ENTOMOPATOJEN NEMATOD *Heterorhabditis bacteriophora* HBH HİBRİT IRKININ *IN VIVO* VE *IN VITRO* ÜRETİM SONRASI KONUKÇU ARAMA DAVRANIŞLARININ ARAŞTIRILMASI

Aydan DOĞAN

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENTOMOPATOJEN NEMATOD *Heterorhabditis bacteriophora* HBH HİBRİT IRKININ *IN VIVO* VE *IN VITRO* ÜRETİM SONRASI KONUKÇU ARAMA DAVRANIŞLARININ ARAŞTIRILMASI

Aydan DOĞAN
0009-0008-3325-9699

Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

BURSA – 2023
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ENTOMOPATOJEN NEMATOD *Heterorhabditis bacteriophora* HBH HİBRİT IRKININ *IN VIVO* VE *IN VITRO* ÜRETİM SONRASI KONUKÇU ARAMA DAVRANIŞLARININ ARAŞTIRILMASI

Aydan DOĞAN

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK

Entomopatojen nematodlar, bitki zararlılarıyla mücadelede önemli bir rol oynayan doğal düşmanlardır. Bu nematodlar, Rhabditida takımı, Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarında yer alan mikroskobik ipliksi solucanlardır. Genellikle toprakta yaşayan ve aktif olarak hareket eden bu nematodlar, kendilerini bir ara konukçu olarak kullanacakları böcekleri enfekte etmek amacıyla hareket ederler. Entomopatojen nematodlar, böceklerin vücutlarının doğal açıklıklarından veya deri yoluyla girdikten sonra böceği enfekte ederler. Bu enfeksiyon süreci, nematodların taşıdığı simbiyont bakterilerin böcek vücudunda üremesi ve toksinlerin salınmasıyla gerçekleşir. Bu tez çalışmasında, konukçu arama davranışlarının karşılaştırılması amacıyla *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit ırkının infektif juvenillerin (IJ'ler) üretimi, *in vitro* ve *in vivo* olmak üzere iki farklı yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. IJ'ler 2 kontrol kolu ve 1 larva kolu olan Y-Olfaktometre düzeneği içerisine 1000 IJ dozunda orta noktadan uygulanmıştır. Sonrasında bu düzenek 25°C'lik inkübatörde sabit koşullarda bekletilmiştir. 2. gün ve 4. gün sonunda olfaktometre düzeneği açılıp larva koluna ve kontrol kollarına yönelen IJ miktarları belirlenmiştir. Bunun sonucunda *in vivo* ortamda üretilen IJ'lerde 2. günde larva koluna yönelimin %52,75 olduğu belirlenmiştir. Bu oran *in vivo* 4. günde %30,63 olarak bulunmuştur. *In vitro* ortamda üretilen IJ'lerde 2. günde larva koluna yönelime bakıldığın larva koluna yönelimin %35,66 olduğu görülmüştür. Bu oran *in vitro* 4. gün için %46,59 olarak belirlenmiştir. Buna ek olarak yapılan çalışma sonucunda konukçu ölüm oranı en fazla *in vivo* 4. günde görülmüştür. Konukçu disekte edildiğinde en fazla IJ miktarı *in vivo* 4. günde bulunmuştur. Sonuç olarak *in vivo* üretimle elde edilen IJ'lerin konukçu arama davranışlarının *in vitro* üretim ile elde edilen IJ'lere göre konukçuya yönelimlerinin kısa sürede daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır.

Anahtar Kelimeler: Entomopatojen nematod, *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit ırkı, konukçu arama davranışı, *in vivo*, *in vitro*.

2023, ix + 48 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF HOST-SEEKING BEHAVIORS OF THE ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE *Heterorhabditis bacteriophora* HBH HYBRID STRAIN AFTER *IN VIVO* AND *IN VITRO* PRODUCTION.

Aydan DOĞAN

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

Supervisor: Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK

Entomopathogenic nematodes (EPN) play a significant role in the biological control of plant pests. These nematodes belong to the orders Rhabditida, families Steinernematidae and Heterorhabditidae, and they are microscopic thread-like worms. They typically reside in the soil and actively move around to seek insect hosts for their survival. Entomopathogenic nematodes enter the insect's body through natural openings or via the integument, infecting their internal organs. This infection process occurs through the reproduction of bacterial symbionts released by the nematodes within the insect's body, accompanied by the secretion of toxins. In this thesis study, the production of infective juveniles (IJs) of *Heterorhabditis bacteriophora* HBH hybrid strain was conducted using two different methods: *in vivo* and *in vitro*, with the aim of comparing host-seeking behaviors. IJs were applied at a dosage of 1000 IJs from the central point into the Y-Olfactometer device, which consisted of 2 control arms and 1 larva arm. Subsequently, the apparatus was kept under constant conditions in an incubator at 25°C. On the 2^{nd} and 4^{th} days, the number of IJs attracted to the larva arm and control arms was determined by opening the olfactometer arms. As a result, the larva arm attraction on the 2^{nd} day was determined to be 52.75% *in vivo*, while on the 4th day, it was 30.63% *in vivo. In vitro*, the larva arm attraction on the 2^{nd} day was found to be 35.66%, and on the 4th day, it was 46.59%. Additionally, the study revealed that the highest host mortality rate was observed on the 4^{th} day *in vivo*. Upon dissection of the hosts, the highest number of IJs was found on the 4^{th} day *in vivo*. Consequently, it was evident that IJs produced through *in vivo* methods exhibited a higher and quicker host-seeking tendency compared to those produced through in vitro methods.

Key words: Entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hybdid strain, host foraging behaviours, *in vivo*, *in vitro*.

2023, ix + 48 pages.

ÖNSÖZ VE/VEYA TEŞEKKÜR

Lisans ve Lisanüstü eğitim hayatım boyunca benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen mesleki bilgi birikiminden ve deneyimlerinden faydalandığım, çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Alanımla ilgili birçok konuda yardımcı olan Bursa Uludağ Üniversitesi, Bitki Koruma Bölümü Hocalarıma, tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen Sayın Araş. Gör. Yavuz Selim Şahin'e ve Alperen Kaan Bütüner'e teşekkürlerimi sunarım.

