TİCARİ OLARAK KULLANILAN ENTOMOPATOJEN NEMATOD (*Heterorhabditis bacteriophora, Steinernema carpocapsae, Steinernema feltiae*) İZOLATLARININ DEPOLAMA ÖMÜRLERİNİN BELİRLENMESİ VE DEPOLAMA SÜRESİ SONUNDAKİ ETKİNLİK VE ÜREME KAPASİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Emre DEDE

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİCARİ OLARAK KULLANILAN ENTOMOPATOJEN NEMATOD (*Heterorhabditis bacteriophora, Steinernema carpocapsae, Steinernema feltiae*) İZOLATLARININ DEPOLAMA ÖMÜRLERİNİN BELİRLENMESİ VE DEPOLAMA SÜRESİ SONUNDAKİ ETKİNLİK VE ÜREME KAPASİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Emre DEDE
0000-0001-9017-9187

Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

BURSA – 2024
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans

TİCARİ OLARAK KULLANILAN ENTOMOPATOJEN NEMATOD (*Heterorhabditis bacteriophora, Steinernema carpocapsae, Steinernema feltiae*) İZOLATLARININ DEPOLAMA ÖMÜRLERİNİN BELİRLENMESİ VE DEPOLAMA SÜRESİ SONUNDAKİ ETKİNLİK VE ÜREME KAPASİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Emre DEDE

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK

Entomopatojen nematodlar (EPN), yaygınlıkla tarım zararlılarının mücadelesinde kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında, Ekobioset (*Steinernema carpocapsae*), Bioteam (*Heterorhabditis bacteriophora*), Nematac (*S. feltiae*) ticari ürünlerinin, 1, 25, 45 (Tavsiye Edilen Kullanma Tarihi), 50, 55 ve 65. günlerde canlılıkları, 25. ve 55. günde farklı dozlarda etkinlikleri ve üreme güçlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Yapılan çalışmanın sonuçlarında, çalışmada kullanılan tüm ürünlerin 45. güne kadar canlılık açısından oldukça dayanıklı olduklarını göstermiştir. Dayanıklılık en düşük olduğu tür *H. bacteriophora* olup bu değer 65. günde %50 canlılık olarak belirlenmiştir. Çalışma özelinde dayanıklılığın en yüksek olarak belirlendiği tür ise *S. carpocapsae* olup 65. günde %76.55 canlılık belirlenmiştir. 25 ve 55. günde farklı dozlarda etkinlikler üzerinde yapılan çalışma sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilmemiştir. Tüm türler için konukçu üzerinde oldukça yüksek oranda %96.66 ile 86.66 arasından değişen ölüm oranları elde edilmiştir. Ek olarak bu tez çalışmasında 25 ve 55. günde farklı dozlarda üreme güçlerinin elde edilmesi üzerinde yapılan çalışma sonucunda türler içerisinde farklı günlerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilememiştir. Ekobioset (*S. carpocapsae*) için en yüksek üreme gücü 50 infektif Juvenil (IJ), 25. günde ortalama 74134.2 IJ/*Galleria mellonella* olarak elde edilmiştir. En düşük değer ise 10 IJ, 55. günde ortalama 21082.4 IJ/*G. mellonella* olarak belirlenmiştir. Bioteam (*H. bacteriophora*), için 50 IJ, 25. günde en yüksek değer ortalama 61682.3 IJ/*G. mellonella* olarak belirlenmiştir. En düşük değer ise 10 IJ, 55. günde 13824.5 IJ/*G. mellonella* olarak belirlenmiştir. Nematac (*S. feltiae*), için en yüksek üreme gücü 50 IJ/*G. mellonella*, 25. günde ortalama olarak 95722.3 IJ/*G. mellonella* şeklinde belirlenmiştir. En düşük değer ise 10 IJ, 55. Günde ortalama 16308.2 IJ/*G. mellonella* olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Entomopatojen nematod, *Heterorhabditis bacteriophora, Steinernema carpocapsae, Steinernema feltiae,* Depolama ömrü

2024, xiii + 48 Sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

DETERMINATION OF THE STORAGE LIFE OF COMMERCIALLY USED ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE (*Heterorhabditis bacteriophora Steinernema carpocapsae, Steinernema feltiae*) ISOLATES AND INVESTIGATION OF THEIR EFFECTIVENESS

Emre DEDE

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

Supervisor: Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK

Entomopathogenic nematodes (EPN) are widely used to control agricultural pests. In this thesis study, the viability of commercial products Ekobioset (*Steinernema carpocapsae*), Bioteam (*Heterorhabditis bacteriophora*), Nematac (*S. feltiae*) were examined on days 1, 25, 45 (Recommended Use Before Date), 50, 55 and 65, and on days 25 and 55. It was aimed to determine the effectiveness and reproductive power of different doses per day. The results of the study showed that all products used in the study were quite durable in terms of viability until the 45th day (Recommended consumption date). The species with the lowest durable was *H. bacteriophora* and this value was determined as 50% viability on the 65th day. The species with the highest resistance was determined as 76.55% viability on the 65th day, specifically for *S. carpocapsae*. As a result of the study conducted on the activities of different doses on the 25th and 55th days, no statistically significant difference was found. For all species, very high mortality rates on the host, ranging from 96.66 to 86.66%, were obtained. In addition, as a result of the study conducted in this thesis study on obtaining reproductive powers at different doses on the 25th and 55th days, no statistically significant difference could be obtained within the species on different days. The highest reproductive power for the ecobiocete (*S. carpocapsae*) was 50 Infective Juvenile (IJ), with an average of 74134.2 IJ/*Galleria mellonella* on the 25th day. The lowest value was determined as 10 IJ, with an average of 21082.4 IJ/*G. mellonella* on the 55th day. For Bioteam (*H. bacteriophora*), 50 IJ, the highest value on the 25th day was determined as 61682.3 IJ/*G. mellonella*. The lowest value was determined as 10 IJ and 13824.5 IJ/*G. mellonella* on the 55th day. The highest reproductive power for Nematac (*S. feltiae*) is 50 IJ/*G. mellonella* was determined as an average of 95722.3 IJ/*G. mellonella* on the 25th day. The lowest value was 10 IJ, with an average of 16308.2 IJ/*G. mellonella* on the 55th day.

Key words: Entomopatojen nematod, *Heterorhabditis bacteriophora, Steinernema carpocapsae, Steinernema feltiae,* Storage life
2024, xiii + 48 pages.

ÖNSÖZ ve/veya TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince desteğini üzerimden esirgemeyen Değerli Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK'a sonsuz saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim sürecimde bilgi birikiminden yararlandığım, üzerinde gerçek manada emeği olup yardımlarını esirgemeyen ve her konuda bana destek olan Sevgili Hocam Doç. Dr. Tufan Can ULU'ya sonsuz saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezim süresince yardımlarını esirgemeyen Kıymetli Dostların Sayın Araş. Gör. Alperen Kaan BÜTÜNER ve Sayın Aydan DOĞAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam süresince gerekli ortamı sağlayan Bioglobal A.Ş. ve Sayın Özgür ATEŞ'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Ek olarak tezim süresince tecrübelerinden yararlandığım, Dr. Yavuz Selim ŞAHİN'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Son olarak bu tez çalışmamı beni her koşulla destekleyen biricik aileme armağan ediyorum.

Emre DEDE
…/…/…….

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET viii
ABSTRACT ix
ÖNSÖZ ve/veya TEŞEKKÜR x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ xii
ŞEKİLLER DİZİNİ xiii
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI 7
3. MATERYAL ve YÖNTEM 14
3.1. Çalışmada Kullanılan Ticari Ürünler 14
3.2. *Galleria mellonella* Larvalarının Üretimi ve Beslenmesi 19
3.3. Ticari Ürünlerin Ölü Canlı Miktarının Belirlenmesi 20
3.4. Ticari Ürünlerden Elde Edilen Canlı Nematodların Larvalar Üzerinde Enfeksiyonu 23
3.6. İnkübasyon Sonrası Üretilen EPN'lerin Sayımı 25
3.7. İstatistiksel Analiz 27
4. BULGULAR 28
4.1. Ticari Ürünlerin Canlılıklarının Belirlenmesi 28
4.2. Ticari Ürünlerden Elde Edilen Canlı Nematodların Larvalar Üzerinde Enfeksiyonunun Değerlendirilmesi 31
4.3. Üreme Güçlerinin Belirlenmesi 35
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 41
KAYNAKLAR 44
ÖZGEÇMİŞ 48

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	**Açıklama**
µl	Mikrolitre ($1x10^{-6}$ litre)
cm	Santimetre
mm	Milimetre
℃	Santigrat Derece
%	Yüzde
ml	Mililitre (1×10^{-3} l)
L	Litre
g	Gram

Kısaltmalar	**Açıklama**
EPN	Entomopatojen Nematod
IJ	İnfektif Jüvenil
J1	Birinci Dönem Jüvenil
J2	İkinci Dönem Jüvenil
J3	Üçüncü Dönem Jüvenil
J4	Dördüncü Dönem Jüvenil

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 1.1.	Entomopatojen nematodların hayat döngüleri (Doğan ve Susurluk, 2023)……..	4
Şekil 3.1.	Yurtdışından gelen ürünlerin koli görünümü ……	15
Şekil 3.2.	Biberde thrips mücadelesinde uygulanacak *S. feltiae* ürünleri…….....	16
Şekil 3.3	Ürünlerin nem tayini çalışması ……	17
Şekil 3.4	Ürünlerin paket ağırlıkları…….	18
Şekil 3.5	6,9 ℃ özel raflarda kargolanmaya hazır ürün……...	19
Şekil 3.6	Databaseden alınan anlık sıcaklık verileri ……	19
Şekil 3.7	6. Dönem *G. mellonella* larvaları ……..	21
Şekil 3.8	Steril kabin içerisinde örnek alma ve paketleme işlemi……..	22
Şekil 3.9	Mikroskop üzerinde nematod ölü canlı sayımı……	23
Şekil 3.10	Mikroskopta ölü canlı nematodların 10x de görüntüsü……	23
Şekil 3.11	*Galleria mellonella* larvalarının hassas terazide ölçümü…….	24
Şekil 3.12	White Trap düzeneğinde *G. mellonella* larvaları ……...	25
Şekil 3.13	White Trap düzeneğinde *H. bacteriophora* ile enfekte olmuş *G. mellonella* larvaları…….	26
Şekil 3.14	+4 ºC'de buzdolabında muhafaza edilen EPN'ler.....	27
Şekil 4.1	Ekobioset (*S. carpocapsae*) ürünün günlere göre canlılık yüzdeleri ……	29
Şekil 4.2	Bioteam (*H. bacteriophora*) ürünün günlere göre canlılık yüzdeleri ……	30
Şekil 4.3	Nematac (S. feltiae) ürünün günlere göre canlılık yüzdeleri ……	31
Şekil 4.4	10 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 25. günde ürünlerin *G. mellonella* larvaları üzerindeki etkinleri ……	32
Şekil 4.5	10 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 55. günde ürünlerin *G. mellonella* larvaları üzerindeki etkinleri. ……	33
Şekil 4.6	50 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 25. günde ürünlerin *G. mellonella* larvaları üzerindeki etkinleri ……	34
Şekil 4.7	50 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 55. günde ürünlerin *G. mellonella* larvaları üzerindeki etkinleri ……	35
Şekil 4.8	10 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 25. ve 55. günde ürünlerin *G. mellonella* larvaları üzerindeki üreme güçlerinin grafiği ……	36

Şekil 4.9 50 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 25. ve 55. günde ürünlerin *G. mellonella* larvaları üzerindeki üreme güçlerinin grafiği 37
Şekil 4.10 10 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 25. ve 55. günde ürünlerin *G. mellonella* larvaları üzerindeki üreme güçlerinin grafiği 38
Şekil 4.11 50 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 25. ve 55. günde ürünlerin *G. mellonella* larvaları üzerindeki üreme güçlerinin grafiği 39
Şekil 4.12 10 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 25. ve 55. günde ürünlerin *G. mellonella* larvaları üzerindeki üreme güçlerinin grafiği 40
Şekil 4.13 50 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 25. ve 55. günde ürünlerin *G. mellonella* larvaları üzerindeki üreme güçlerinin grafiği 41

1. GİRİŞ

Zirai mücadele, tarımsal üretimde zararlı organizmalar ile mücadele ederek bitki sağlığının ve ürün veriminin artırılması amacıyla yapılan faaliyetleri kapsamaktadır. Bu faaliyetlerin temel amacı, tarımsal ürünlerin miktar ve kalitesini artırmak, ekonomik kayıpları en aza indirmek ve çevresel sürdürülebilirliği sağlamaktır. Zararlı organizmaların (hastalık, zararlı ve yabancı otlar) neden olduğu zararları önlemek için çeşitli kimyasal, biyolojik, kültürel fiziksel-mekanik, biyoteknik mücadele ve entegre mücadele yöntemleri kullanılmaktadır (Bütüner ve Susurluk, 2023a; Bütüner vd., 2024)

Kimyasal mücadele tekniği, tarımsal zararlılarla mücadelede en çok tercih edilen yöntem olmaktadır. Kimyasal mücadele yönteminin tercih edilmesinin temel nedenleri arasında hızlı etki göstermesi, uygulama kolaylığı ve geniş spektrumda etkinlik sağlaması yer almaktadır. Kimyasal mücadelede, pestisitlerin kullanımıyla zararlılar ile hızlı ve etkin bir şekilde mücadele edilmektedir, ürün kayıplarını en aza indirmektedir ve tarımsal verimi artırmaktadır. Bununla birlikte, kimyasal mücadele yönteminin çevresel ve sağlık açısından potansiyel olumsuz etkileri göz önünde bulundurularak dikkatli ve kontrollü bir şekilde uygulanması gerekmektedir (Günel ve Öztürk, 2011; Bütüner vd., 2023).

Kimyasal ilaçlar, tarımsal zararlılarla mücadelede sıkça tercih edilmekle birlikte, çevre ve insan sağlığı üzerinde ciddi olumsuz etkilere sahip olabilmektedir. Pestisitlerin kullanımı, özellikle mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkileri nedeniyle insan sağlığı için tehlikeler oluşturabilmektedir (Soyöz ve Özçelik, 2003). Bu olumsuz etkiler, çevresel sürdürülebilirliği tehdit etmektedir ve tarım ekosisteminde biyolojik çeşitliliği azaltmaktadır. Bu nedenlerle, biyolojik ve kültürel mücadele yöntemleri gibi daha sürdürülebilir ve çevre dostu alternatif mücadele yöntemlerinin benimsenmesi büyük önem taşımaktadır. Biyolojik mücadele, zararlıların popülasyonunu doğal düşmanları ile mücadele etmeyi hedeflemektedir. Kültürel mücadele geleneksel tarım işlemleri önlemleri içermektedir (Ertürk vd., 2012; Bütüner vd., 2023b). Bu yöntemler, kimyasal ilaçların olumsuz etkilerini azaltmak ve tarımsal üretimde sürdürülebilirliği sağlamak için önemli alternatifler sunmaktadır.

Biyolojik mücadele, zararlı böceklerin ve organizmaların popülasyonlarını kontrol altına almak için doğal düşmanların kullanılması yöntemidir. Bu yöntem, genellikle parazitoidler, predatörler ve patojenler gibi doğal düşmanların zararlı böceklerin popülasyon yoğunluğunu ekonomik zarar seviyesinin altında tutmak amacıyla uygulanmaktadır. Doğal düşmanlar, hedef zararlı popülasyonlarını azaltarak zararlının ölüm oranını artırmakta veya doğurganlık oranlarını düşürmektedir (Smith, 1939; Bosch, 1971). Biyolojik mücadele, çevreye zarar vermeden ve kimyasal kalıntı bırakmadan zararlı popülasyonlarının etkili mücadelesini sağlamaktadır. Bu yöntem, tarımsal zararlıların yönetiminde sürdürülebilir bir çözüm sunmaktadır ve uzun vadeli ekonomik ve ekolojik faydalar sağlamaktadır (De vd., 2014; Sethuraman vd., 2020).

