A.J. 2002.** Dauer juvenile longevity and stress tolerance in natural populations of entomopathogenic nematodes: is there a relationship?. *International journal for parasitology*, 32(6): 717-725.

**Gulzar, S., Usman, M., Wakil, W., Gulcu, B., Hazir, C., Karagoz, M., Hazir, S., Shapiro-Ilan, D.I. 2020.** Environmental tolerance of entomopathogenic nematodes differs among nematodes arising from host cadavers versus aqueous suspension. *Journal of Invertebrate Pathology*, 175: 107452.

**Hazir, S., Kaya, H.K., Stock, S.P., Keskin, N. 2003.** Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. *Turkish journal of Biology*, 27(4): 181-202.

**Hazir, S., Keskin, N., Stock, S.P., Kaya, H.K., Özcan, S. 2003.** Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Turkey. *Biodiversity & Conservation*, 12(2): 375-386.

**Hiltbold, I., Baroni, M., Toepfer, S., Kuhlmann, U., Turlings, T.C. 2010.** Selection of entomopathogenic nematodes for enhanced responsiveness to a volatile root signal helps to control a major root pest. *Journal of Experimental Biology*, 213(14): 2417-2423.

**Jagdale, G.B., Gordon, R. 1998.** Effect of propagation temperatures on temperature tolerances of entomopathogenic nematodes. *Fundamental and applied nematology*, 21(2): 177-184.

**Johnigk, S.A., Ehlers, R.U. 1999.** Juvenile development and life cycle of *Heterorhabditis bacteriophora* and *H. indica* (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematology*, 1(3): 251-260.

**Kaya, H.K. 2002.** Natural enemies and other antagonists. *Entomopathogenic nematology*, CABI Publishing, Wallingford, UK. 189-204. Pp.

**Kaya, H.K., Gaugler, R. 1993.** Entomopathogenic nematodes. *Annual review of entomology*, 38(1): 181-206.

**Kaya, H.K., Stock, S.P. 1997.** Techniques in insect nematology: Manual of techniques in insect pathology, Ed.: Lacey, L.A., CA: Academic Press, San Diego, pp: 281-324.

**Kaypak, Ş. 2011.** Küreselleşme sürecinde sürdürülebilir bir kalkınma için sürdürülebilir bir çevre. *Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Sosyal Ve Ekonomik Araştırmalar Dergisi*, 13 (20): 19-33.

**Kepenekci, I. 2002.** Entomopathogenic nematodes (Rhabditida) in the Mediterranean region of Turkey. *Nematologia Mediterranea*, 21: 13-16.

**Kepenekci, I., Susurluk, I.A. 2003.** Three entomopathogenic nematodes (Rhabditida) from Turkey. *Pakistan Journal of Nematology*, 21: 19-23.

**Klein, M.G. 1990.** Efficacy against soil-inhabiting insect pests. *Entomopathogenic nematodes in biological control*, Ed.: Gaugler, R., Kaya H.K., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 195-214.

**Koppenhöfer, A.M. 2000.** Nematodes. *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, Ed.: Lacey, L.A., Kaya, H.K., Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp: 283-301.

**Koppenhöfer, A.M. 2007.** Nematodes. *Field Manual of techniques in Invertebrate pathology*, Ed.: Lacey, L.A., Kaya, H.K., Springer, Germany, pp: 249-264.

**Kung, S.P., Gaugler, R., Kaya, H.K. 1991.** Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 57(2): 242-249.

**Lewis, W.J., Van Lenteren, J.C., Phatak, S.C., & Tumlinson, J.H. 1997.** A total system approach to sustainable pest management. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(23): 12243-12248.

**Liu, Q.Z., Glazer, I. 2000.** Desiccation survival of entomopathogenic nematodes of the genus *Heterorhabditis*. *Phytoparasitica*, 28(4): 331-340.

**Ma, J., Chen, S., Moens, M., De Clercq, P., Li, X., Han, R. 2013.** Characterization in biological traits of entomopathogenic nematodes isolated from North China. *Journal of invertebrate pathology*, 114(3): 268-276.

**Mason, J.M., Wright, D.J. 1997.** Potential for the Control of *Plutella xylostella* Larvae with Entomopathogenic Nematodes. *Journal of invertebrate pathology*, 70(3): 234-242.

**Morton, A., García-del-Pino, F. 2009.** Ecological characterization of entomopathogenic nematodes isolated in stone fruit orchard soils of Mediterranean areas. *Journal of invertebrate pathology*, 102(3): 203-213.

**Mukuka, J., Strauch, O., Waeyenberge, L., Viaene, N., Moens, M., & Ehlers, R. U. 2010a.** Heat tolerance among different strains of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *BioControl*, 55(3): 423-434.

**Mukuka, J., Strauch, O., & Ehlers, R.U. 2010b.** Variability in desiccation tolerance among different strains of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Nematology*, 12(5): 711-720.

**Mukuka, J., Strauch, O., Hoppe, C., Ehlers, R.U. 2010c.** Improvement of heat and desiccation tolerance in *Heterorhabditis bacteriophora* through cross-breeding of tolerant strains and successive genetic selection. *BioControl*, 55(4): 511-521.

**Nimkingrat, P., Uhlmann, F., Strauch, O., Ehlers, R.U. 2013.** Desiccation tolerance of dauer entomopathogenic nematodes of the genus *Steinernema*. *Nematology*, 15(4): 451-458.