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

Her zaman bana yol gösteren ve hem maddi hem de manevi olarak desteklerini esirgemeyen değerli aileme sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Aydan DOĞAN
…/…/…….

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET....ii
ABSTRACT....iii
ÖNSÖZ VE/VEYA TEŞEKKÜR....iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ....vi
ŞEKİLLER DİZİNİ....vii
ÇİZELGELER DİZİNİ....ix
1. GİRİŞ....1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI....6
2.1. EPN'lerin Konukçu Arama Davranışları ile İlgili Yapılan Çalışmalar....6
2.2. Y-Tipi Olfaktometre ile EPN'lerin Davranışları Üzerine Yapılan Çalışmalar....8
3. MATERYAL VE YÖNTEM....12
3.1. Laboratuvarda *Galleria mellonella* Larvalarının Üretimi....12
3.1.1. *Galleria mellonella* Larvalarının Yeminin Hazırlanışı....14
3.2. *Heterorhabditis bacteriphora* HBH Hibrit Irkı....14
3.3. *In vivo* Ortamda HBH üretimi....16
3.4. *In vitro* Ortamda HBH Üretimi....18
3.4.1. Simbiyont Bakteri İzolasyonu....18
3.4.2. NBTA Agar İçeriği....20
3.4.3. YS Sıvı Besin Ortamı....21
3.4.4. Yumurta İzolasyonu İşlemi....23
3.4.5. HBH'lerin Katı Besi Ortamına Aktarılması....28
3.5. Y-Tipi Olfaktometrenin Hazırlanışı....31
3.5.1. Silis Kumu....33
3.6. İstatistiksel Analiz....34
4. BULGULAR....35
4.1. *In vivo Üretimle* Elde Edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkının Y-Olfaktometre İçerisinde 2. Günde Yönelimi....35
4.2. *In vivo* Üretimle Elde Edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkının Y-Olfaktometre İçerisinde 4. Günde Yönelimi....36
4.3. *In vitro* Üretimle Elde Edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkının Y-Olfaktometre İçerisinde 2. Günde Yönelimi....37
4.4. *In vitro* Üretimle Elde Edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkının Y-Olfaktometre İçerisinde 4. Günde Yönelimi....38
4.5. *In vitro* ve *in vivo* Üretimle Elde Edilen Heterorhabditis bacteriophora HBH Irkının Y-Olfaktometrede Larva Kollarına Yöneliminin Karşılaştırılması....39
4.6. *In vitro ve in vivo* Üretimle Elde Edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkı IJ'lerinin Konukçudaki Sayısının ve Ölü Konukçu Sayısının Belirlenmesi....40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ....42
KAYNAKLAR....45
ÖZGEÇMİŞ....49

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

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

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

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. EPN'lerin hayat çemberi (Doğan ve Susurluk, 2023) 4
Şekil 3.1. İnkübatör içerisinde 30 °C'de sabit koşullarda yetiştirilen *Galleria mellonella* görüntüsü (Susurluk ve Doğan, 2023) 12
Şekil 3.2. Besin ortamındaki *Galleria mellonella*' ların genel görünümü (Susurluk ve Doğan, 2023) 13
Şekil 3.3. HBH stok kültürlerin genel görüntüsü (Susurluk ve Doğan, 2023) 15
Şekil 3.4. Stokta 4-6 °C saklanan HBH kültürleri (Susurluk ve Doğan, 2023) 15
Şekil 3.5. Plate içerisinde HBH inokülasyonu (Susurluk ve Doğan, 2023) 17
Şekil 3.6. Plate içerisinde HBH inokülasyonu (Susurluk ve Doğan, 2023) 17
Şekil 3.7. Enfekteli *G. mellonella* larvasının dezenfeksiyonu (Susurluk ve Doğan, 2023) 19
Şekil 3.8. Enfekteli *G. mellonella* larvasının hemolimfinin izolasyonu. (Susurluk ve Doğan, 2023) 20
Şekil 3.9. *Photorhabdus* spp. nin NBTA agar ortamında gelişimi (Susurluk ve Doğan, 2023) 21
Şekil 3.10. *Photorhabdus* spp. nin YS sıvı besi ortamında gelişimi (Susurluk ve Doğan, 2023) 22
Şekil 3.11. *Photorhabdus* spp. nin kültüre alınması ve stoklanması (Susurluk ve Doğan, 2023) 22
Şekil 3.12. Enfekteli *G. mellonella* larvalarının disekte işlemi (Susurluk ve Doğan, 2023) 24
Şekil 3.13. Hermafrodit bireyler içerisinde gelişen yumurtaların mikroskop görüntüsü (Susurluk ve Doğan, 2023) 24
Şekil 3.14. *G. mellonella* larvalarından disekte edilen HBH'lerin hermafrodit bireylerinin görüntüsü (Susurluk ve Doğan, 2023) 25
Şekil 3.15. Hermafrodit bireylerden elde edilen yumurtaların santrifüj edilmesi (Susurluk ve Doğan, 2023) 26
Şekil 3.16. Santrifuj edilen HBH yumurtalarının YS sıvı besi ortamına aktarılması (Susurluk ve Doğan, 2023) 27
Şekil 3.17. HBH'nin WOUTS agar ortamında gelişimi (Susurluk ve Doğan, 2023) 29
Şekil 3.18. WOUTS agar ortamındaki HBH'nin mikroskop görüntüsü (Susurluk ve Doğan, 2023) 30
Şekil 3.19. WOUTS agar ortamında gelişen IJ'lerin Petri kapağındaki mikroskop görüntüsü (Susurluk ve Doğan, 2023) 30
Şekil 3.20. Çalışmada kullanılan Y-Olfaktometre düzeneği (Susurluk ve Doğan, 2023) 32
Şekil 3.21. Y-Olfaktometre düzeneğinin silis kumu ile doldurulması (Susurluk ve Doğan, 2023) 32
Şekil 3.22. Y-Olfaktometre içerisindeki *G. mellonella* larvalarının kafes düzeneği (Susurluk ve Doğan, 2023) 33
Şekil 4.1. *In vivo* üretimle elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH bireylerinin 2. Günde K1, K2 ve L kollarına yönelim dağılımı ($F=292,537$; $df=2,6$; $P<0.0001$) 35