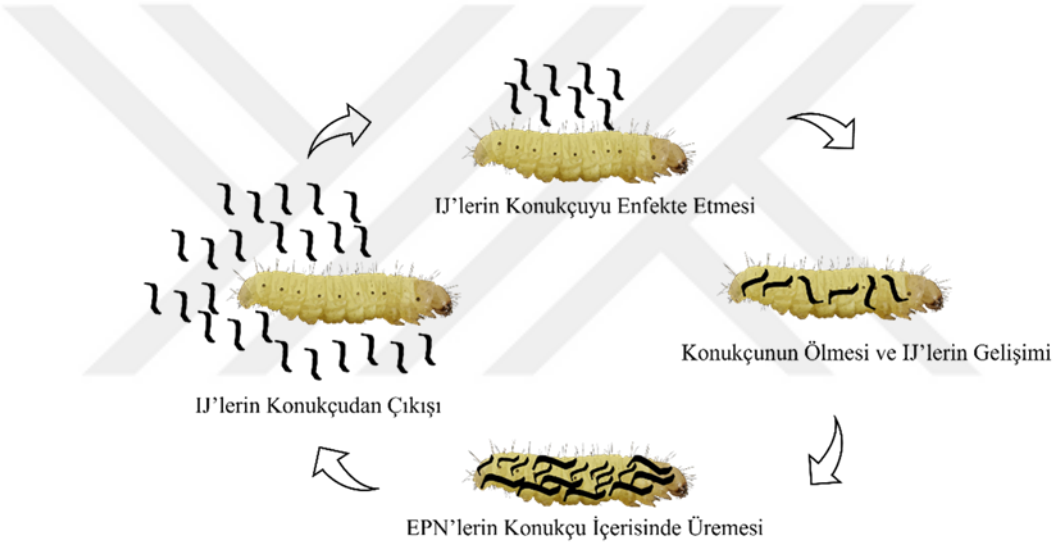
Biyolojik mücadele ajanı, zararlı organizmaların popülasyon yoğunluğunu azaltmak için kullanılan doğal düşmanlardır. Bu ajanlar, genellikle parazitoidler, predatörler, patojenler veya rekabetçi mikroorganizmalar olarak sınıflandırılır. Biyolojik mücadele ajanları, hedef organizmanın popülasyonunu kimyasal mücadele yöntemlerine kıyasla daha çevre dostu bir şekilde mücadele edebilmektedir ve genellikle yüksek spesifikliğe sahiptir, bu da çevreye zarar verme riskini minimize etmektedir (Rhodes, 1993; O'Brien, 2017). Bu ajanlar arasında bakteriler, virüsler, mantarlar ve protozoalar da yer almaktadır ve bunlar, patojenlere karşı doğrudan antibiyotik salgılama, rekabet yoluyla yer ve besinleri ele geçirme veya doğrudan patojenleri öldürme gibi mekanizmalarla etki göstermektedir (Khachatourians, 1986; Bonaterra vd., 2022).

Entomopatojen nematodlar biyolojik ajan olarak yaygınlıkla kullanılabilmektedir (Lacey vd., 2001). Bu ajanlar, doğal düşmanlarının olduğu ortamlardan izole edilerek biyolojik mücadele programlarına entegre edilmektedir (Susurluk ve Ehlers, 2008). EPN'ler biyolojik mücadelede önemli bir rol oynamaktadır. İlk olarak 1900'lü yılların başlarında keşfedilen bu nematodlar, zararlı böcek popülasyonları ile mücadele etmede etkili olmaları nedeniyle dikkat çekmiştir (Gaugler ve Kaya, 2020; Dede vd., 2022). Ayrıca, EPN'ler de biyolojik mücadele ajanları arasında önemli bir yer tutmaktadır ve zararlı böceklerin mücadelesinde etkili bir şekilde kullanılmaktadır (Grønvold vd., 1996).

Günümüzde, EPN'ler geniş bir uygulama yelpazesiyle tarım ve ormancılıkta kullanılmaktadır. *Steinernema* ve *Heterorhabditis* cinslerine ait nematodlar, tarımda zararlı böceklerle mücadelede yaygın olarak kullanılmaktadır. *Steinernema* cinsine ait türler arasında *S. carpocapsae, S. feltiae* ve *S. riobrave* yer alırken, *Heterorhabditis* cinsinde ise *H. bacteriophora, H. megidis* ve *H. indica* öne çıkan türler içermektedir. (Labaude ve Griffin, 2018; Gaugler ve Kaya, 2020). Modern biyoteknolojik gelişmeler, bu nematodların daha etkili hale getirilmesini sağlamıştır (Lacey ve Georgis, 2012). EPN'lerin etkili biyolojik mücadele ajanları olarak kullanılabilmesi için, konukçu-nematod etkileşimleri, çevresel faktörler ve biyolojik özellikleri üzerine yapılan araştırmaların derinleştirilmesi gerekmektedir. Bu çalışmalar, nematodların saha performanslarını artırmak ve geniş ölçekli uygulamalarını mümkün kılmak için kritik öneme sahip olmaktadır (Helmberger vd., 2017).

Ruhsatlı olarak biyolojik mücadelede kullanılan EPN'ler, *Enterobacteriaceae* spp. familyasına ait gram negatif bakterilerle simbiyotik bir ilişki içinde bulunmaktadır. *Steinernema* cinsinden olan nematodlar *Xenorhabdus* spp. türü bakterilerle, *Heterorhabditis* cinsinden olanlar ise *Photorhabdus* spp. türü bakterilerle simbiyotik ilişki içerisindedir (Ciche vd., 2006). Bu simbiyotik ilişkiler, nematodların yaşam döngüsü ve patojenite mekanizmalarında kritik bir rol oynamaktadır. *Photorhabdus* spp., Heterorhabditidae familyasına ait üyelerin sindirim sisteminde dağınık halde bulunmaktayken, *Xenorhabdus* spp., Steinernematidae familyasına ait üyelerde özel bir kese içinde bulunmaktadır (Ehlers, 1998; Kepenekci ve Susurluk, 2003; Grewal vd., 2005). EPN'lerin yaşam tarzı, toprakta serbest yaşayan 3. dönem Juvenil ya da IJ'ler olarak başlar. EPN'ler yumurta, 1.dönem juvenil (J1), 2. dönem juvenil (J2), 3. dönem juvenil (IJ), 4. dönem juvenil (J4) ve Ergin olarak tamamlamaktadır (Ehlers, 2001; Pezowicz, 2004).

Sadece 3. dönem jüvenil ya da IJ olan dönem, uygun böcek konukçularını bulup konukçuya penetre olmaktadır ve sonrasında simbiyotik bakterilerini böcek hemolenfi içine salmaktadır. Bakteriler, böceği yaklaşık 72 saatte öldürmekte ve nematodlar için uygun bir üreme ortamı sağlamaktadır. IJ'ler, böcek konukçularının içinde beslenip çoğalarak yeni 3. dönem jüvenil ya da IJ nesilleri oluşturmaktadır ve besin tükendikten sonra konukçudan ayrılarak çevredeki diğer böcekleri enfekte etmek üzere yayılmaktadır (Stuart vd., 2006). Bu arayış sürecinde, 20 aya kadar toprak içinde konukçu arayabilmektedir (Susurluk ve Ehlers, 2008).



Şekil 1.1. Entomopatojen nematodların hayat döngüleri (Doğan ve Susurluk, 2023)

Entomopatojen nematodların ticari üretimi, üç ana yöntemle gerçekleştirilmektedir: *In vivo* üretim, katı ortamlarda *in vitro* kültür ve sıvı ortamlarda *in vitro* kültürdür. (Shapiro-Ilan vd., 2016). *In vivo* üretim, düşük sermaye gerektirmesine karşın, işçilik maliyetleri ve böcek ihtiyaçları nedeniyle ölçek ekonomisinde sınırlıdır. Katı ortamda *in vitro* kültür, orta düzeyde teknoloji ve maliyet gerektirirken, sıvı ortamda *in vitro* kültür en ekonomik ve verimli yöntem olarak öne çıkmaktadır (Susurluk vd., 2003; Shapiro-Ilan vd., 2012).

Entomopatojen nematodların biyolojik mücadele amaçlı kullanımı, özellikle tarımdaönemli başarılara imza atmaktadır. Ticari üretim ve formülasyon teknolojilerindeki ilerlemeler, bu nematodların kullanımını yaygınlaştırmakta ve pestisit kullanımını azaltarak çevre dostu bir çözüm sunmaktadır (Lacey ve Georgis, 2012). Ancak, üretim verimliliğinin artırılması ve biyolojik mücadele potansiyelinin geliştirilmesi için daha fazla araştırma ve geliştirme gerekmektedir (Ehlers, 2001; Susurluk, 2008).

Amerika Birleşik Devletleri'nde, *S. carpocapsae ve H. bacteriophora* türleri en çok bilinen ve ticari olarak ruhsatlandırılmış EPN türleridir (Grewal vd., 2005). Avrupa'da ise, *S. feltiae* ve *H. megidis* türleri ticari ürünlerde öne çıkmaktadır (Grewal vd., 2005). Japonya ve Çin'de, EPN'lerin ticari üretimi, biyolojik mücadele programlarının önemli bir parçası haline gelmektedir ve bu ülkelerde çeşitli EPN türleri ruhsatlandırılmıştır (Kim vd., 2011). Türkiye'de Ruhsatlı EPN ürünleri arasında *Steinernema* ve *Heterorhabditis* cinslerine ait nematodlar yer almaktadır (Susurluk vd., 2009; Özdemir ve Bayram, 2017).

Ticari ürünler genellikle düşük çevresel riskleri ve yüksek etkinlikleri nedeniyle tercih edilmektedir ve bu ürünler genellikle toprakta veya sularda uygulanabilir formülasyonlar halinde satılmaktadır (Kaya ve Gaugler, 1993; Burnell ve Stock, 2000; Susurluk ve Ulu, 2015). EPN uygulama yöntemleri genellikle olumlu sonuçlar vermekle birlikte, çeşitli sınırlamalarla karşılaşılmaktadır. Bu sınırlamalar arasında EPN'lerin yüksek üretim maliyetleri ve düşük değerli ürünlerde etkin kullanımının zorluğu bulunmaktadır (De La Torre, 2003; Susurluk ve Bütüner, 2024). Ayrıca, EPN'lerin depolama ve nakliye koşulları, onların verimliliğini etkileyen diğer bir önemli faktördür. Bu durum, özellikle geniş ölçekli tarımsal uygulamalarda ve düşük maliyetli zararlılarla mücadele stratejilerinde kullanımını sınırlandırmaktadır. EPN'lerin uygulamanın bazı dezavantajları arasında kısa raf ömrü, uzmanlık gerektirmesi, açık alanlarda sınırlı etkililik ve kullanılan alanlarda EPN'lerin homojen bir şekilde dağıtılamaması bulunmaktadır. (Ulu ve Erdoğan, 2023). EPN ticari üretimi ve taşınmasında kullanılan formülasyon çalışmaları, bu biyolojik ajanların etkinliğini artırmak ve raf ömrünü uzatmak amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmektedir. EPN formülasyonları, nematodların enerji rezervlerini koruyarak depolama stabilitesini artırmayı

hedeflemektedir. Fiziksel olarak jellerde hapsedilme veya substratların su aktivitesinin azaltılması gibi yöntemler kullanılarak, *S. carpocapsae* gibi türlerin oda sıcaklığında 4-5 aya kadar saklanabilmesi sağlanmaktadır (Grewal, 2000). Aljinat ve talaş formülasyonları, *S. kushidai* türünün 5 santigrat derece (°C) de uzun süre canlı kalmasını sağlayarak ekonomik açıdan avantajlı sonuçlar vermektedir (George vd., 2022). Diatomlu toprak kullanılarak yapılan yüksek konsantrasyonlu formülasyonlar, *S. yirgalemense* ve *S. jeffreyense* türlerinin farklı sıcaklıklarda saklanmasında etkili olmaktadır (Nxitywa ve Malan, 2022).

Entomopatojen nematodların raf ömrü ve formülasyon stabilitesi, nematodların osmotik stres toleransı, enerji rezervleri ve su kaybı kontrolü gibi faktörlere bağlıdır. Çeşitli formülasyon çalışmaları, nematodların bu streslere karşı dayanıklılığını artırarak ticari kullanımlarını genişletmeyi amaçlamaktadır (Kagimu vd., 2017). Örneğin, *H. bacteriophora*'nın desikasyon (su kaybı) toleransını artırmak için yapılan genetik seleksiyon çalışmaları, nematodların raf ömrünü uzatmada önemli ilerlemeler sağlamıştır (Strauch vd., 2004). Aljinat granülleri içinde formüle edilen *H. bacteriophora*, formaldehit gibi katkı maddeleri ile kombinlenerek yaşam süresi ve etkinliği artmaktadır (Kary vd., 2018). EPN'lerin daha üzün süre depolanabilmesive raf ömürlerinin uzatılması için yeni formülasyonlarının geliştirilmesi konusunda araştırmalar yapılmaktadır. Ticari ürünlerin etkinliklerine yönelik oldukça fazla çalışma olmasına rağmen, depo ömrünün belirlenmesi ve son tarihi geçmiş ürünlerin etkinliklerinin ne kadar sürebileceğine yönelik çalışmalar da artırılmalıdır. Bu çalışmada Türkiye'de ruhsatlı olan 3 ithal nematod türü (*S. feltiae, S. carpocapsae, H. bacteriophora*) ürünlerinin son kullanma tarihlerinin belirlenmesi, ürünlerin etkinliklerinin belirlenmesi ve üreme kapasitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Eliceche vd. (2021) yaptıkları çalışmada, Arjantin'deki bahçe topraklarından izole edilen *H. bacteriophora* SUP ırkının depolama, etkinlik ve üremesi için optimum koşulları belirlemişlerdir. Bu ırk, *Tenebrio molitor* larvalarını 16 ve 25°C'de sırasıyla 7 ve 4 gün sonra %90'ın üzerinde bir oranla öldürebilmiş, ölüm oranı 25°C'de önemli ölçüde daha yüksek olmuştur. 4 ve 11°C'de enfeksiyon bildirilmemiştir. Daha yüksek konsantrasyonlar (150'den fazla IJ/larva) daha yüksek ölüm yüzdelerine neden olmuştur. Ancak, inokulum yoğunluğunun artması nesil üretimini azaltmış ve larvadan çıkış süresini arttırmıştır. 2500 ile 7500 IJ ml arasındaki depolama yoğunluğunun IJ'nin hayatta kalması üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır. 4 ve 16°C'de muhafaza edilen IJ'nin hayatta kalması, 4 haftalık depolamadan sonra yaklaşık %80 ve 32 hafta sonra %30 olmuştur. Bununla birlikte, 25°C'de 4 haftada %60 IJ canlılığı gözlemlenmiş, 16 hafta sonra yaklaşık %10'a düşmüş ve 24 haftada hiç sağkalım olmamıştır. 90 ve 120 günlük depolamadan sonra etkinlikte genel olarak önemli bir azalma gözlemlenmiş, ancak bu, 16 ve 25°C'ye kıyasla 4°C'de daha belirgin olmuştur. 4°C'de saklanan IJ'nin etkinliği 90 ve 120 gün sonra azalmış, ancak 60 gün sonra azalmamıştır. Bu çalışma, *H. bacteriophora* türünün önemli nematod özelliklerini etkileyen bazı temel çevre koşulları hakkında faydalı bilgiler sağlamaktadır.

Shapiro-Ilan vd. (2006) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, topraktaki 11 EPN türünü temsil eden 29 ırkın ömrü 42 ila 56 gün arasında karşılaştırılmıştır. Her birinde altı ila sekiz nematod suşu ve bir veya daha fazla nematod suşu ortak olan beş laboratuvar deneyi serisi gerçekleştirilmiş, böylece deneyler arasında niteliksel karşılaştırmalar yapılabilmiştir. Nematodlar arasında *H. bacteriophora* (dört ırk), *H. indica* (Homl), *H. marelatus* (Point Reyes), *H. megidis* (UK211), *H. mexicana* (MX4), *S. carpocapsae* (sekiz ırk), *S. diaprepesi*, *S. feltiae* (SN), *S. glaseri* (NJ43), *S. rarum* (17C&E) ve *S. riobrave* (dokuz ırk) bulunmuştur. *Steinernema carpocapsae*'de uzun ömürlülük açısından türler arası önemli farklılıklar gözlenmiş ve en yüksek hayatta kalma oranı Sal ırkı tarafından sergilenmiştir. Türler arası tüm karşılaştırmalarda Sal ırkı standart olarak kullanılmıştır. Buna karşılık, *S. riobrave*'de tür içi varyasyon çok az olmuştur. Genel olarak, *S. carpocapsae* (Sal) ve *S. diaprepesi*'nin en yüksek hayatta kalma kapasitesine

sahip olduğu tahmin edilmiştir. *Heterorhabditis bacteriophora* (Lewiston), *H. megidis, S. feltiae* ve *S. riobrave*'de (3-3 ve 355) ikinci bir uzun ömür düzeyi gözlemlenmiştir. Diğer *H. bacteriophora* ırkları (Hb, HP88 ve Oswego) ile *S. glaseri* ve *S. rarum*'da daha düşük hayatta kalma seviyeleri gözlenmiştir. *Heterorhabditis indica* ve *H. marelatus* ile *H. mexicana*'da daha düşük ömür süreleri gözlenmiştir. Bu çalışma, nematod kalıcılığının farklı toprak biyotik ve abiyotik koşulları altında değişebilmesine rağmen, uzun ömürlülüğe ilişkin temel verilerin belirli bir hedef zararlı için en iyi eşleşmeyi seçmede yardımcı olabileceğini göstermektedir.