**Patel, M.N., Perry, R.N., Wright, D. J. 1997.** Desiccation survival and water contents of entomopathogenic nematodes, *Steinernema* spp.(Rhabditida: Steinernematidae). *International Journal for Parasitology*, 27(1): 61-70.

**Patil, J., Gowda, M.T., Vijayakumar, R., Verghese, A. 2018.** Fluctuating temperature: A cause for survival and development of entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis indica* and *Steinernema carpocapsae*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 327-333.

**Poinar, G.O. J.R. 1975.** Description and biology of a new insect parasitic Rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* N. Gen., N. Sp. *Nematologica*, 21(4): 463-470.

**Poinar, G.O. 1979.** *Nematodes for biological control of insects*. Boca Raton, FL. USA: CC. Press, 143.

**Ramakuwela, T., Hatting, J., Laing, M.D., Hazir, S., Thiebaut, N. 2015.** Effect of storage temperature and duration on survival and infectivity of *Steinernema innovationi* (Rhabditida: Steinernematidae). *Journal of Nematology*, 47(4): 332-336.

**Salame, L., Glazer, I., Miqaiia, N., Chkhubianishvili, T. 2010.** Characterization of populations of entomopathogenic nematodes isolated at diverse sites across Israel. *Phytoparasitica*, 38(1): 39-52.

**Sarwar, M. 2015.** The killer chemicals as controller of agriculture insect pests: The conventional insecticides. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science*, 1(3): 141-147.

**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.

**Shapiro, D.I., Glazer, I., Segal, D. 1997.** Genetic Improvement of Heat Tolerance in *Heterorhabditis bacteriophora* through Hybridization. *Biological Control*, 8(2): 153-159.

**Shapiro-Ilan, D.I., Mbata, G.N., Nguyen, K.B., Peat, S.M., Blackburn, D., Adams, B.J. 2009.** Characterization of biocontrol traits in the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis georgiana* (Kesha strain), and phylogenetic analysis of the nematode's symbiotic bacteria. *Biological Control*, 51(3): 377-387.

**Shapiro-Ilan, D.I., Stuart, R.J., McCoy, C.W. 2005.** Characterization of biological control traits in the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis mexicana* (MX4 strain). *Biological Control*, 32(1): 97-103.

**Solomon, A., Glazer, I. 1999.** Desiccation survival of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*: induction of anhydrobiosis. *Nematology*, 1(1): 61-68.

**Somasekhar, N., Grewal, P.S., Klein, M.G. 2002.** Genetic variability in stress tolerance and fitness among natural populations of *Steinernema carpocapsae*. *Biological Control*, 23(3): 303-310.

**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.

**Susurluk, I.A. 2008.** Potential of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae*, *S. weiseri* and *Heterorhabditis bacteriophora* for the biological control of the sugar beet

weevil *Bothynoderes punctiventris* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of pest science*, 81(4): 221-225.

**Susurluk, I.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.

**Susurluk, I.A., Ehlers, R.U. 2008.** Field persistence of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* in different crops. *BioControl*, 53(4): 627-641.

**Susurluk, I.A., Ökten, M.E. 2000.** Bazı entomopatojen nematodların *Blattella germanica* L. (Dictyoptera: Blattellidae) üzerindeki etkileri. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 6(4): 111-114.

**Susurluk, I.A., Ulu, T.C., Kongu, Y. 2013.** Tolerances of hybridized entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strains to heat and desiccation. *Turkish Journal of Entomology*, 37(2): 221-228.

**Susurluk, I.A., Ünlü, 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.

**Tarasco, E., Triggiani, O. 2010.** Desiccation tolerance of algerian strains of entomopathogenic nematodes. *Redia-giornale Di Zoologia*, 93: 75-77.

**Tiryaki, O., Canhilal, R., & Horuz, S. 2010.** Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 26(2): 154-169.

**Turhan, Ş. 2005.** Tarımda sürdürülebilirlik ve organik tarım. *Tarım Ekonomisi Dergisi*, 11(1 ): 13-24.

**Ulu, T.C., 2012.** Türkiye’de tespit edilen entomopatojen nematod *Heterorhabditis bacteriophora* izolatlarının yüksek sıcaklığa ve su kaybına olan toleranslılıkları ve etkinliklerinin karşılaştırılması. Yüksek lisans tezi, UÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Bursa.

**Ulu, T.C., Susurluk, I.A. 2014.** Heat and desiccation tolerances of *Heterorhabditis bacteriophora* strains and relationships between their tolerances and some bioecological characteristics. *Invertebrate Survival Journal*, 11(1): 4-10.

**Uygun, N., Elekcioğlu, İ.H., Ulusoy, M.R., Kazak, C., Aysan, Y., Uygur, S., Karut, K., Satar, S., Gözel, U., Karacaoğlu, M. 2015.** Biyolojik Mücadelede Son Gelişmeler. Türkiye Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi, 12-16 Ocak 2015, Ankara.

**Van Den Bosch, R., Messenger, P. S., Gutierrez, A.P. 1982.** *An introduction to biological control*. Plenum Press, New York and London. 247 pp.

**Wang, X., Grewal, P.S. 2002.** Rapid genetic deterioration of environmental tolerance and reproductive potential of an entomopathogenic nematode during laboratory maintenance. *Biological Control*, 23(1): 71-78.

**Woodring, J.L., Kaya, H.K. 1988.** Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: a handbook of biology and techniques. *Arkansas Agricultural Experiment Station, Southern Cooperative Series Bulletin 331*, Fayetteville, AR, 30 pp.