Şekil 4.2. *In vivo* üretimle elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH bireylerinin 4. Günde K1, K2 ve L kollarına yönelim dağılımı (F=0,8153; df=2;6, P<0,4862).....36
Şekil 4.3. *In vitro* üretimle elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH bireylerinin 2. Günde K1, K2 ve L kollarına yönelim dağılımı (F=15,5945; df=2;6, P<0,0042).....38
Şekil 4.4. *In vitro* üretimle elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH bireylerinin 4. Günde K1, K2 ve L kollarına yönelim dağılımı (F=26,4449; df=2;6, P<0,0011).....39
Şekil 4.5. *In vitro* ve *in vivo* üretimle elde edilen *H.bacteriophora* HBH hibrit ırkı bireylerinin *G. mellonella* larvalarına yönelim davranışının karşılaştırılması (F=34.946; df=2;8, P<0.0001).....40
Şekil 4.6. *G.mellonella* larvalarının ölüm oranlarının karşılaştırılması (F= 46,768; df= 7, 32; P= <,0001).....41
Şekil 4.7. *In vivo* ve *in vitro* sonucu elde edilen *H. bacteriophora* HBH ırkı bireylerinin konukçudaki IJ sayılarının karşılaştırılması (F=47.667; df=3;8, P<0.0004).....41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. *G. mellonella* Besin İçeriği 13
Çizelge 3.2. Ringers Solüsyon İçeriği 14
Çizelge 3.3. NBTA Agar İçeriği 20
Çizelge 3.4. YS Sıvı Besin Ortamı 21
Çizelge 3.5. Sterilizasyon Solüsyonu İçeriği 27
Çizelge 3.6. WOUTS Agar İçeriği 28

1. GİRİŞ

Zirai mücadeledeki öncelikli amaç, hastalık, zararlı ve yabancı otların tarım ürünlerinin verim ve kalitesini düşürerek verdiği zararı azaltmak ya da bu zararı ortadan kaldırmaktır (Delen ve ark. 2005). Tarımsal üretimde verim ve kalitede artış sağlamak amacıyla modern tarımsal teknikleri ve üretim amaçları kullanmak gerekmektedir (Tiryaki ve ark. 2010). Yabancı otlar, bitki hastalıkları ve bitki zararlıları kaynaklı bu zararı engellemek amacıyla değişik türlerdeki canlılara karşı, birçok mücadele yöntemi ve tekniği kullanılmaktadır. Bu yöntemler; kültürel önlemler, fiziksel-mekanik, biyolojik, biyoteknik, kimyasal ve entegre mücadele olarak belirtilebilir. Kimyasal mücadele, kolay uygulanabilir olması ve hızlı etki göstermesi gibi sebeplerle diğer mücadele yöntemlerine göre daha fazla tercih edilen bir mücadele yöntemidir (Uygun ve ark. 2015).

Günümüzdeki insektisitler hedef alınan zararlıları baskı altına alırken hedef alınması istenmeyen canlıları ya da faydalı böceklere de (hedef alınmayan canlılara) olumsuz etki oluşturmaktadır. Kullanılan kimyasallar ana zararlının direnç kazanmasına, ikincil zararlının ana zararlı olarak ortaya çıkmasına sebep olabilir. Bu kimyasalların kullanılması insan ve çevre sağlığı açısından da birçok sorun oluşturmakta ve insanlarda akut veya kronik etkilere yol açmaktadır. Bununla beraber araştırmacılar farklı mücadele yöntemlerine yönelmişlerdir (Susurluk ve Ökten 2000). Bu alternatif yöntemler içerisinde en etkililerinden biri biyolojik mücadeledir. Genel hatlarıyla biyolojik mücadeleyi şu şekilde tanımlayabiliriz: Biyolojik mücadele, zararlı organizmaların doğal düşmanları kullanılarak, kimyasal müdahaleye başvurmadan insan faktörü yardımı ile kontrol altına alınmasıdır. Bu mücadele yöntemi, zararlıları pestisitlerle öldürmek yerine doğal düşmanları sayesinde kontrol altında tutarak, çevre dostu bir yöntem olarak kabul edilir. Biyolojik mücadele, doğal düşmanların kullanımı yoluyla hastalık, böcek ve diğer zararlı organizmaların yayılmasını engeller ve çevre üzerindeki olumsuz etkileri minimize eder. Bu yöntem, organik tarım gibi sürdürülebilir tarım uygulamalarının da bir parçasıdır. (Birişik vd. 2013; Lacey vd. 2015).

Biyolojik mücadele yöntemlerinde, zararlılara karşı kullanılan organizmalara biyolojik mücadele ajanı denmektedir. Biyolojik mücadele kapsamında kullanılan birçok organizma bulunmaktadır. Biyolojik mücadelede kullanılan ajanlar doğal düşman böcek

ve akarlar, hastalık etmenleri, nematodlar, mikroorganizmalar ve diğer biyolojik ajanlardır. Hastalık etmenleri, hastalık yapıcı organizmalardır ve hastalıklara neden olan zararlılarla mücadelede kullanılırlar (Ulu vd. 2016). Endoparazitik olan bu canlılar, toprakta yaşayan zararlılarla mücadelede kullanılan nematod türleridir. Mikroorganizmalar, bakteriler, mantarlar ve virüsler gibi zararlı organizmalarla mücadelede kullanılan ajanlardır. Biyolojik mücadelede kullanılan bu ajanlar, zararlıların doğal düşmanları ya da hastalık etmenleri gibi doğal kaynaklardan elde edilir ve çevre dostu bir mücadele yöntemi olarak kabul edilir (Susurluk & Ehlers, 2008). Bunlar içerisinden biyolojik mücadele kapsamında en etkili ve en yaygın şekilde kullanılan ajanlardan birisi Entomopatojen Nematodlardır (EPN) (Gaugler 2002; Lacey vd. 2015). EPN'lerin böcek patojeni olduğu 17. yüzyıldan itibaren bilinen bir gerçek olmakla beraber 1930'lara kadar biyolojik mücadele amacı ile kullanılabilirliğinin önemi yeteri kadar araştırılmamıştır. Sonrasında gerçekleştirilen çalışmalar ile şu anki etkin konumuna ulaşmıştır. (Gözel ve Güneş 2013; Nježić ve Ehlers 2020).