Sumaya vd. (2017) tarafından gerçekleştirilene çalışmada, EPN *H. bacteriophora*'nın dauer juvenillerinin (DJ) oksidatif stres toleransı ile uzun ömür arasındaki ilişki 25 ve 7°C'de araştırılmıştır. DJ oksidatif stres toleransı ile Ringer solüsyonunda saklama sırasındaki uzun ömür arasında güçlü ve anlamlı bir korelasyon kaydedilmiştir (7°C'de R=0.802; 25°C'de R=0.604). Fenotipleme, 40 *H. bacteriophora* yabani tip suşu ve kendilenmiş hat koleksiyonları için gerçekleştirilmiştir. 25°C'de DJ'lerin %50'sinin ortalama hayatta kalma süresi 21 ila 57 gün arasında değişirken, oksidatif stres altında hayatta kalma 3 ila 22 gün arasındaymış. 7°C'de, DJ Ringer'de saklandığında 94 günlük maksimum MTS 50 değeri değerlendirilirken, oksidatif stres indüksiyonu ile maksimum MTS 50 değeri yalnızca 25 günmüş. Oksidatif strese karşı DJ toleransının kalıtsallığı yüksekmiş (h2>0.9), bu da başarılı seçici üreme için yüksek olasılığın bir göstergesidir. Ayrıca, önceden seçilmiş *H. bacteriophora* soylarının bir alt kümesinde, DJ oksidatif stres toleransı, kuma uygulamadan sonra DJ'nin hayatta kalması ile ilişkilendirilmiştir (R=0.719). Çalışma, gelişmiş stres toleransı, daha uzun raf ömrü ve toprak kalıcılığı olan melezler üretmek amacıyla bir genetik yetiştirme programı için gerekli temel verileri sağlamaktadır.

Grewal, (2000) tarafından yapılan bu çalışmada, sınırlı raf ömrü, biyolojik mücadelede EPN'lerin geniş ölçekli kullanımının önünde büyük bir engel olduğu belirtilmiştir. Son zamanlarda, EPN'leri içeren, suda dağılabilen granüler bir formülasyonun (WG) geliştirilmesi anlatılmıştır. Çalışma, *S. carpocapsae* (Weiser) IJ'lerinin 25°C'deki depolama stabilitesinin bu WG'de üç aydan altı aya kadar arttığını bildirmektedir. Ayrıca, arttırılmış stabilitenin, IJ'lerin oksijen ve lipit rezervi kullanımını azaltan kısmi

anhidrobiyozun uyarılması yoluyla elde edildiği de gösterilmiştir. Nematod enfektivitesi, WG formülasyonunda kısmi anhidrobiyoz altında depolama sırasında etkilenmemiştir.

George vd. (2022) yapılan çalışmada, EPN'lerin ticarileştirilmesi ve geniş ölçekli kullanımı, formülasyonlarda ve depolamada kısa raf ömürleri nedeniyle sınırlı olduğu belirtilmiştir. Bu, kalitenin düşmesine ve alanda böceklere karşı etkinliğin azalmasına yol açmaktadır. Bazı formülasyonların *S. kushidai'*nin IJ'lerinin hayatta kalma ve enfektifliği üzerindeki etkilerini 5 ve 25°C'de 6 hafta boyunca araştırmıştır. Çalışmada, formülasyonlarda hayatta kalma ve virülans oranının farklı sıcaklıklarda farklılık gösterdiği ve zamanla azaldığı belirlenmiştir. Aljinat, IJ'lerin çoğunu korumuş ve 5°C'de daha uzun süre saklanabilmiştir, ekonomik açıdan ise talaş formülasyonu daha iyi sonuçlar vermiştir.

Nxitywa ve Malan, (2022) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, EPN'lerin biyolojik mücadele ajanı olarak kullanımı, kısa raf ömürleri nedeniyle olumsuz etkilenmekte olduğunu belirtmiştir. *Steinernema yirgalemense* ve *S. jeffreyense*'nin *in vitro* sıvı kültürlü IJ'leri depolama stabilitesini ve enfektivitesini araştırmak amacıyla sırasıyla 900.000 ve 700.000 IJs/g diatomlu toprak (DE) formülasyonu kullanılarak yüksek konsantrasyonlarda formüle edilmiştir. Bu formülasyonlar, 8 hafta boyunca farklı sıcaklıklarda test edilmiştir. Depolama sırasında kontaminasyonu önlemek için formülasyona antimikrobiyal ajanlar Nipagin ve Procydin eklenmiştir. Çalışmada, iki nematod türünün farklı depolama sıcaklıklarında hayatta kalma ve enfeksiyon oluşturma oranlarının farklı olduğu gözlemlenmiştir. Ortalama hayatta kalma yüzdesi tüm formülasyonlarda (mikrobiyal madde içermeyen kontrol dahil) zamanla azalmış, ancak 14°C'de 25°C'ye göre daha yüksek olmuştur. 8 haftalık depolamadan sonra oda sıcaklığında hayatta kalma oranları sırasıyla %67-71 ve %42-56 olmuştur. Procydin, mantarların büyümesini Nipagin ile elde edilenden daha uzun süre geciktirmiştir, ancak her iki nematod türünün hayatta kalma oranını ve patojenitesini azaltmıştır. Daha düşük bir konsantrasyonda Procydin, mantar büyümesini engellemeye yönelik EPN formülasyonlarında kullanım potansiyeline sahip olabilir.

Connick vd. (1994) tarafından yapılan bu çalışmada, EPN'lerin biyolojik mücadele ajanı olarak kullanımı, kısa raf ömürleri nedeniyle olumsuz etkilendiği bildirilmektedir. *Steinernema carpocapsae* nematodlarının "Pesta" granüllerinde 21°C'deki raf ömrü, düşük formaldehit konsantrasyonları eklenerek 8 haftadan 26 haftaya çıkarılmıştır. Ortalama 427.000 nematod/g içeren pesta numuneleri, buğday unu (irmik veya ekmek unu), kaolin, bentonit, turba yosunu, nematod bulamacı ve formaldehit (%0-1,4 a/a) ile hazırlanmış ve su içeriği %23,6-26,9'a kadar kurutulmuştur. Pesta granüllerinden nematodlar, suya veya nemli filtre kağıdına konulduğunda ortaya çıkmıştır. %0,2 a/a formaldehitin (nominal; analize göre %0,05) eklenmesi, irmik bazlı Pesta'da nematodun hayatta kalmasını artırmış ve ayrıca granüller üzerinde mantar büyümesini de inhibe etmiştir. Hamurun hazırlanmasından önce nematod bulamacına formaldehit ilavesiyle hazırlanan ekmek unu Pesta örneklerinin, kuru bileşenlerin bir karışımına eklenmesi yerine daha uzun raf ömrüne sahip olduğu gözlenmiştir. %0,2 formaldehit ile hazırlanan granüllerden elde edilen ve 21°C'de 20 hafta saklanan nematodlar, balmumu güvesi (*G. mellonella*) larvalarının %100 ölümüne neden olmuştur.

Ruiz-Vega vd. (2018) tarafıdan yapılan çalışmada, toprakta yaşayan böcek zararlılarına karşı kimyasal böcek öldürücülere alternatif bir mücadele yöntemi olarak, aljinat boncuklarda formüle edilmiş EPN'lerin uygulanması incelenmiştir. Amaç, nematodun hayatta kalması ve bulaşıcılığı üzerindeki faydayı karşılaştırmaktır: (i) yavruların ön koşullandırılması ve (ii) aljinat boncuklarının kaplanması. *Steinernema glaseri, S. carpocapsae* ve *H. bacteriophora* nematodları, balmumu güvesi *G. mellonella*'nın son dönem larvalarında çoğaltılmış ve ortaya çıkan IJ'ler iki yakalama işlemine tabi tutulmuştur: beyaz tuzaklar ve Paris sıvası. Her bir sodyum aljinat küreciğinde toplam 1000 IJ formüle edilmiş ve boncuklar 23 ± 3°C'de saklanmıştır. Yavruların ön koşullandırılması veya kaplaması olmayan boncuklarda, *S. carpocapsae* daha yüksek hayatta kalma oranına (%58,8), en uzun hayatta kalma süresine (28 dpf) ve daha yüksek enfeksiyona (%100) sahip olmuştur. Ön koşullandırma, *S. glaseri*'nin hayatta kalma ve enfeksiyonunu 21 dpf'de sırasıyla %22,5 ve 14 dpf'de %70,0 artırmıştır. Aljinat kaplama, *H. bacteriophora*'nın hayatta kalma oranını (%21,7) ve enfektivitesini (%95) 28 dpf'ye kadar artırmıştır. Ön koşullandırma ve kaplama kombinasyonu, *S. glaseri*'nin hayatta kalmasını (14 dpf'ye kadar %10) ve *S. carpocapsae*'nin enfeksiyonunu (35 dpf'ye kadar

%100) desteklemiştir. Bu çalışma, ön koşullandırılmamış ve kaplanmamış *S. carpocapsae*'nin daha iyi hayatta kalma ve enfeksiyon oranlarına sahip olduğunu göstermektedir.

Selvan vd. (1993) yaptıkları çalışmada, IJ'lerin sınırlı raf ömrü, EPN'lerin tam biyolojik mücadele potansiyelinin gerçekleştirilmesinde büyük bir engel olarak belirtilmiştir. *Hetororhabditis bacteriophora*, *S. carpocapsae* ve *S. glaseri* nematodları, balmumu güvesi *G. mellonella*'nın larvalarında kültürlenmiş ve yeni ortaya çıkan IJ'ler, 25°C'de suda saklanmıştır. Minimum %20 hayatta kalma oranıyla tahmin edilen raf ömrü, türler arasında değişiklik göstermiştir: IJ *S. glaseri* 36 hafta hayatta kalırken, *S. carpocapsae* ve *H. bacteriophora* sırasıyla yalnızca 16 ve 7 hafta hayatta kalmıştır.

Shapiro-Ilan vd. (2001), EPN'lerin nematod enfeksiyonlu böcek kadavralarında formüle edilerek depolama ve kullanım kolaylığı problemlerinin aşılabilirliğini araştırmışlardır. *Heterorhabditis bacteriophora* ve *G. mellonella* ile yapılan deneylerde, test edilen 19 formülasyonun bir kombinasyonu (nişasta-kil) kadavra üzerinde iyi yapışma göstermiştir ve nematodların üreme ve enfektivitesi üzerinde olumsuz etkisi olmamıştır. Diğer formülasyonlar ya zayıf yapışma gösterdi ya da nematod üremesini azalttığını bildirmişlerdir. İki formülasyon, kadavraların kısmen kurutulmasına olanak sağlarken, diğer formülasyonlar ve formüle edilmemiş kadavralar kurutma sırasında üreme oranlarını düşürdüğünü bildirmişlerdir. Dört günlük kadavralar, sekiz günlük kadavralara göre kurutmaya daha uygun olmuştur. Formüle edilen kadavralar, formüle edilmemiş kadavralara göre karıştırma sırasında parçalanmaya ve birbirine yapışmaya daha dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Wilson ve Ivanova, (2004) tarafından gerçekleştirilen, EPN'lerin tarım ve bahçecilik zararlılarına karşı biyolojik insektisit olarak kullanımını incelemiştir. Ticari ürünlerde genellikle inert katı taşıyıcılar üzerinde kısmen dehidre edilmiş nematodlar bulunur, ancak bu ürünlerde nematod hayatta kalma oranı genellikle düşüktür, işlenmesi zordur ve tüm nematod türleri ile uyumlu değildir. Araştırmacılar, nematodların depolanması ve taşınması için nötr yoğunluklu kolloidal silika süspansiyonlarına dayalı, viskoz olmayan, yapışkan olmayan ve toksik olmayan bir sıvı formülasyon geliştirmiştir. Havalandırma

olmadan bu formülasyonda saklanan nematodların hayatta kalması ve virülansı, havalandırılmış çeyrek mukavemetli Ringer çözeltisinde saklanan nematodlardan daha üstün bulunmuştur.

Wenxiu vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada, *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. longicaudum*, *H. bacteriophora* ve *H. indica* gibi beş nematod türünün IJ'lerinin hayatta kalma ve enfektivitesi üzerindeki taşıyıcılar, sıcaklıklar, IJ'lerin konsantrasyonları ve bir fungisitin etkilerini değerlendirmiştir. Araştırma, bu nematodlar için uyarlanmış formülasyonlar oluşturmayı amaçlamıştır. Vermikülit ve humus, *Steinernema* türlerinin depolanması için iyi taşıyıcılar olarak bulunmuş ve %90'dan fazla IJ hayatta kalma oranı 120 gün boyunca 5°C'de, 80 gün boyunca 15°C'de ve en az 20 gün boyunca 25°C'de gözlenmiştir. *Heterorhabditis bacteriophora*'nın depolanmasında ise %90 hayatta kalma oranı 10 gün boyunca 5°C ve 15°C'de sağlanmıştır. 25°C'de 10 gün sonra, *H. bacteriophora* ve *H. indica* için yaklaşık %80 IJ hayatta kalma oranı kaydedilmiştir. *Heterorhabditis indica*, düşük sıcaklıkları tolere edememiş ve 5°C'de 10 gün sonra hayatta kalma oranı %40'ın altında kalmıştır. IJ ve taşıyıcıların oranları (1:0.8-1:1.2) tüm nematod türlerinin hayatta kalma oranını önemli ölçüde etkilememiştir. Vermikülit formülasyonuna %0.1 ve %0.2 konsantrasyonlarında Proxel GXL fungisidi eklenmesi, iki *Heterorhabditis* türünün hayatta kalma oranını artırmıştır. *Heterorhabditis bacteriophora* ve *H. indica*, havalandırılmış suda %90 IJ hayatta kalma oranı ile sırasıyla 60 ve 40 gün boyunca 15°C'de saklanabilmiştir. Test edilen formülasyonlar, %80'den fazla IJ hayatta kalma oranına sahip formülasyonlardan elde edilen IJ'lerin enfektivitesini önemli ölçüde etkilememiştir. Bu sonuçlar, bu faydalı nematodların ticari depolanması için alternatif formülasyon yöntemleri sunabilmektedir.

NanGong vd. (2021) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *S. carpocapsae* HB310'un dayanıklı bir kapsül formülasyonu ile uzun süreli depolama ve etkili uygulama için uygunluğunu araştırmışlardır. *Steinernema carpocapsae* HB310, daha önce *Agrotis ipsilon* Hufnagel (Lepidoptera: *Noctuidae*) dahil birçok zararlıya karşı yüksek virülans göstermişti, ancak dayanıklı formülasyonların olmaması nedeniyle büyük ölçekli tarımda kullanımı sınırlı kalmıştır. Araştırmada, "Kapsül-C" adı verilen geliştirilmiş bir EPN kapsül formülasyonu geliştirilmiştir. Çözüm I: %18 gliserol, %0,075 formaldehit, %1

sodyum aljinat, %0,2 ksantan sakızı, %0,5 potasyum sorbat, %9 glikoz, %2 fruktoz, %2 sakaroz ve geri kalanı damıtılmış su içerir. Nematod süspansiyonu aljinat karışımına 2 x 10^6 IJs/mililitre (mL) olarak eklenmiştir. Çözüm II: %18 gliserol, %0,075 formaldehit, %0,5 kalsiyum klorür, %0,5 potasyum sorbat ve geri kalanı damıtılmış su içerir. 16°C'de ve %100 bağıl nemde 180 gün depolamanın ardından, Kapsül-C'deki nematodların hayatta kalma oranı %75,68 ± 0,48 ve nematodlar, *G. mellonella*'nın 5. dönem larvalarında %82,33 ± 1,45 ölüm oranına neden olmuştur. *A. ipsilon* larvaları, glikoz bileşiğinin eklenmesi nedeniyle Kapsül-C'yi çiğnemeyi ve yemeyi tercih etmiş, 24 saat içinde beslenme oranı %100'e ulaşmış ve larva ölümü %90,48 ± 6,35 olarak gerçekleşmiştir. EPN içeren kapsüller, *A. ipsilon*'u öldürmede su solüsyonuna püskürtülen EPN'ler kadar etkili bulunmuştur. Bu sonuçlar, istikrarlı ve etkili bir EPN kapsül formülasyonu elde etmek için fikirler sağlayacak ve çevre dostu biyolojik pestisitlerin uygulanmasını daha da teşvik edebilecektir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Ticari Ürünler

Türkiye'de ruhsatlı 3 farklı EPN türü bulunmaktadır. Bu ruhsatlar, 3 farklı firmanın ithal ürünleridir ve toplam 7 biyolojik mücadele ürünü olarak kullanılmaktadır. Çalışmada kullanılan ürünlerin temini: 3 farklı EPN ürünü, her üründen 500'şer milyon olmak üzere ithalatçı firma Bioglobal A.Ş. den 3 farklı partiden 3 kez toplam 9 ürün sipariş edilmiştir. Ürünler üretici firma tarafından soğuk buz kalıpları ile kolilenip uçak ile Türkiye'ye gönderilmektedir. Ürünler 500 milyon, 250 milyon veya 50 milyon paket seçenekleri ile paketlenebilmektedir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Yurt dışından gelen ürünlerin görünümü

Her nematod türünün kendine özgü kullanım alanları ve ruhsatlandırmaları mevcuttur;

- *S. feltiae*:
  Kültür mantarında Mantar sineği (*Lycoriella* spp.) ile mücadelede ruhsatlıdır. Süs bitkilerinde Çiçek tripsi (*Frankliniella occidentalis*) ile mücadelede ruhsatlıdır. Biber seralarında da Çiçek tripsi (*F. occidentalis*) ile mücadelede ruhsatlıdır (Şekil 3.2).

- *H. bacteriophora*:

  Bağda Bağ maymuncukları (*Otiorhynchus* spp.) ile mücadelede ruhsatlıdır. Elma, fındık, çim, çilek ve süs bitkilerinde Mayıs böceği (*Melolontha melolontha*) ve Haziran böceği (*Polyphylla fullo*) böceklerine karşı ruhsatlıdır.
- *S. carpocapsae*:

  Antep fıstığı, badem, kiraz, kayısı, şeftali, erik ve elma ağaçlarında Dip kurtları (*Capnodis* spp.) için ruhsatlandırılmıştır.



Şekil 3.2. Biber de trips mücadelesine uygulanacak *S. feltiae* ürünleri

Ürün formülasyonunun diatom toprağı içerdiği bilinmektedir. Ürünlerin nem içeriklerinin belirlenmesi için gravimetrik yöntem kullanılmıştır. Gravimetrik yöntemde, numune önce tartılmış ve sonra 105 °C'de 24 saat kurutulmuştur. Kurutulduktan sonra tekrar tartılmış ve nem oranı aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır (Şekil 3.3):

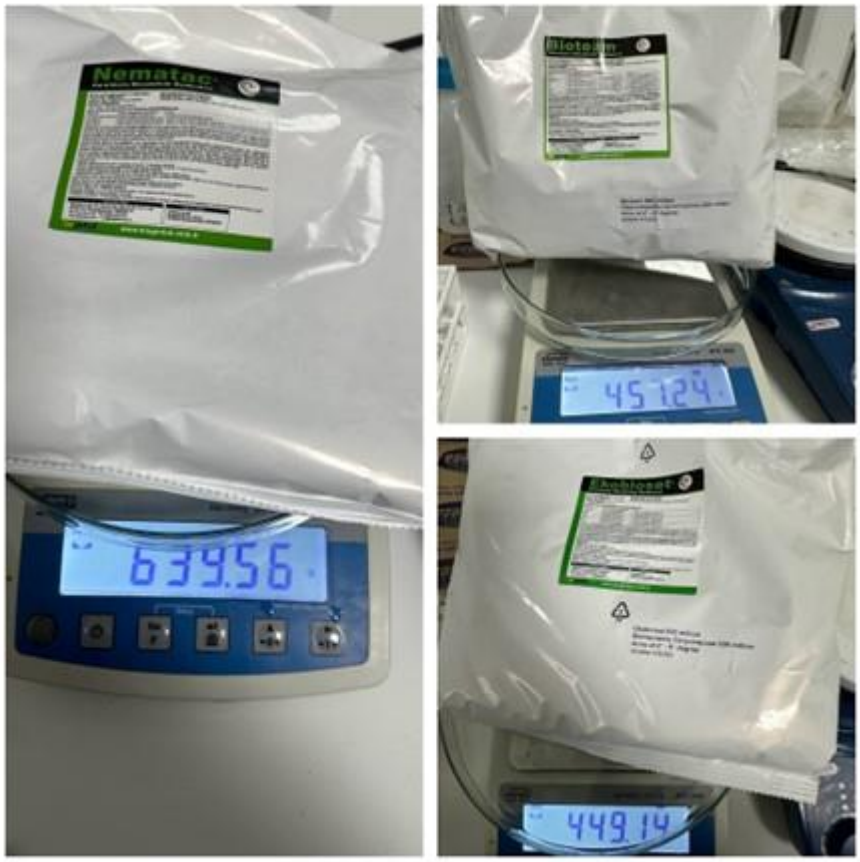
- Nem Oranı (%) = ((Islak Numunenin Ağırlığı- Kuru Numunenin Ağırlığı) / Islak Numunenin Ağırlığı) x 100

- ((1000-591) /1000) *100 = 0.409 * 100 = % 40.9 (ekobioset)
- ((1000-586) /1000) *100 = 0.414 * 100 = % 41.4 (bioteam)
- ((1000-573) /1000) *100 = 0.427 * 100 = % 42.7 (nematac)



Şekil 3.3. Ürünlerin nem tayini çalışması

Çalışmada kullanılan her ürün 500 milyon nematod içermekte, ancak ürün ağırlıkları farklılık göstermektedir. 449 g Ekobioset, 457 g Bioteam, 639 g Nematac (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Ürünlerin paket ağırlıkları

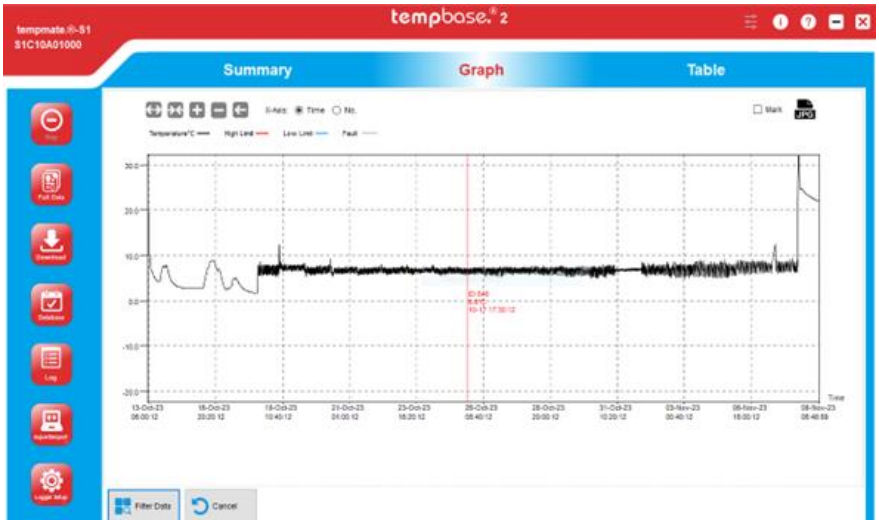
Ürünler mikroskop altında sayılarak canlılıkları kontrol edilmektedir. Ürünler formüle edilmiş özel poşetlerde hava geçirgen şekilde saklanmaktadır. Üretici firmanın beyanına göre ürünler 4-12°C arasında depolanmaktadır. Ürünlerin bekletildiği raflar özel malzeme ve boya ile kaplanmıştır, ürünlerin raf materyaline yapışmaması ve etkileşimde bulunmaması sağlanmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. 6,9 °C'lik soğuk odadaözel raflarda kargolanmaya hazır ürünler.

- Kargolama işlemleri; Ürünler buz kalıpları ile kargolanmaktadır. Uygun depolama koşullarında muhafaza edilmektedir.

- Son Kullanma Tarihi; Üretici firmanın verdiği süreye göre ürünlerin (Nematac, Bioteam, Ekobioset) son kullanma tarihi üretimden itibaren 45 gündür. 45 gün sonra ürün içeriğinde bozulma görülebilir. Farklı formülasyonda 90 güne kadar canlı kalabildiği söylenmektedir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Dataloggerdan alınan anlık sıcaklık verileri

3.2. *Galleria mellonella* Larvalarının Üretimi ve Beslenmesi

Bu araştırmada, arı kovanlarında ciddi zarara neden olan Petek Güvesi veya Büyük Balmumu Güvesi olarak bilinen *Galleria mellonella* L.'nın (Lepidoptera: *Pyralidae*) son dönem larvaları canlı materyal olarak kullanılmıştır. Laboratuvar koşullarında yapay diyetlerle kolayca yetiştirilebilmesi, yüksek üreme potansiyeline sahip olması ve EPN'lere karşı hassas olması gibi nedenlerden dolayı, *in vivo* üretimde en yaygın tercih edilen konukçu olmaktadırlar (Kaya ve Stock, 1997; Shapiro-Ilan ve Gaugler, 2002) (Şekil 3.7.).

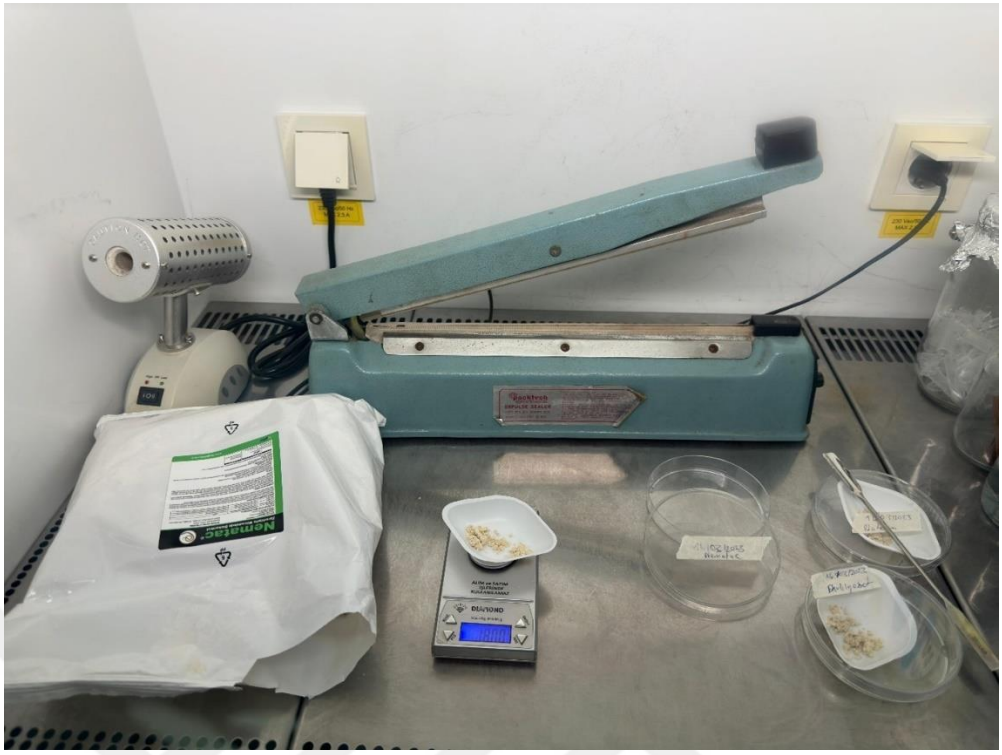
Larvaların beslendiği yapay yem, 200 gram (g) bal, 200 g gliserin, 200 g kepek, 150 g mısır unu, 100 g soya unu, 100 g süt tozu ve 50 g maya içermektedir (Wiesner, 1993). Öncelikle, kepek, mısır unu, soya unu ve süt tozu büyük bir kapta karıştırılmıştır. Daha sonra 200 ºC'ye ulaşan bir hot-plate üzerindeki tencereye gliserin ve bal eklenerek karıştırılmış ve kaynamaya bırakılmıştır. Kaynadıktan sonra maya eklenerek iyice eriyene kadar karıştırılmış ve köpürmesi sağlanmıştır. Ardından diğer malzemeler yavaşça eklenerek karıştırılmış ve besin hazır olması için soğumaya bırakılmıştır. Cam kavanozlara hazırlanan yapay yemden bir miktar konulmuş ve üzerine *G. mellonella* yumurtalarının bulunduğu filtre kağıdı dikkatlice yerleştirilmiştir. Cam kavanozların üstü delikli tel örtüyle kapatılarak, 30±2 ºC'lik bir etüv içine yerleştirilmiştir. Yumurtaların çıkmasından sonra ortamdaki yemle beslenen larvalar, yaklaşık 4 hafta içinde olgun larva haline gelmektedirler. Elde edilen larvalar, EPN üretmek amacıyla ayrı kültürlere alınmıştır. Üretimin sürdürülebilirliği açısından, bazı larvaların pupa haline geçmesine ve ardından ergin döneme ulaşmasına izin verilerek yumurta bırakmaları sağlanmıştır (Şekil 3.1 C). *Galleria mellonella* türünün yumurta bırakması için belirlenen optimum sıcaklık 30°C olarak bildirilmiş olup, düşük sıcaklıklarda dişilerin metabolizmasının tam potansiyeline ulaşamayacakları bir hızda yavaşladığı görülmüştür. Daha yüksek sıcaklıklarda ise, özellikle 40°C'de dişilerin potansiyellerine ulaşmadan önce öldüğü tespit edilmiştir (Campbell ve ark., 1975).



Şekil 3.7. Son dönem *G. mellonella* larvaları

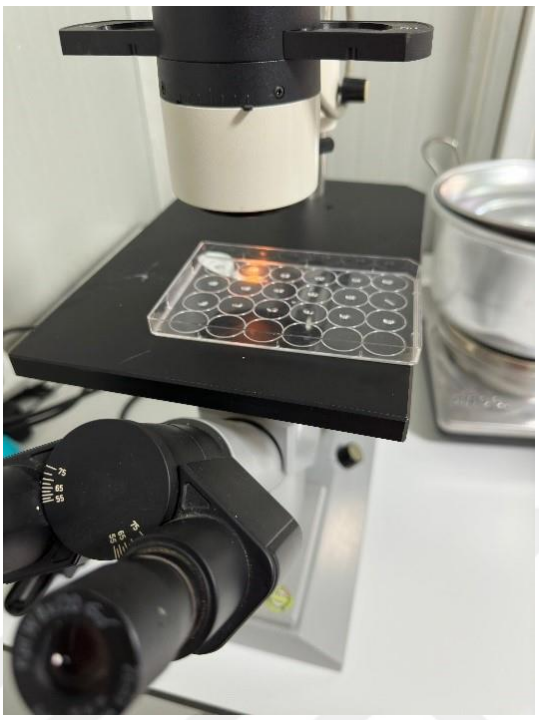
3.3. Ticari Ürünlerin Ölü Canlı Miktarının Belirlenmesi

Ürünler farklı ağırlıklarda paketlerde sunulmaktadır: 449g Ekobioset (*S. carpocapsae*), 457g Bioteam (*H. bacteriophora*), 639g Nematac (*S. feltiae*). Paket 8-12 ℃ soğuk hava deposunda muhafaza edilmiştir. Ürün steril kabin içerisinde açılıp örnek alınıp tekrar steril kabin içerisinde kapatıcı ile kapatılmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Steril kabin içerisinde örnek alma ve paket kapatma işlemi

Her açılan ürün için 3 adet 0,05g ürün hassas terazi ile tartılarak örnek alınmıştır. Örnek 20 ml su ile sulandırıldıktan sonra hareketsiz soğuk olan nematodlar oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Karışım homojen hale gelene kadar manyetik karıştırıcı ile düşük devirde karıştırılmıştır. Hazırlanan solüsyondan manyetik karıştırıcı karıştırılır iken 6 defa mikro pipet yardımı ile 20 mikrolitre (µl) çekilmiştir. Her çekim sonrası sayım işlemi gerçekleştirildi. Toplamda üç farklı üründen üçer adet örnek alınmıştır. Her bir üründen alınan örnekler dokuz adet beher içine konuldu ve her beherden altışar örnek alınarak sayım kabında sayım gerçekleştirildi. Canlı ve ölü olan nematodlar sayılmıştır. Detaylı incelemeler Motic BA210LED® marka mikroskop ile 40x de MotiCams12® kamera aparatı ile gerçekleştirildi (Şekil 3.9) (Şekil 3.10).