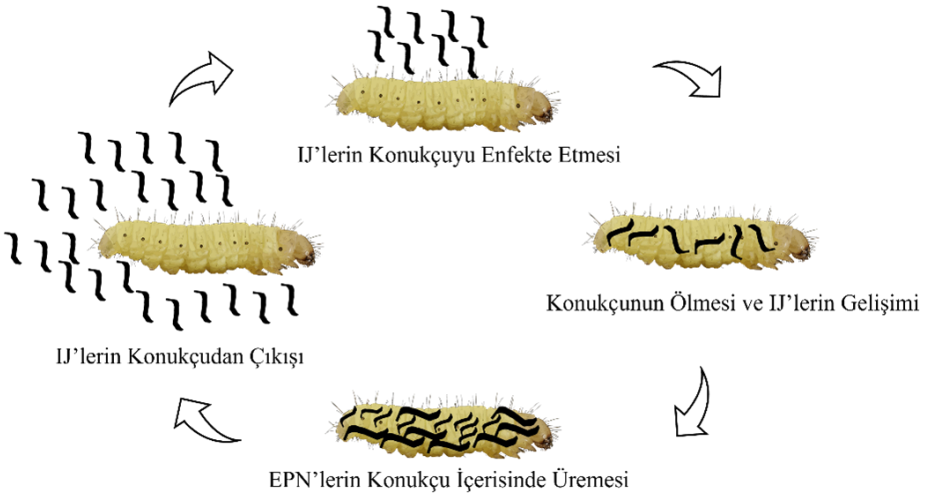
EPN'lerin, boyları 500-1000 µm civarında, vücutları silindirik yapıda ve segmentsiz olan ipliksi solucanlardır (Koppenhöfer, 2000; Lacey vd. 2015). Pek çok nematod türü, böceklerle ilişki içerisindedir. Böceklerle parazitik ilişki içinde olan, 23 nematod familyası vardır. Familyaların yedi tanesi, böceklerin biyolojik mücadelesini sağlama potansiyeline sahip türler içerir. Bunlar; Phaenopsitylenchidae, Sphaerulariidae ve Allantonematidae (Takım: Tylenchida); Heterorhabditidae ve Steinernematidae (Takım: Rhabditida); Mermithidae ve Tetradonematidae (Takım: Stichosomida) familyalarıdır. Bunlar içerisinde entomopatojen olan Heterorhabditidae ve Steinernematidae yaygın mikrobiyal insektisitler olarak kullanılmaktadır (Koppenhöfer, 2000; Susurluk ve Ehlers, 2008).

EPN'ler, Nematoda şubesi, Secernentea sınıfı, Rhabditia takımı, Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarına aitlerdir. Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarına üye bu endoparazitik canlılar, yaşamlarına devam ettirebilmeleri için bir konukçuya ihtiyaç duymaktadırlar. Aynı zamanda bu canlılar hayat çemberlerinin bazı evrelerinde konukçusunu enfekte etme becerisindedirler (Shapiro-Ilan vd. 2006; Dede vd. 2022). EPN'lere genel olarak bakıldığında hayat döngüleri Yumurta, 1. Larva Dönemi, 2. Larva Dönemi, 3. Larva Dönemi (Infektif Juvenil), 4. Larva Dönemi, Ergin

şeklindedir. Heterorhabditidae familyasına ait üyelerde görülen yaşam çemberi ile Steinernematidae familyasına ait üyelerde görülen yaşam çemberi farklılık göstermektedir (Ehlers 2001; Pezowicz 2004). Heterorhabditidae'lerde ilk evre sonunda oluşan ergin bireylerin hepsi hermafrodittir. Steinernematidae'de ise bu durum ilk evre sonunda oluşan ergin bireyler dahil, her zaman erginler amfibik (iki ayrı cinsiyet) şeklinde görülür (Stock vd. 2004).

3. dönem Larva ya da Infektif Juvenil (IJ) konukçuyu enfekte edebilme özelliğine sahip tek evredir. Bu dönemde konukçuyu enfekte eden IJ'ler konukçu içerisinde beslenirler ve çoğalırlar. Bu canlılar *Enterobacteriaceae* spp. familyasına ait gram negatif bakterilerden olan *Xenorhabdus* spp. (Steinernematidler'de) ve *Photorhabdus* spp. (Heterorhabditler'de) bakterileri ile simbiyotik ilişki içerisindedirler. Bu simbiyotik ilişki sayesinde larvaların konukçularını enfekte etmesinin devamında konukçularını septisemi (kan zehirlenmesi) yoluyla en fazla 72 saat içerisinde konukçularını öldürürler. (Forst ve Nealson, 1996; Ehlers, 2001). Heterorhabditidae familyalasına ait EPN'ler konukçularını simbiyotik ilişki içerisinde olduğu bakteri olmadığı koşullarda öldüremez (Bock vd. 2014).