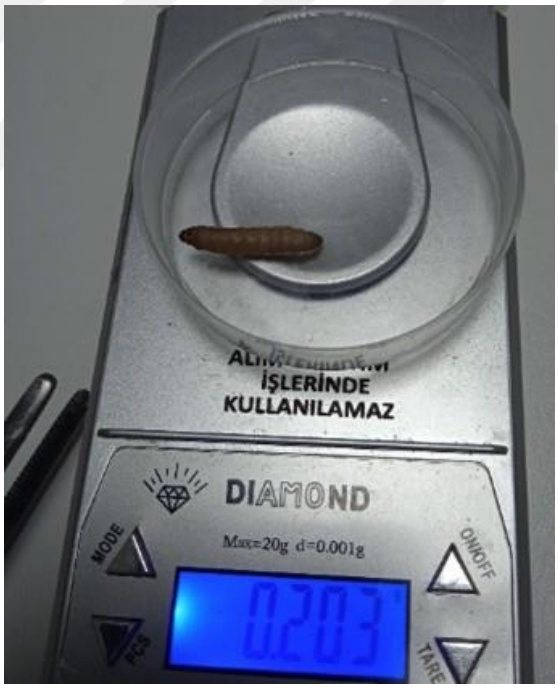
Şekil 3.9. Mikroskop üzerinde nematod ölü canlı sayımı



Şekil 3.10. Mikroskopta ölü canlı nematodların 10x büyütmedeki görüntüsü

3.4. Ticari Ürünlerden Elde Edilen Canlı Nematodların Larvalar Üzerinde Enfeksiyonu

Her nematod türü için son kullanma tarihine 20 gün kala ürünün canlılığının yüksek olduğu tahmin edilen 25. gün ve tavsiye edilen kullanma tarihi bitmesini takip eden 10. günün sonunda yani 55. günlerde alınan örneklerden 3 er tekrarlı olacak şekilde her deneme grubu için 10 adet larva kullanılarak farklı iki dozda (10 IJ ve 50 IJ) enfeksiyon yapılmıştır. 24'lü kuyucuklar içerisine, Ringer solüsyonu ile %30 nemlendirilen steril toprak doldurulmuştur. Devamında aynı büyüklüklerde, aynı ağırlıklara yakın, aynı dönem*G. mellonella* larvaları kuyucuklara yerleştirilmiş ve (Şekil 3.11) üzerlerine mikropipet yardımıyla EPN'ler larva başına canlı 10IJ ve 50 IJ dozunda uygulama yapıldı.



Şekil 3.11. *Galleria mellonella* larvalarının hassas terazide tartımı

Takip eden günlerde her deneme için 10 adet larvanın ölümleri kontrol edilerek, EPN'lerin öldürme potansiyelleri not edildi. Enfeksiyondan itibaren ilerleyen sürede 72 saat beklenerek nematodlardan ölen larvalar incelendi. Nematodun enfekte edildiği düşünülen larvalar White Trap (White, 1927) (Şekil 3.12) düzeneğine alındı (Şekil 3.13).



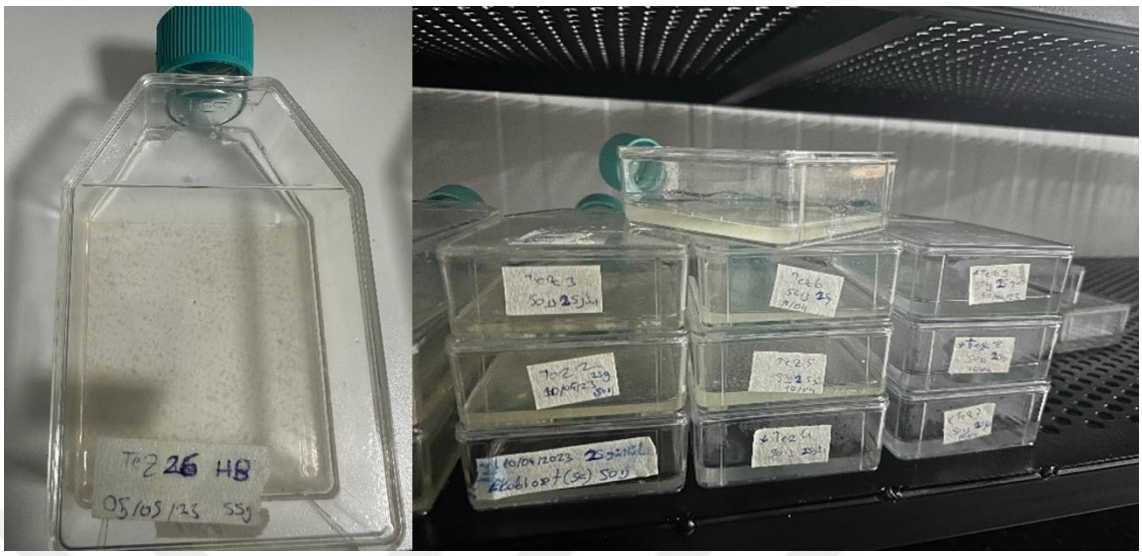
Şekil 3.12. White Trap düzeneğindeki *G. mellonella* larvaları



Şekil 3.13. White Trap düzeneğindeki *H. bacteriophora* ile enfekte olmuş *G. mellonella* larvaları

3.6. İnkübasyon Sonrası Üretilen EPN'lerin Sayımı

Ölü larvalar White Trap olarak adlandırılan; Ringer solüsyonu (9.0 g NaCl, 0.42 g KCl, 0.37 g $CaCl_2$ * 2 H_2O, 0.2 g $NaHCO_3$, 1 Litre (L) distile su) içeren çapı 10 santimetre (cm) olan bir petri kabında tutulan ters bir çapı 6 cm petri kabı kapağındaki emici bir substrat yüzeyinin (nemli filtre kâğıdı) üzerine kadavralar alınmıştır. Kullanılan Ringer solüsyonu kültürlerin bulaşma olmasını veya saprofit mikroorganizma gelişmesini engellemektedir. Uygulamadan sonraki 2 hafta içerisinde kadavradan dışarıya çıkan IJ'ler, White Trap içerisindeki petri kabını çevreleyen Ringer solüsyonuna geçiş yapmakta ve burada birikmektedirler. Daha sonra IJ'ler buradan mikropipet yardımıyla toplanmakta belirlenen su miktarına koyulmakta örnekler alınarak üreyen nematod miktarı sayılarak depolanmak için tekrardan içerisinde Ringer solüsyonu bulunan, oksijen giriş çıkışı olan kültür kapları içerisine aktarılmaktadır. Bu kaplar +4 ºC'de buzdolabında muhafaza edilmektedirler (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. +4 ºC'de buzdolabında muhafaza edilen EPN'ler.

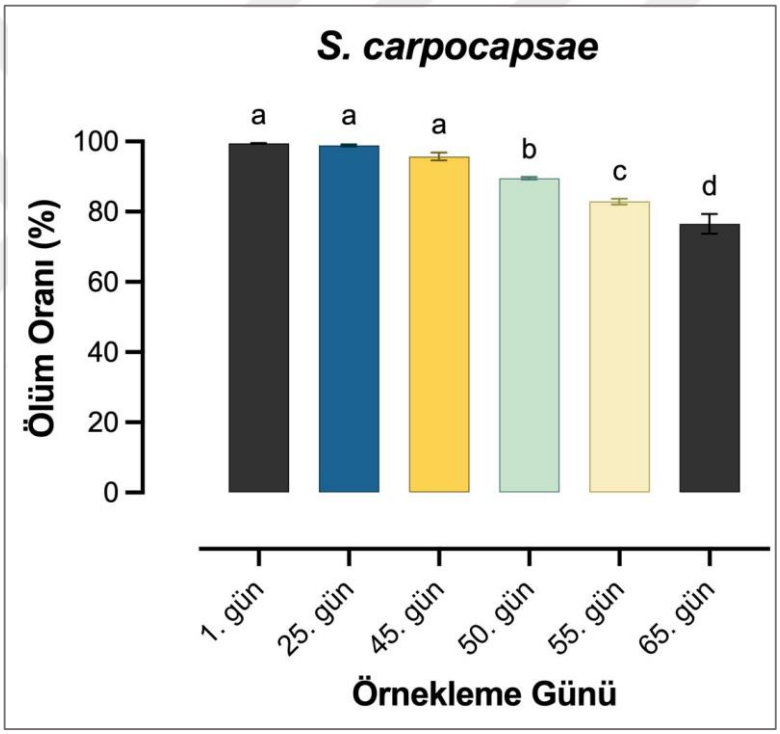
3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizlerin öncesinde tüm verilerin varyans dağılımlarının homojen olup olmadığı ve normal dağılım gösterip göstermediği incelenmiştir. Varyansların dağılımında verilerin uygunluğuna göre Bartlett ya da Brown-Forsythe testleri, normalitenin belirlenmesinde ise Shapiro-Wilk testi kullanılmıştır. Tez çalışması kapsamında elde edilen tüm veriler homojen varyansa sahip olup normalite testlerini geçmiştir. Aynı denemede her bir EPN türü için farklı örnekleme günlerinin karşılaştırmasında örneklemelerin birbiri ile bağımlı olması sebebiyle tekrarlı (repeated measures) ANOVA ve gruplar arasındaki farkların belirlenmesinde ise Tukey HSD testi kullanılmıştır. Etkinlik denemelerinde her bir doz ve örnekleme günü için EPN türlerinin etkinliklerinin karşılaştırılmasında ANOVA testi ve gruplar arasındaki farkların belirlenmesinde Tukey HSD testi kullanılmıştır. Aynı denemede her bir EPN türünün her bir dozu için 25. ve 55. gündeki üreme kapasitelerinin karşılaştırılmasında ise ilişkili (bağımlı) t testi kullanılmıştır. Tüm analizler %5 seviyesinde gerçekleştirilmiş ve grafiklerin oluşturulmasında GraphPad Prism v10 yazılımı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

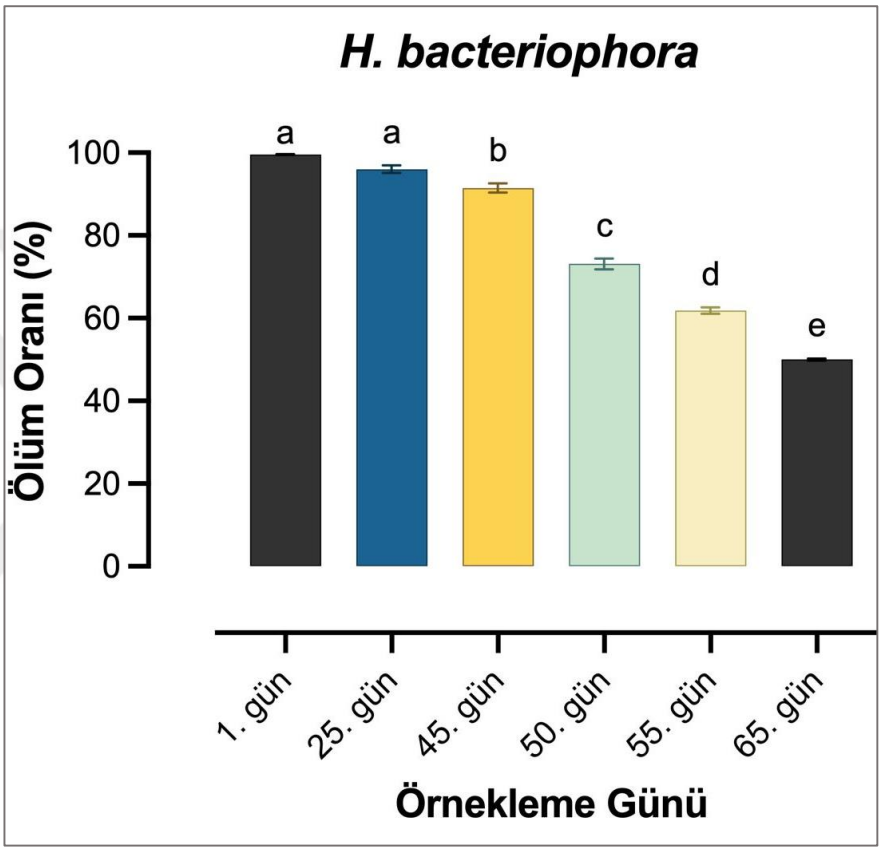
4.1. Ticari Ürünlerin Canlılıklarının Belirlenmesi

Elde edilen veriler sonucunda Ekobioset (*S. carpocapsae*) ürününde en yüksek canlılık oranı 1. günde % 99.47 olarak belirlenmiştir. En düşük canlılık oranı ise bu ürün için 65. Günde %76.55 olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilmiştir ($F(5, 10) = 60.3$; $p<0.0001$) (Şekil 4.1).



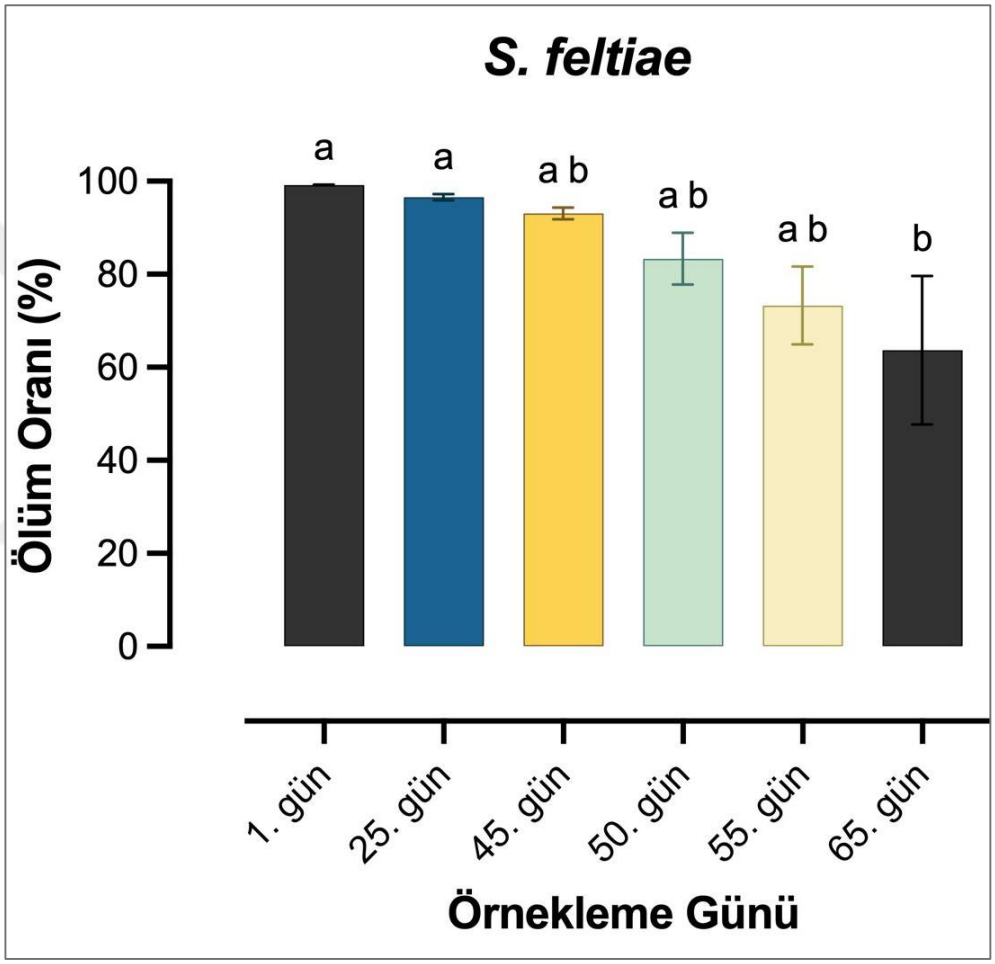
Şekil 4.1. Ekobioset (*S. carpocapsae*) ürünün günlere göre canlılık yüzdeleri

Elde edilen veriler sonucunda Bioteam (*H. bacteriophora*) ürününde en yüksek canlılık oranı 1. günde %99.57 olarak belirlenmiştir. En düşük canlılık oranı ise bu ürün için 65. günde %50 olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilmiştir ($F(5, 10) = 764$; $p<0.0001$) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Bioteam (*H. bacteriophora*) ürünün günlere göre canlılık yüzdeleri

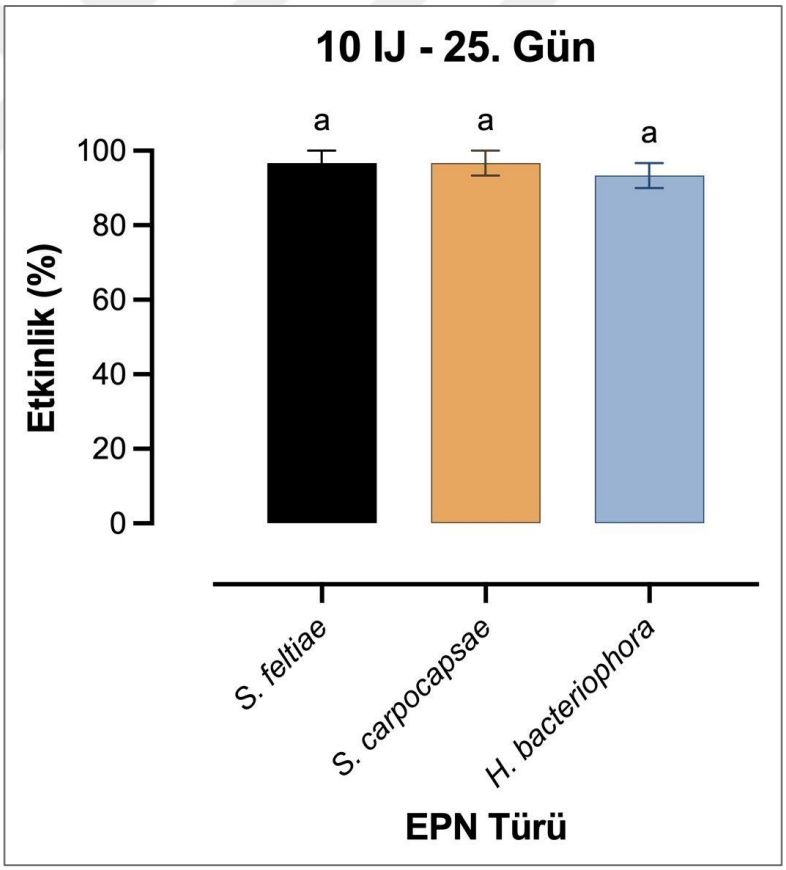
Elde edilen veriler sonucunda Nematac (*S. feltiae*) ürününde en yüksek canlılık oranı 1. günde %99.22 olarak belirlenmiştir. En düşük canlılık oranı ise bu ürün için 65. günde %63.68 olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilmiştir ($F(5, 10) = 5.15$; $p<0.0001$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Nematac (*S. feltiae*) ürünün günlere göre canlılık yüzdeleri

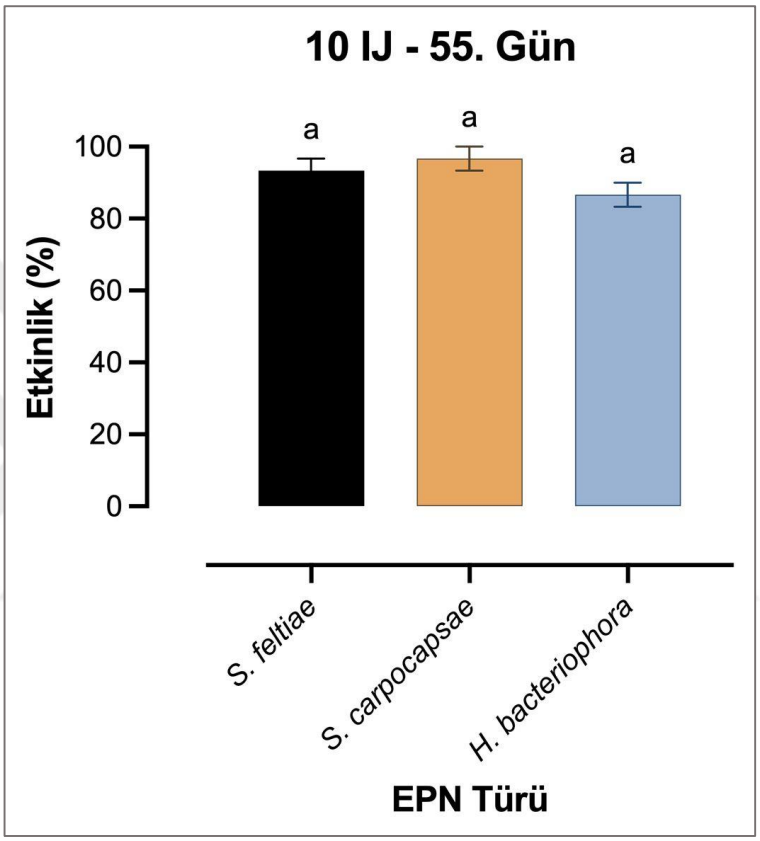
4.2. Ticari Ürünlerden Elde Edilen Canlı Nematodların Larvalar Üzerinde Enfeksiyonunun Değerlendirilmesi

Ekobioset (*S. carpocapsae*), Bioteam (*H. bacteriophora*), Nematac (*S. feltiae*) ticari ürünleri için 25. gün ve 55. günlerde alınan örneklerden *G. mellonella* larvaları üzerinde enfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Ekobioset (*S. carpocapsae*) için 10 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 25. günde *G. mellonella* larvaları üzerinde elde edilen ölüm oranları ortalamaları %96.66 olarak belirlenmiştir. Bioteam (*H. bacteriophora*) ve Nematac (*S. feltiae*) için bu değerler sırasıyla %93.66 ve %96.66 olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilememiştir (F (2, 6) = 0.33; p=0.7290) (Şekil 4.4).



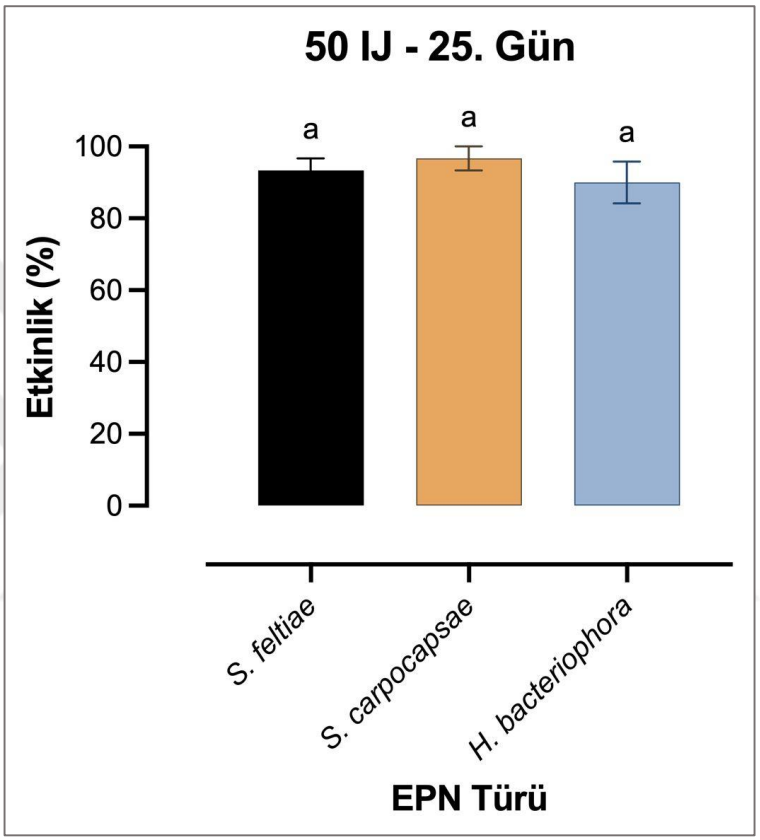
Şekil 4.4. 10 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 25. günde ürünlerin *G. mellonella* larvaları üzerindeki etkinleri

Elde edilen sonuçlara göre Ekobioset (*S. carpocapsae*) için 10 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 55. günde *G. mellonella* larvaları üzerinde elde edilen ölüm oranları ortalama %96.66 olarak belirlenmiştir. Bioteam (*H. bacteriophora*) ve Nematac (*S. feltiae*) için bu değerler sırasıyla %86.66 ve %93.33 olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilememiştir (F (2, 6) = 2.33; p=0.1780) (Şekil 4.5).



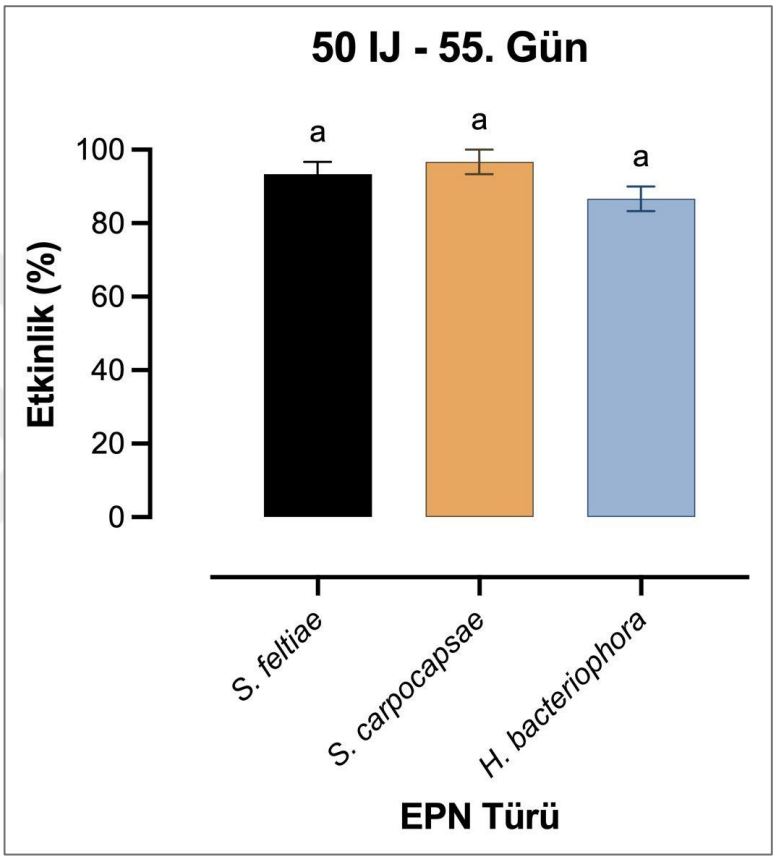
Şekil 4.5. 10 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 55. günde ürünlerin *G. mellonella* larvaları üzerindeki etkinleri

Elde edilen sonuçlara göre Ekobioset (*S. carpocapsae*) için 50 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 25. günde *G. mellonella* larvaları üzerinde elde edilen ölüm oranları ortalama %96.66 olarak belirlenmiştir. Bioteam (*H. bacteriophora*) ve Nematac (*S. feltiae*) için bu değerler sırasıyla %90 ve %93.33 olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilememiştir (F (2, 6) = 0.60; p=0.5787) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. 50 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 25. günde ürünlerin *G. mellonella* larvaları üzerindeki etkinleri

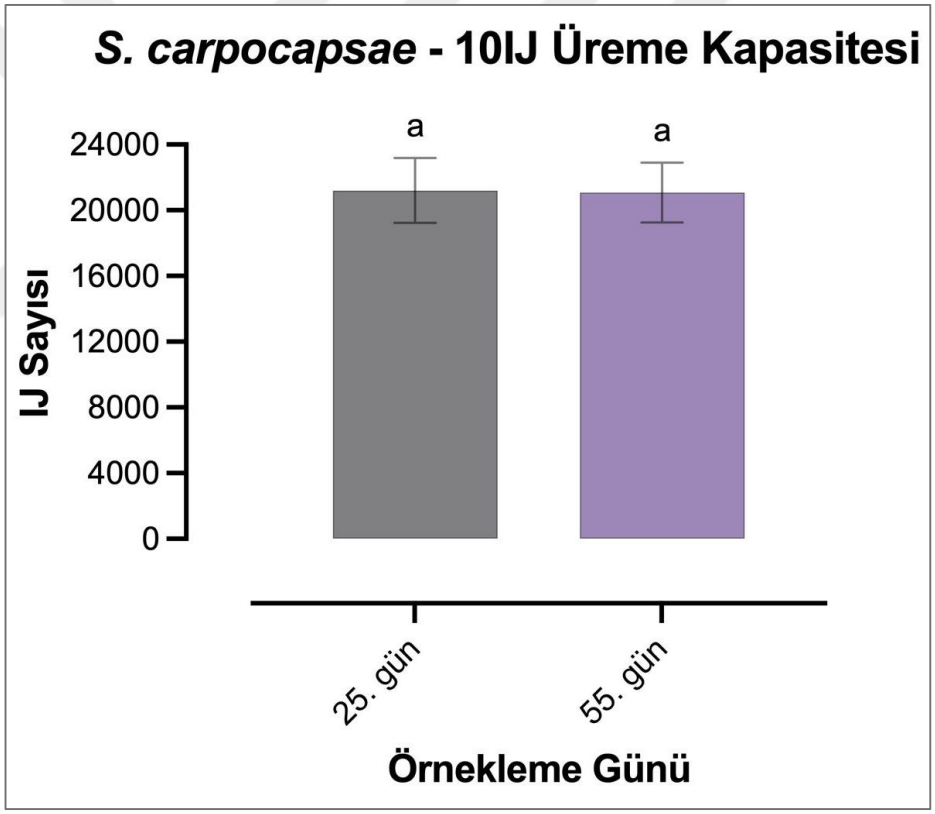
Elde edilen sonuçlara göre Ekobioset (*S. carpocapsae*) için 50 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 55. günde *G. mellonella* larvaları üzerinde elde edilen ölüm oranları ortalama %96.66 olarak belirlenmiştir. Bioteam (*H. bacteriophora*) ve Nematac (*S. feltiae*) için bu değerler sırasıyla %86.66 ve %93.33 olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilememiştir (F (2, 6) = 2.33; p=0.1780) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. 50 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 55. günde ürünlerin *G. mellonella* larvaları üzerindeki etkinleri

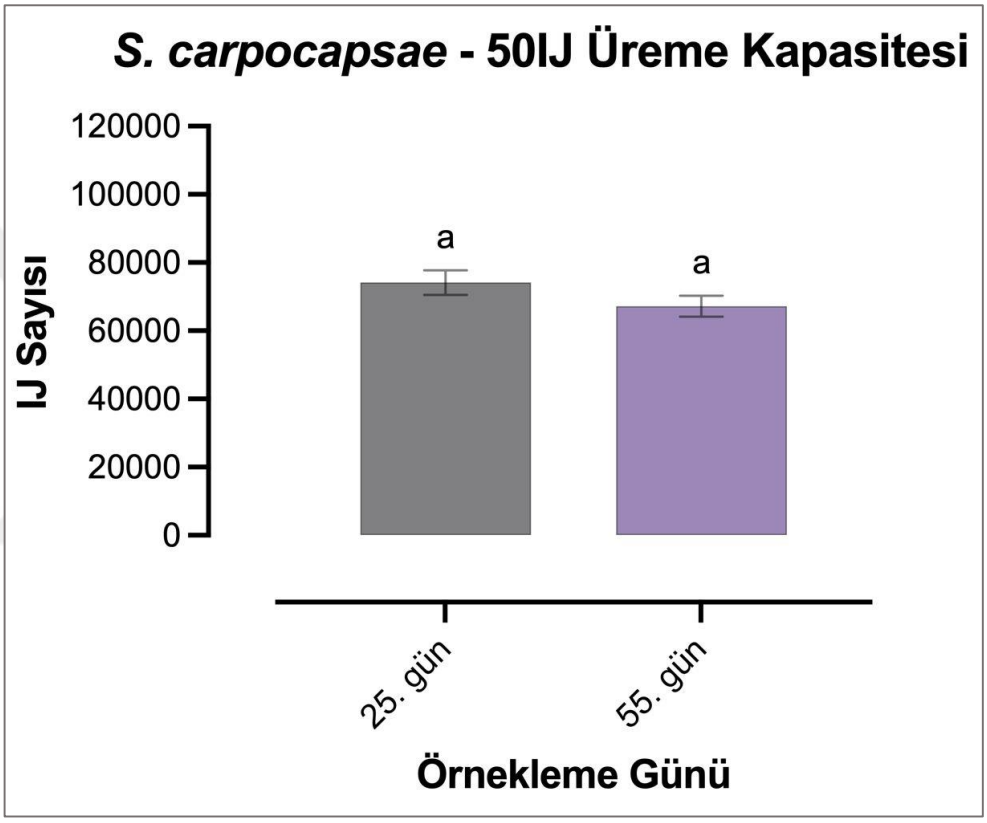
4.3. Üreme Güçlerinin Belirlenmesi

Ekobioset (*S. carpocapsae*), Bioteam (*H. bacteriophora*), Nematac (*S. feltiae*) ticari ürünleri için 25. gün ve 55. günlerde alınan örneklerden *G. mellonella* larvaları üzerinde enfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Enfeksiyon sonrasında üreme gücü belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Ekobioset (*S. carpocapsae*) için 10 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyon sonucunda 25. gün için üreme gücü ortalama 21201.33 IJ olarak 55. gün içinse bu değer ortalama 21082.4 IJ olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilememiştir (t = 0.03; df=9; p=0.9692) (Şekil 4.8).