Steinernematidae familyasına ait EPN'ler konukçularını simbiyotik ilişki içerisinde olduğu bakterileri vücutları içerisinde taşımadığı koşullarda konukçuları öldürebilme yetkinlikleri olmasına rağmen konukçu içerisinde çoğalamazlar. Aynı zamanda *Photorhabdus* spp. Heterorhabditidae familyasına ait üyelerin vücut sıvısına karışmış halde bulunurken *Xenorhabdus* spp. Steinernematidae familyasına ait üyelerde vücutlarında özel bir kese içerisinde bulunur (Ehlers, 1998; Kepenekci ve Susurluk, 2003; Grewal vd. 2005). Bu canlılar konukçu içerisinde yaklaşık olarak 3 döl verdikten sonra, konukçu içerisinde besin kalmayıncaya dek beslenir ve çoğalırlar. Konukçu doku içerisindeki besin tükendiğinde IJ formunda konukçu dokuyu terk ederek aylarca beslenmeksizin yeni bir konukçu arayışına girerler. Herhangi bir besin almadan 20 aya kadar toprak içerisinde konukçu arayabilmektedirler (Susurluk ve Ehlers, 2008).



Şekil 1.1. EPN'lerin hayat çemberi (Doğan ve Susurluk, 2023)

Entomopatojen nematodların çoğaltılması iki farklı yöntemle gerçekleştirilir. Bunlar "*in vitro*" ve "*in vivo*" yöntemleridir. *In vitro* üretim sıvı ve katı ortam gerçekleştirilmekle beraber ticari üretim amacıyla tercih edilmektedir (Ehlers ve Shapiro-Ilan, 2005).

In vivo üretim, canlı organizmanın içinde üretim anlamına gelir. Bu yöntemde, nematodlar canlı bir organizmanın içinde üretilirler. Örneğin, bir böceği enfekte eden bir EPN, böceğin içinde üreyebilir ve gelişebilir. Bu yöntem, genellikle nematodların doğal yaşam döngüsünü taklit etmek için kullanılır ve araştırmacılar EPN'lerin canlı organizmalarla nasıl etkileşime girdiğini ve enfeksiyon yollarını araştırmak için kullanabilirler. Bu yöntem White Trap (White, 1927) yöntemi esas almaktadır. Petri içerisinde enfekte edilmiş olan larva, enfeksiyon gerçekleştikten 3 gün sonrasında, White Trap'e alınır. White Trap üzerinde IJ'lerin konukçu içerisinden çıkış yapması ile EPN üretiminin sağlanmasını temel alan bir yöntemdir (Shapiro-Ilan ve ark. 2001; Tobias vd. 2017).

In vitro üretim ise, canlı organizma dışında üretim anlamına gelir. Bu yöntemde, nematodlar laboratuvar koşullarında bir ortamda üretilirler. Örneğin, nematodların laboratuvar besiyeri ortamlarında üretimi *in vitro* üretim olarak adlandırılır. Bu yöntem, nematodların özelliklerini kontrol etmek ve laboratuvar koşullarında test etmek için kullanılır. Katı ve sıvı ortamlar üretilebilmektedir. *In vitro* üretim genellikle EPN'lerin kitle üretimine daha elverişli bir yöntemdir. *In vivo* üretime göre tamamen steril bir

ortamda gerçekleştirilir (Ehlers, 2001; Shapiro-Ilan & Gaugler 2002; Tabassum & Shahina 2004).

In vivo ve *in vitro* üretim arasındaki temel fark, üretim ortamlarının farklı olmasıdır. *In vivo* üretim, canlı organizma içinde gerçekleşirken, *in vitro* üretim laboratuvar koşullarında gerçekleşir. Ayrıca, *in vivo* üretim genellikle doğal yaşam döngüsünü taklit etmek için kullanılırken, *in vitro* üretim daha çok laboratuvar koşullarında nematodların özelliklerini kontrol etmek ve test etmek için kullanılır (de la Torre, 2003; Dunn vd. 2020).

Bu tez çalışmasında, Bursa Uludağ Üniversitesi, Bitki Koruma Bölümünde bulunan Nematoloji laboratuvarında üretilmiş olan *H. bacteriophora* türünün Türkiye şartları uyum sağlamış üstün bir ırk olan HBH hibrit ırkının, *in vitro* (katı) ve *in vivo* ortamlarda iki şekilde üretilmiştir. Üretim sonucunda elde edilen bireylerin (IJ) Y-Olfaktometre düzeneği içerisinde konukçu arama potansiyellerinin değerlendirilmesi devamında ise bu iki üretim yönteminin EPN'lerin konukçu arama davranışlarına etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. EPN'lerin Konukçu Arama Davranışları ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Dede ve ark. (2022), yaptıkları çalışmada *H. bacteriophora* üstün bir ırkı olan HBH'nin farklı sıcaklıklarda *Loxostege sticticalis* L., 1761 (Lepidoptera: Pyralidae) üzerinde oluşturduğu virülensitesini değerlendirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre 30°C ve 20 IJs dozunda uygulanan HBH larvalar üzerinde oluşturduğu en yüksek ölüm oranını %97 olarak bulmuşlardır. Düşük dozlar ve sıcaklıklarda ise HBH'nin virülensliğinde bir azalma meydana geldiğini bulmuşlardır.

Grewal ve ark. (1993), deneysel ve doğal konukçuların artıkları ile ilişkili olarak yapılan araştırmada, farklı türlerdeki EPN'lerin farklı uyarıcılara karşı verdiği tepkiler incelenmiştir. EPN'ler, konukçu arayışını agresif davranış, kafa ve vücut dalgalanması, sürünme, kuyruk sürüme, baş sürtme gibi deneysel parametrelerdeki değişikliklerle sergilemiştir. *S. glaseri, Spodoptera exigua* (Lepidoptera) ve *Popillia japonica* (Coleoptera) gibi doğal ve *Acheata domesticus* (Orthoptera) ve *Blatella germanica* (Blattodea) gibi deneysel konukçuların artıkları ile etkileşime girerek davranışsal tepki göstermiştir. *vivo scapterisci* denemede kullanılan farklı böcek türlerinin vücut atıklarına herhangi bir tepki göstermemiştir. Ancak *S. carpocapsae* yalnızca *B. germanica* vücut atıklarına karşı bir tepki vermiştir. Hamamböceği atıklarında bulunan amonyak, EPN'ler üzerinde bir inhibitör etkisi yaratarak, sadece *S. scapterisci* hariç diğer nematod türlerinin kaçma tepkisine neden olmuştur. Araştırmada, özel konukçu tanıma mekanizmasının konukçu çekiciliği ile ilgili olduğu vurgulanmıştır.

Ramos-Rodriguez ve ark. (2006), yaptıkları çalışmada bazı entomopatojen nematod türlerinin *S. carpocapsae, S. glaseri* ve *S. riobrave* nin enfekte edilmiş ve enfekte edilmemiş konukçulara yönelimi incelemişlerdir. Sonuçlara bakıldığında enfekte olmuş olan larvalara en az yönelim *S. carpocapsae* türünde görülmüştür. En fazla yönelim ise *S. glaseri* türünde görülmüştür. Bu sonuçlar, konukçu enfeksiyon durumunun enfeksiyon davranışı üzerindeki etkisinin, konukçu çekiciliğinden sonra gerçekleşen konukçu-enfeksiyon sürecindeki sonraki adımlarda meydana geldiğini öne sürmektedir.

Lewis ve ark. (1995) yaptıkları çalışmada beslenmemiş IJ'lerin, konukçu arayışı sırasında metabolizma hızları, avlanma stratejileri ve enerji depolaması arasındaki ilişkinin doğası, konukçu arama davranışını değiştirip değiştirmediği sorusuna cevap aramışlardır. Bu bağlamda, 3 entomopatojen nematod türünün metabolik hızları, enerji depoları ve enfeksiyon yetenekleri suda depolanırken belirlenmiştir. *S. carpocapsae* konukçusuna tuzak kurarken, *H. bacteriophora ve S. glaseri* konukçusuna arama eğilimindedir. *S. carpocapsae*, diğerlerine göre en düşük metabolik hızlara sahipken, *H. bacteriophora* en yüksek metabolik hızlara sahip olmuştur. *S. glaseri*, diğer iki nematodun arasında metabolik oranlarda en yüksek seviyede olanıdır.

Christen ve ark. (2007) potansiyel konukçuların kalitesi, entomopatojen nematodların infektif juvenilleri için önemli ölçüde değişebilir. Bu değişiklik, konak türünün/evresinin özelliklerine, fizyolojik duruma (örn. stres, toksinlerle beslenme) ve enfeksiyon durumuna (heterospesifik veya konspesifik enfeksiyon) bağlı olabileceğini belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada *Steinernema riobrave* türünün, daha önce parazitlenmiş veya nematod-simbiyotik bakteri *Xenorhabdus* spp. enjekte edilmiş konaklara *Galleria mellonella* veya *Tenebrio molitor* verdiği tepkiler üzerine çalışmışlardır. IJ'ler 72 saat kadar önceden bakteri ile enjekte edilmiş larvaları enfekte etmeye devam etmiştir. *S. riobrave*, enfeksiyon sonrası 24 saat boyunca *G. mellonella* larvalarını enfekte olmamış larvalara ve enjeksiyon sonrası 24 saat boyunca *G. mellonella* larvalarını enjeksiyon sonrası 48 saat boyunca larvalara tercih etmiştir. Parazitlenmiş böceklerin tercih edilmesi veya enfeksiyonun devam etmesi, entomopatojen nematod etkinliğini etkileme potansiyeline sahip olduğunu bulmuşlardır.

Bal ve Grewal (2015), Entomopatojen nematodların beslenme ve yayılma davranışlarına ilişkin yapılan çalışmada, ambusher ve crusier olarak sınıflandırılan iki tür solucan olan *S. carpocapsae* ve *H. bacteriophora*, enfekte kadavralardan alınarak hareketli ya da hareketsiz, larvalı ya da larvasız killi toprak ve Wooster kumu karışımlarında test edilmiştir. Sonuçlar, *H. bacteriophora*'nın hareketsiz larvalar üzerinde daha iyi enfeksiyon sağladığını, ancak hareketli larvalar üzerinde etkili olmadığını, *S. carpocapsae'*nin ise hareketli larvalar üzerinde daha etkili olduğunu göstermiştir. İki türün de enfektif juvenillerinin kadavranın yakınında bulunduğu, *S. carpocapsae*'nin ise

IJ'lerin kadavraya en uzak mesafede bulunduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, ambusher ve cruiser teorisini doğrulamıştır.

2.2. Y-Tipi Olfaktometre ile EPN'lerin Davranışları Üzerine Yapılan Çalışmalar

Boff ve ark. (2001), *H. megidis*'in bir ırkının bitki köklerinin ve konukçu böceklerin ayrıca bu ikisinin kombinasyonunun varlığı altında, konukçu arama davranışlarının araştırılması amacıyla kum ile doldurulmuş yeni bir Y-Olfaktometre düzeneği kullanılmıştır. 24 saat içinde yapılan çalışmada, IJ'lerin büyük çoğunluğunun *G. mellonella* larvalarına yönelerek larvaların tamamını öldürdüğü saptanmıştır. Bununla birlikte, *O. sulcatus* larvaları infektif jüvenillerin konukçuya yönelimini etkilememiş ve larva ölümü gözlenmemiştir. Çilek kökleri, infektif jüveniller üzerinde olumsuz bir etki yaratmıştır. Ancak, *O. sulcatus* ile çilek kökleri kombinasyonunda, IJ'ler üzerinde olumlu bir etki gözlemlenmiş. Bununla birlikte, konukçu üzerinde %37 oranında ölüm tespit edilmiştir. Bu çalışma ile EPN'lerin yapay ortamda konukçu arayışını belirlemek için Y-Olfaktometrenin kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Struck ve ark. (2004), yaptıkları çalışmada, mısır fideleri ve *Cyrtomenus bergi* ile arasındaki etkileşim üzerine, biyolojik mücadele amacıyla yaygınlıkla kullanılmakta olan *H. megidis*'in konukçu bitkiyi bulma özelliğiyle ilgili bir araştırma yapılmıştır. Araştırmada, Y-Olfaktometre kum ile doldurulmuştur ve kollara mısır fidesi, *Cyrtomenus bergi*, her ikisinin kombinasyonu ve kontrol koluna yalnızca kum doldurulmuştur. Kombinasyonlarda farklılıklar yapılarak toplamda 6 farklı deneme yapılmış ve EPN'lerin çoğunlukla mısıra ve *Cyrtomenus bergi*–mısır kombinasyonuna yönelim gösterdiği belirlenmiştir.