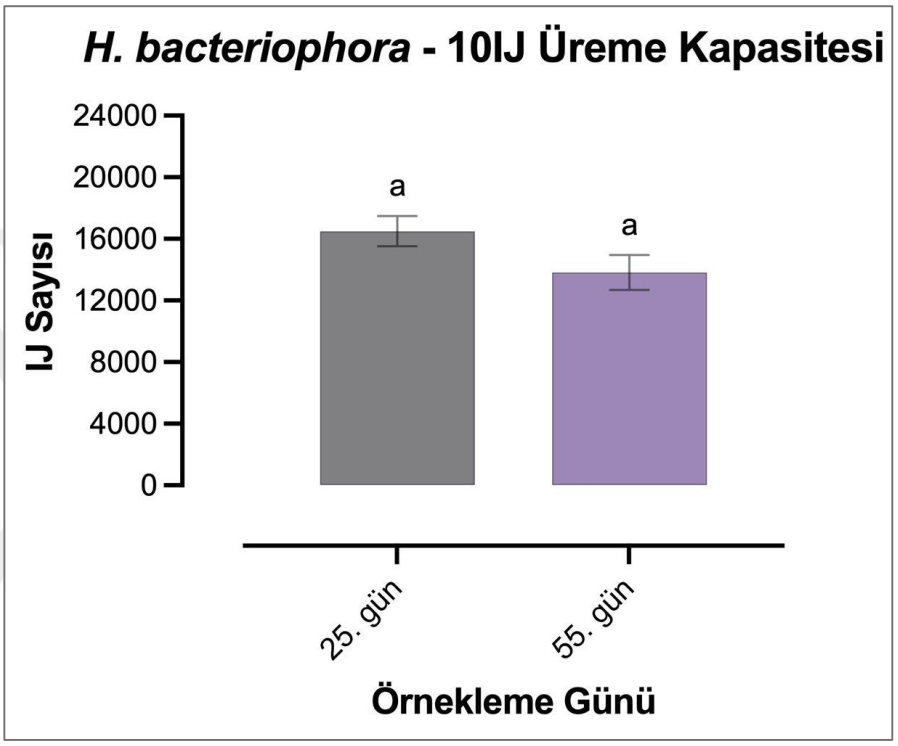
Şekil 4.8. 10 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 25. ve 55. günde ürünlerin *G. mellonella* larvaları üzerindeki üreme güçlerinin grafiği

Elde edilen sonuçlara göre Ekobioset (*S. carpocapsae*) için 50 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyon sonucunda 25. gün için üreme gücü ortalama 74134.2 IJ olarak 55. gün içinse bu değer ortalama 67209.2 IJ olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilememiştir (t = 1.94; df=9; p=0.0844) (Şekil 4.9).



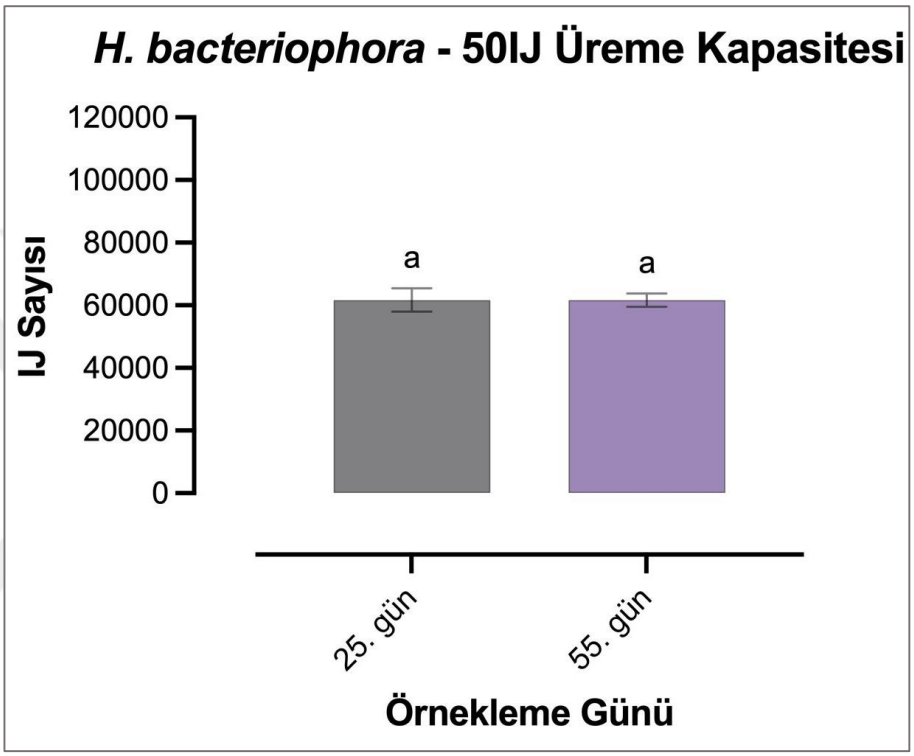
Şekil 4.9. 50 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 25. ve 55. günde ürünlerin *G. mellonella* larvaları üzerindeki üreme güçlerinin grafiği

Elde edilen sonuçlara göre Bioteam (*H. bacteriophora*), için 10 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyon sonucunda 25. gün için üreme gücü ortalama 16504.1 IJ olarak 55. gün içinse bu değer ortalama 13824.5 IJ olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilememiştir (t = 1.62; df=9; p=0.1389) (Şekil 4.10).



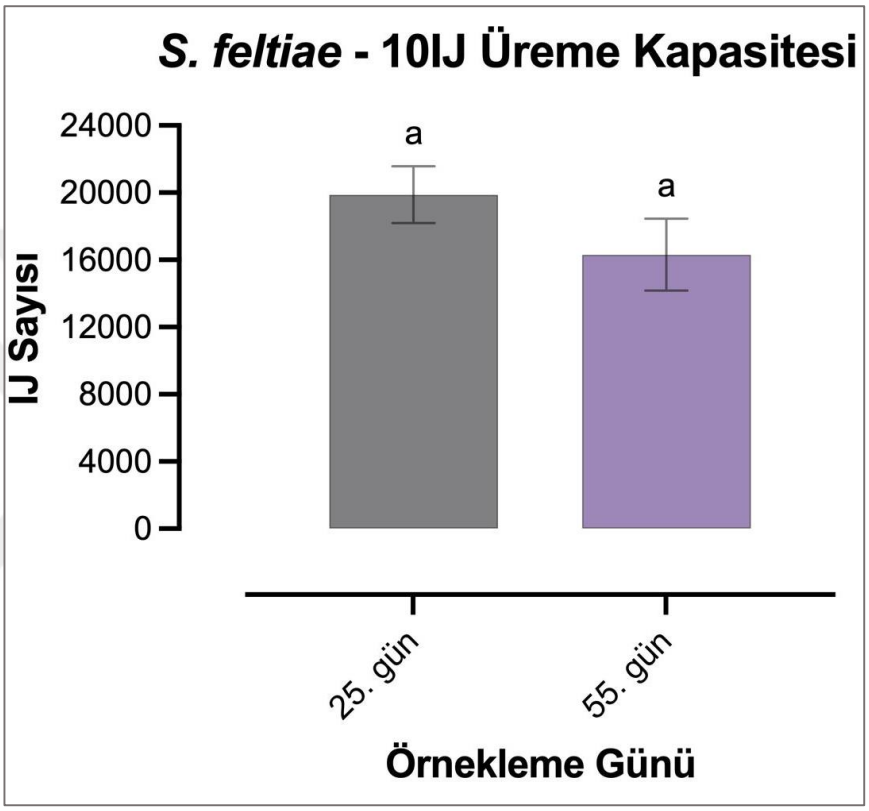
Şekil 4.10. 10 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 25. ve 55. günde ürünlerin *G. mellonella* larvaları üzerindeki üreme güçlerinin grafiği

Bioteam (*H. bacteriophora*), için 50 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyon sonucunda 25. gün için üreme gücü ortalama 61682.3 IJ olarak 55. gün içinse bu değer ortalama 61635 IJ olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilememiştir (t = 0.01; df=9; p=0.9889) (Şekil 4.11).



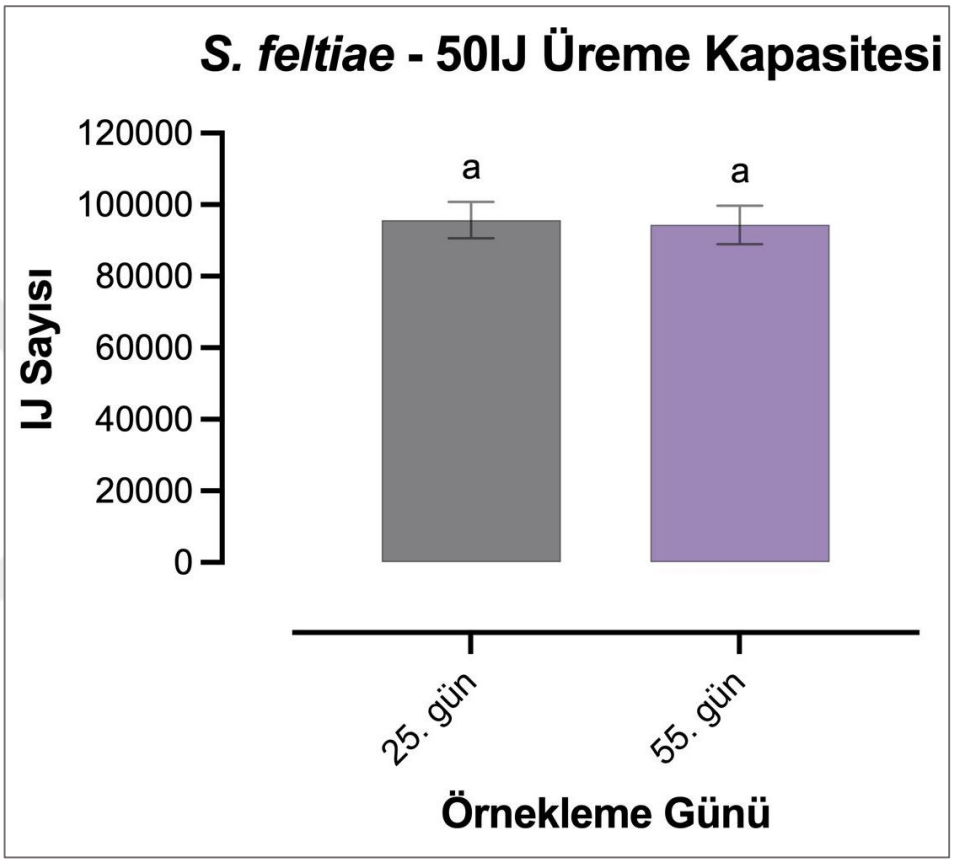
Şekil 4.11. 50 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 25. ve 55. günde ürünlerin *G. mellonella* larvaları üzerindeki üreme güçlerinin **(± standart hata)** grafiği

Elde edilen sonuçlara göre Nematac (*S. feltiae*), için 10 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyon sonucunda 25. gün için üreme gücü ortalama 19878.8 IJ olarak 55. gün içinse bu değer ortalama 16308.2 IJ olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilememiştir (t = 1.20; df=9; p=0.2621) (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. 10 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 25. ve 55. günde ürünlerin *G. mellonella* larvaları üzerindeki üreme güçlerinin grafiği

Nematac (*S. feltiae*), için 50 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyon sonucunda 25. gün için üreme gücü ortalama olarak 95722.3 IJ olarak 55. gün içinse bu değer ortalama 94350.4 IJ olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilememiştir (t = 0.17; df=9; p=0.8635) (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. 50 IJ ile gerçekleştirilen enfeksiyonda 25. ve 55. günde ürünlerin *G. mellonella* larvaları üzerindeki üreme güçlerinin grafiği

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, Ekobioset (*S. carpocapsae*), Bioteam (*H. bacteriophora*), Nematac (*S. feltiae*) ticari ürünlerinin, 1, 25, 45 (Tavsiye Edilen Kullanma Tarihi), 50, 55 ve 65. günlerde canlılıkları, 25 ve 55. günde farklı dozlarda etkinlikleri ve üreme güçlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma, ticari olarak kullanılmakta olan EPN'lerin Tavsiye edilen kullanma tarihi sonrasında bazı canlılık, etkinlik ve üreme gücü gibi fizyolojik faaliyetlerinin belirlenmesi açısından önemli bir adım olmuştur. Elde edilen sonuçlar, EPN'lerin tavsiye edilen kullanma tarihi sonrasında dahi devam eden canlılık, etkinlik ve üreme güçleri potansiyellerini açıkça sunmaktadır.

Yapılan çalışmanın sonuçlarında, çalışmada kullanılan tüm ürünlerin 45. güne (Tavsiye edilen tüketim tarihi) kadar canlılık açısından oldukça dayanıklı olduklarını göstermiştir. Bu çalışmaya benzer şekilde, Eliceche vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada da *H. bacteriophora* türlerinin uzun süre depolanması sonucunda canlılıklarının diğer türlere göre daha çabuk kaybettikleri ile ilgili sonuçlar elde etmişlerdir.

Bu çalışmada 25 ve 55. günde farklı dozlarda etkinlikleri üzerinde yapılan çalışma sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilmemiştir. Tüm türler için konukçu üzerinde oldukça yüksek oranda ölüm oranları elde edilmiştir. Benzer bir şekilde Bütüner vd. (2023) tarafından farklı sıcaklıklarda uzun süre depolanan izolatlar sonrasında *T. molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) üzerinde etkinlikleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, aynı sıcaklık için bazı izolatlar arasında aynı dozda ölüm oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar bulunmamaktadır. Bu yönüyle yapılan çalışma bu çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmada 25 ve 55. günde farklı dozlarda üreme güçlerinin elde edilmesi üzerinde yapılan çalışma sonucunda türler içerisinde farklı günlerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilmemiştir. Bütüner ve Susurluk (2023b) tarafından gerçekleştirilmiş olan çalışmada *H. bacteriophora* HBH Hibrit Irkının farklı sıcaklıklarda depolanması sonrasında üreme gücü gibi bazı fizyolojik özellikleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre farklı sıcaklıklarda farklı günlerde depolanan Hibrit Irk da üreme güçleri belirlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Bu yönüyle çalışmadaki sonuçlar ile örtüşmemektedir. Bunun ise *H. bacteriophora* Hibrit Irkının Türkiye koşullarına uyum sağlamış üstün bir ırk olarak tescillenmesi sebebiyle olduğu düşünülmektedir.