San-Blas ve Gowen (2008), EPN'lerin yalnızca konukçusunu parazitleyen bir endoparazitik bir canlı olarak değil aynı zamanda ölü böceklere yönelimininde olduğu yapılan çalışmalar sonucunda ortaya koyulmuştur. EPN'lerin leşçil özellikleri, öldürülen böceklerin içine girerek gelişme ve üreme davranışlarını içerir ve 2 *Heterorhabditis ve* 6 *Steinernema* türünün leşçil özellikleri kıyaslanmıştır. Bu türler arasındaki çeşitli farklılıklar değerlendirilmiştir. Özellikle, *S. glaseri*'nin 10 gün önce ölen konukçu

böceğe giriş yapması ve *H. indica*'nın 72 saat önce ölmüş olan konukçuya giriş yapması en dikkat çekici türler arasındadır.

Rasmann ve Turlings (2007) toprak altı tritrofik ilişkiyi inceleyen araştırmacılar, bitkilerin, herbivor böceklerin ve nematod parazitlerin birlikte bulunduğu yapıyı araştırmışlardır. EPN'lerin toprak altında deforme olmuş bitki uzantılarından gelen uyarıcıları kullanarak konukçuların yerlerini belirleyebileceği fikriyle, bitkilerin, böceklerin ve EPN'lerin arasındaki ilişkileri 6 kollu olfaktometre kullanarak çalışmışlardır. Sonuçlar, toprak altındaki tritrofik ilişkilerin bitkiler tarafından yayılan uçucular, böcekler tarafından salınan kimyasallar ve buna karşı EPN'lerin oluşturduğu karşıt davranışlar arasında bir etkileşim olduğunu göstermektedir. Bu gibi çalışmalar, bitki savunma mekanizmalarının EPN'ler ile ilişkilerinin incelenmesi gerektiği düşüncesini ortaya çıkarmıştır.

Susurluk (2011), *Steinernema felitae*'nin, *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae) olarak bilinen lahana sineğine karşı mücadele potansiyeli, lahana sineği larvalarının bulunduğu alanlarda nematodların kalıcılığı, EPN'lerin *D. radicum* larvaları ve kanola bitkisi köklerine yakın alanlarda besin arama davranışı gösterip göstermediğini incelemek amacıyla yapılan laboratuvar çalışması sonuçlarına göre değerlendirildi. *S. felitae,* laboratuvar ortamında 12 hafta boyunca kalıcılık gösterdi. Lahana sineğinin son larva dönemi üzerinde %80'e varan bir etkinliği tespit edilmiştir. Y-Olfaktometre düzeneğinin içerisi özel partikül boyutlarına sahip kum ile doldurulmuştur. Devamında EPN'lerin farklı kollarda bulunan kanola bitkisi köklerine veya Lahana Sineğine yönelim gösterip göstermediği farklı sıcaklıklar kullanılarak incelenmiştir. Bu deneme sonucunda *S.feltiae*'lerin larvalara yönelim gösterdiği belirlenmiştir.

Nermut ve ark. (2012) tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada, *Phasmarhabditis hermaphrodita*'nın agar ve kum dolu bir olfaktometre içinde *Deroceras reticulatum* tarafından yayılan çeşitli işaretlere karşı davranışları test edilmiştir. *S. feltiae* ve *G. mellonella*, referans olarak kullanılmıştır. Hem Agar üzerinde ve hemde olfaktometre, düzeneğinde *P. hermaphrodita*'nın yöneliminin *D. reticulatum*'un kadavra ve canlı formlarına karşı yönelim sergilediği belirlenmiştir. Bu çalışma, *P. hermaphrodita*'ların

konukçusunu çeşitli uyarıcıları kullanarak tespit ettiğini ve ona doğru yönlendiğini göstermektedir.

Çakmak ve ark. (2013), *Steinernema pollyphyllae*'nin dişilerinin çeşitli kokulara karşı Y-Olfaktometre kullanılarak yönelimlerini incelemiştir. Çalışmada kokusuz, enfekte olmadan parçalanmış *Polyphylla fullo* larvası, *S. glaseri* ile enfekteli *P. fullo* larvası, ölmüş fakat parçalanmamış *P. fullo* larvası, canlı *P. fullo* larvası ve canlı *S. glaseri* IJ'leri ile çalışılmıştır. Kokusuz kontrol grubu ile kıyaslandığında, *S. pollyphyllae* bireylerinin kokunun yayıldığı kollara önemli oranda yönelim gösterdiği belirlenmiştir. Buna karşın, canlı *P. fullo* larvaları ve *S. glaseri* IJ'lerine herhangi bir yönelim görülmemiştir. Koku kaynakları karşılaştırıldığında, canlı *P. fullo* ve *S. glaseri* IJ'leri yerine diğer koku yayıcılarına eğilim gösterdiği gözlemlenmiştir.