Shapiro-Ilan vd. (2006) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, topraktaki 11 EPN türünü temsil eden 29 ırkın ömrü 42 ila 56 gün arasında karşılaştırılmıştır. Her birinde altı ila sekiz nematod suşu ve bir veya daha fazla nematod ırkı ortak olan beş laboratuvar deneyi serisi gerçekleştirilmiş, böylece deneyler arasında niteliksel karşılaştırmalar yapılabilmiştir. Nematodlar arasında *H. bacteriophora* (dört ırk), *H. indica* (Homl), *H. marelatus* (Point Reyes), *H. megidis* (UK211), *H. mexicana* (MX4), *S. carpocapsae* (sekiz ırk), *S. diaprepesi*, *S. feltiae* (SN), *S. glaseri* (NJ43), *S. rarum* (17C&E) ve *S. riobrave* (dokuz ırk) bulunmuştur. *Steinernema carpocapsae*'de uzun ömürlülük açısından türler arası önemli farklılıklar gözlenmiş ve en yüksek hayatta kalma oranı Sal ırkı tarafından sergilenmiştir. Türler arası tüm karşılaştırmalarda Sal ırkı standart olarak kullanılmıştır. Buna karşılık, *S. riobrave*'de tür içi varyasyon çok az olmuştur. Genel olarak, *S. carpocapsae* (Sal) ve *S. diaprepesi*'nin en yüksek hayatta kalma kapasitesine sahip olduğu tahmin edilmiştir. *H. bacteriophora* (Lewiston), *H. megidis, S. feltiae* ve *S. riobrave*'de (3-3 ve 355) ikinci bir uzun ömür düzeyi gözlemlenmiştir. Diğer *H. bacteriophora* ırkları (Hb, HP88 ve Oswego) ile *S. glaseri* ve *S. rarum*'da daha düşük hayatta kalma seviyeleri gözlenmiştir. *H. indica* ve *H. marelatus* ile *H. mexicana*'da daha düşük ömür süreleri gözlenmiştir. Genel olarak bu çalışma elde edilen sonuçlar benzerlik göstermektedir.

Connick vd. (1994) tarafından yapılan bu çalışmada, EPN'lerin biyolojik mücadele ajanı olarak kullanımı, kısa raf ömürleri nedeniyle olumsuz etkilendiği bildirilmektedir. *Steinernema carpocapsae* nematodlarının "Pesta" granüllerinde 21°C'deki raf ömrü, düşük formaldehit konsantrasyonları eklenerek 8 haftadan 26 haftaya çıkarılmıştır. Farklı formülasyonlar ile hazırlanmış ürünlerin uzun süre depolanması sonrasında etkinlikleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, 21°C'de 20 hafta saklanan nematodlar, balmumu güvesi (*G. mellonella*) larvalarının %100 ölümüne neden olmuştur. Bu yönüyle bu çalışmanın sonuçları mevcut çalışmanın sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Selvan vd. (1993) yaptıkları çalışmada, IJ'lerin sınırlı raf ömrü, EPN tam biyolojik mücadele potansiyelinin gerçekleştirilmesinde büyük bir engel olarak belirtilmiştir. *Heterorhabditis bacteriophora*, *S. carpocapsae* ve *S. glaseri* nematodları, balmumu güvesi *G. mellonella*'nın larvalarında kültürlenmiş ve yeni ortaya çıkan IJ'ler, 25°C'de suda saklanmıştır. Minimum %20 hayatta kalma oranıyla tahmin edilen raf ömrü, türler arasında değişiklik göstermiştir: IJ *S. glaseri* 36 hafta hayatta kalırken, *S. carpocapsae* ve *H. bacteriophora* sırasıyla yalnızca 16 ve 7 hafta hayatta kalmıştır. Bu çalışmanın sonuçları mevcut çalışmanın sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Daha önce yapılan çalışmalar genellikle EPN'lerin farklı izolatları, yerel ırkları ve hibrit ırkların üreme gücü, dayanıklılık ve etkinliklerinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmaları kapsamaktadır. Bu yapılan çalışma ise Türkiye ruhsatlı olan bazı ticari EPN türlerinin, üreme gücü, dayanıklılık ve etkinliklerinin belirlenmesine yönelik bir çalışma olup, mevcut kullanımında oluşabilecek bazı soruları aydınlatacağı ve EPN'lerin daha üzün süre depolanıp kullanım şartlarının geliştirilmesi için raf ömürlerinin uzatılması yeni formülasyonlarının geliştirilmesi konusunda yeni bir sonuç ortaya koymuştur.

KAYNAKLAR

Bonaterra, A., Badosa, E., Daranas, N., Francés, J., Roselló, G., ve Montesinos, E. (2022). Bacteria as biological control agents of plant diseases. *Microorganisms, 10*.

Bosch, R. (1971). Biological control of insects. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 2*, 45-66.

Burnell, A. M., ve Stock, P. A. (2000). Commercialization of entomopathogenic nematodes for biological control: successes and limitations. *Biological Control, 17*(2), 206-219.

Bütüner, A. K., Ergene, E., İlktan, M., Sepin, S., Susurluk, H., ve Susurluk, İ. A. (2024). Impact of some entomopathogenic nematode isolates on the mortality and penetration rate of *Rhyzopertha dominica* and *Tenebrio molitor*. *Crop Protection, 179*, 106629.

Bütüner, A. K., Ilktan, M., ve Susurluk, A. (2023). Effects of storage temperature on viability and virulence of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae), *Steinernema carpocapsae* Weiser, 1955 and *Steinernema feltiae* Filipjev, 1934 (Rhabditida: Steinernematidae). *Turkish Journal of Entomology, 47*(3), 247-257.

Bütüner, A. K., ve Susurluk, A. (2023a). Türk Entomopatojen Nematodların, *Steinernema feltiae* ve *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) Pirinç Biti *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) Üzerinde Patojenisitesi. Türk *Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 10*(3), 541-547.

Bütüner, A. K., ve Susurluk, A. (2023b). Efficiency of temperature and storage duration on some morphological measurements and reproductive capacity of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae)'s Turkish HBH hybrid strain. *Turkish Journal of Entomology, 47*(4), 469-476.

Ciche, T. A., Darby, C., Ehlers, R., Forst, S., ve Goodrich-Blair, H. (2006). Dangerous liaisons: The symbiosis of entomopathogenic nematodes and bacteria. *Biological Control, 38*(1), 22-46.

Connick, W., Nickle, W., Williams, K., ve Vinyard, B. (1994). Granular Formulations of *Steinernema carpocapsae* (strain All) (Nematoda: Rhabditida) with Improved Shelf Life.. *Journal of nematology, 26* (3), 352.

De, A., Bose, R., Kumar, A., ve Mozumdar, S. (2014). Biological control of insect pests. In Sustainable agriculture and food security (pp. 27-28). Springer.

Dede E., Bütüner, A. K., ve Susurluk, A. (2022). Biocontrol potential of *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae) HBH hybrid strain against the beet webworm, *Loxostege sticticalis* L., 1761 (Lepidoptera: Pyralidae). *Turkish Journal of Entomology, 46*(4), 399-405.

Doğan, A. (2023). Entomopatojen nematod heterorhabditis bacteriophora HBH hibrit ırkının in vivo ve in vitro üretim sonrası konukçu arama davranışlarının araştırılması. *Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Yüksek Lisans Tezi.

Ehlers, R. (2001). Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Applied Microbiology and Biotechnology, 56*(5-6), 623-633.

Eliceche, D. P., Rosales, M. N., ve Achinelly, M. F. (2021). Factors affecting the fitness of an entomopathogenic nematode (Heterorhabditis bacteriophora SUP strain) for use in biocontrol in a horticultural area of Argentina. *Nematology, 24*(2), 181-191.

Ertürk, Y. E., Bulak, Y., ve Uludağ, A. (2012). Iğdır İli Tarım İşletmelerinin Zirai Mücadele Uygulamalarında Çevreye Duyarlılıkları. *Journal of History Culture and Art Research, 1*(4), 393-401.

Gaugler, R., ve Kaya, H. (2020). Entomopathogenic nematodes in biological control.

George, Jisna, Gitanjali Devi, and Badal Bhattacharyya. 2022. "Formulation of Entomopathogenic Nematode, Steinernema Kushidai, Their Survival and Infectivity". *International Journal of Plant & Soil Science 34* (9):40-47

Grewal, P. (2000). Enhanced ambient storage stability of an entomopathogenic nematode through anhydrobiosis. *Pest Management Science, 56*, 401-406.

Grewal, P. S. (2000). Enhanced ambient storage stability of an entomopathogenic nematode through anhydrobiosis. *Pest Management Science, 56*(5), 401-406

Grewal, P. S., Ehlers, R. U., ve Shapiro-Ilan, D. I. (2005). Nematodes as biological control agents. *CABI Publishing.*

Grønvold, J. R., Henriksen, S., Larsen, M., Nansen, P., ve Wolstrup, J. (1996). Biological control. Aspects of biological control--with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. *Veterinary Parasitology, 64*(1-2), 47-64.

Günel, H., ve Öztürk, İ. (2011). Bant İlaçlaması ve Direkt İlaçlama Yapan Üniteler ve Kullanım Alanları. *Journal of the Faculty of Agriculture, 38*.

Helmberger, M. S., Shields, E., ve Wickings, K. (2017). Ecology of belowground biological control: Entomopathogenic nematode interactions with soil biota. *Applied Soil Ecology, 121*, 201-213.

Kagimu, N., Ferreira, T., ve Malan, A. (2017). The attributes of survival in the formulation of entomopathogenic nematodes utilised as insect biocontrol agents. *African Entomology, 25*, 275-291.

Kary, N., Woodring, J. L., ve Kaya, H. K. (2018). Calcium-alginate beads as a formulation for the application of entomopathogenic nematodes to control rootworms. *Journal of Pest Science, 94*, 1197-1208.

Kaya, H. K., ve Gaugler, R. (1993). Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology, 38*, 181-206.

Khachatourians, G. (1986). Production and use of biological pest control agents. *Trends in Biotechnology, 4*, 120-124.

Kim, D. H., Lee, S. Y., ve Lee, S. Y. (2011). The status of entomopathogenic nematode production and its application in pest control in Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology, 14*(1), 1-7.

Labaude, S., ve Griffin, C. (2018). Transmission success of entomopathogenic nematodes used in pest control. *Insects, 9*(2), 72.

Lacey, L. A., ve Georgis, R. (2012). Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production. *Journal of Nematology, 44*(2), 218-225.

Lacey, L., ve Georgis, R. (2012). Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production. *Journal of Nematology, 44*(2), 218-225.

NanGong, Z., Li, T., Zhang, W., Song, P., ve Wang, Q. (2021). Capsule-C: an improved Steinernema carpocapsae capsule formulation for controlling *Agrotis ipsilon* Hufnagel (Lepidoptera: Noctuidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control, 31*, 1-10.

Nxitywa, A., ve Malan, A. (2022). Formulation of high concentrations of entomopathogenic nematode in diatomaceous earth. *Biocontrol Science and Technology, 32*, 1107 - 1121.

O'Brien, P. (2017). Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology, 46*, 293-304.

Özdemir, E., ve Bayram, Ş. (2017). Entomopatojen nematodlar ve simbiyotik bakterileri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 10*(1), 6-12.

Rhodes, D. (1993). Formulation of biological control agents. *In D. C. Wilson & G. W. Zehnder (Eds.), *Biological Control of Insects and Mites*, 411-439.

Ruiz-Vega, J., Cortés-Martínez, C., ve García-Gutiérrez, C. (2018). Survival and Infectivity of Entomopathogenic Nematodes Formulated in Sodium Alginate Beads. *Journal of Nematology, 50*, 273 - 280.

Selvan, S., Gaugler, R., ve Grewal, P. (1993). Water content and fatty acid composition of infective juvenile entomopathogenic nematodes during storage. *Journal of Parasitology, 79*, 510-516.

Sethuraman, A., Janzen, F., Weisrock, D., ve Obrycki, J. (2020). Insights from population genomics to enhance and sustain biological control of insect pests. *Insects, 11*.

Shapiro-Ilan, D. I., Hazir, S., ve Glazer, I. (2012). Basic and applied research: entomopathogenic nematodes. In F. E. Vega & H. K. Kaya (Eds.), *Insect Pathology* (2nd ed., pp. 479-517). Academic Press.

Shapiro-Ilan, D. I., Morales-Ramos, J. A., ve Rojas, M. G. (2016). In vivo production of entomopathogenic nematodes. I*n Methods in Molecular Biology* (Vol. 1477, pp. 137-158).

Shapiro-Ilan, D., Lewis, E., Behle, R., ve McGuire, M. (2001). Formulation of entomopathogenic nematode-infected cadavers. *Journal of invertebrate pathology, 78* (1), 17-23.

Shapiro-Ilan, D., Stuart, R. J., ve McCoy, C. (2006). A Comparison of Entomopathogenic Nematode Longevity in Soil under Laboratory Conditions. *Journal of Nematology, 38*(1), 119-129.

Smith, H. S. (1939). Insect populations in relation to biological control. *Ecological Monographs, 9*, 311-320.

Soyöz, M., ve Özçelik, N. (2003). Zirai mücadelede kullanılan pestisitlerin sitogenetik etkileri. *Tıp Fakültesi Dergisi, 10*(1).

Strauch, O., Ehlers, R., ve Hazir, S. (2012). Selective breeding for desiccation tolerance in liquid culture provides genetically stable inbred lines of the entomopathogenic nematode Heterorhabditis bacteriophora. *Applied Microbiology and Biotechnology, 97*, 731-739.

Stuart, R. J., Barbercheck, M., Grewal, P., Taylor, R., ve Hoy, C. (2006). Population biology of entomopathogenic nematodes: Concepts, issues, and models. *Biological Control, 38*(1), 80-102.

Sumaya, N., Aryal, S., Vandenbossche, B., Barg, M., Doerfler, V., Strauch, O., Molina, C., ve Ehlers, R. (2017). Phenotyping dauer juvenile oxidative stress tolerance, longevity and persistence within wild type and inbred lines of the

entomopathogenic nematode Heterorhabditis bacteriophora. *Nematology, 19*, 971-986

Susurluk, A., ve Bütüner, A. K. (2024). The role of drought in the efficacy of some entomopathogenic nematodes. *Turkish Journal of Entomology, 48*(1), 103-110.

Susurluk, I. A. (2008). Influence of temperature on the vertical movement of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* (TUR-S3) and *Heterorhabditis bacteriophora* (TUR-H2), and infectivity of the moving nematodes. *Nematology, 10*(1), 137-141.

Susurluk, I. A., Kumral, N. A., Peters, A., Bilgili, U., ve Açıkgöz, E. (2009). Pathogenicity, reproduction and foraging behaviours of some entomopathogenic nematodes on a new turf pest, *Dorcadion pseudopreissi* (Coleoptera: Cerambycidae). *Biocontrol science and technology, 19*(6), 585-594.

Susurluk, I. A., Ünlü, I. O., ve 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.

Susurluk, I. A., ve Ehlers, R. U. (2008). Comparison of some characterizations of recovered from soil and newly fermented entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Journal of Biological and Environmental Sciences, 2*(6), 65-71.

Susurluk, I. A., ve Ulu, T. C. (2015). Virulence comparisons of high-temperature-adapted *Heterorhabditis bacteriophora, Steinernema feltiae* and *S. carpocapsae. Helminthologia, 52*(2), 118-122.

Ulu, T. C., ve Erdoğan, H. (2023). Field application of encapsulated entomopathogenic nematodes using a precision planter. *Biological Control, 182*, 105240.

Waage, J., ve Greathead, D. (1988). Biological control: challenges and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B, 318*, 111-128.

Wenxiu, G., Yan, X., ve Han, R. (2017). Adapted formulations for entomopathogenic nematodes, *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp.. *Nematology, 19*, 587-596.

White, G. F. (1927). A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science, 66*(1709), 302-303.

Wilson, M., ve Ivanova, E. (2004). Neutral density liquid formulations for nematode-based biopesticides. *Biotechnology Letters, 26*, 1167-1171.