Tonelli ve ark. (2016), böceklerin bitki köklerinde beslenmesiyle oluşan uçucuların EPN'ler üzerinde çekici bir etkiye sahip olduğu ve *H. indica* ile *S. carpocapsae* türlerinin şeker kamışı zararlılarına karşı etkin bir biyolojik mücadele ajanı olabileceği düşüncesiyle yapılan bir deneyde, 6 kollu bir olfaktometre kullanılmış ve *Cercopis intermedia* nimflerinin zararıyla birlikte yayılan bileşiklerin nematodlar üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ayrıca, nimflerin zararından sonra köklerin yaydığı bileşik çeşitleri de incelenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, entomopatojen nematodlar zarar görmemiş köklerle, kontrol kolu arasında fark gözetememişlerdir. Buna karşın, zarar görmüş köklerle sağlıklı kökler kıyaslandığında, *H. indica* ve *S. carpocapsae* türleri zararlı kokuları algılayıp zarar görmüş bitki köklerine doğru yönelmiştir.

Yetişkin (2016), tarafından yapılmış olan çalışmada, Y-Olfaktometre düzeneği kullanılarak *Heterorhabditis bacteriophora* türünün farklı ebeveynlerine ait izolatların olfaktometre düzeneği içerisinde konukçu bireylere yönelimleri incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda HB.C ismiyle ifade edilen izolatın diğer izolatlara göre konukçuya yöneliminin daha fazla olduğunu belirlemiştir.

Okumura ve Yoshiga (2014) tarafından gerçekleştirilen bir çalışma, *P.japonensis* (Hemiptera: Parastrachiidae) ile *C.elegans* (Rhabditida: Rhabditidae) bireylerinin birbirleri arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Araştırmacılar, *C. japonica* bireylerinin beslenmeyen dönemini konukçuların dişi bireylerinde bulduklarını, fakat bunun sebebini anlayamadıklarını belirtmişlerdir. *C. japonica* konukçularının salgıladığı ipuçlarına tepki yöneliminin olup olmadığını incelemek amacıyla Y-Olfaktometre düzeneği kurulmuş ve deney sonuçlar neticesinde *P. japonensis* tarafından salgılanan kokulara *C. japonica* tarafından bir tepki verildiği, ancak denemede kullanılan diğer koku kaynaklarına ve CO_2'e bir tepki verildiği saptanmamıştır. Yapılan çalışmada, *C. japonica*'nın konukçuya yöneliminde çeşitli kimyasal bileşiklerden faydalandığını ve bazı kairomonların entomopatojen nematodlar üzerinde cezbedici etkisi olduğunu ortaya koymuştur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Laboratuvarda *Galleria mellonella* Larvalarının Üretimi

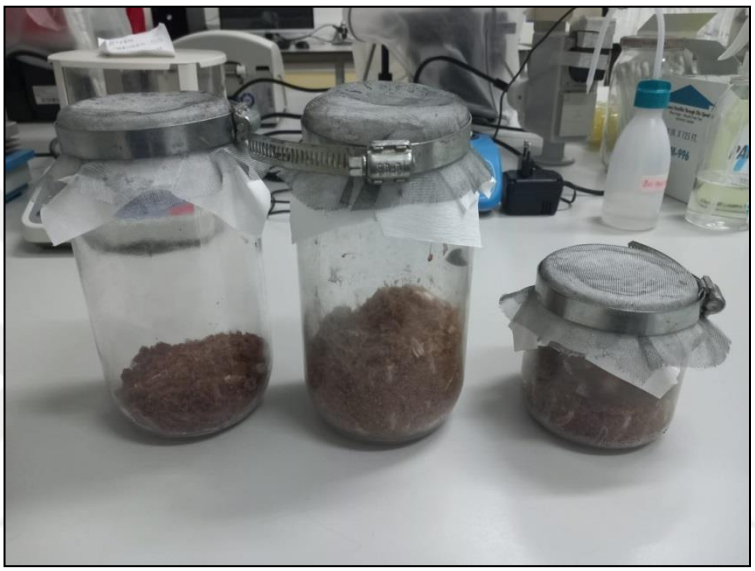
Bu çalışmada, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) test böceği olarak kullanılmıştır. Bu böcek, halk arasında balmumu güvesi ya da petek güvesi olarak da bilinirler. Entomopatojen nematodlara duyarlılık bakımından en uygun konukçu türler olarak belirlenmiş olan bu böceğin son dönem larvaları (6. Dönem) bu tez çalışmasında değerlendirilmiştir (Kaya ve Stock, 1997; Strauch vd. 2000).



Şekil 3.1. İnkübatör içerisinde 30 °C'de sabit koşullarda yetiştirilen *Galleria mellonella* görüntüsü (Susurluk ve Doğan, 2023)

Bu test böcekleri, 30-32 C sıcaklıkta sabitlenmiş inkübatörlerde cam kavanozlarda yetiştirilmektedir (Şekil 3.1.). Cam kavanozlar, 2 mm çapında sık gözenekli tellerle kaplanmış ve kelepçe ile sıkıştırılmıştır (Şekil 3.2.). Cam kavanozlara, petek güvesi yumurtaları ve larva besini eklenmektedir. Larva besini olarak mısır unu, gliserin, süt tozu, bal, kepek, maya ve soya unu karışımı kullanılmıştır (Eischen & Dietz, 1990). Besin içeriğine ait detaylı bilgi tabloda verilmiştir (Çizelge 3.1). Yumurtaların açılması

ile başlayan ve 4 hafta sonunda 6. dönem larva evresine ulaşılmaktadır. Son dönem larvalar, yem içerisinden alınarak EPN'lerin çoğalma ve aktivitelerinin incelenmesinde kullanılmaktadır. Üretimin sürdürülebilirliğini sağlamak amacıyla belli miktarda larva ayrılıp pupa evresine geçirilerek ergin bireylere dönüşmeleri ve ardından yumurta bırakmaları sağlanır. Erginlerin bıraktığı yumurtalar, hazırlanan tellerin üzerine konulan kağıtlarla toplanır. Sonrasında elde edilen yumurtalar ayrı bir kavanoz içerisinde yeni bir besi ortamı sağlanır (Williams, 1997; Mansour vd. 2010).



Şekil 3.2. Besin ortamındaki *Galleria mellonella*' ların genel görünümü (Susurluk ve Doğan, 2023)

Çizelge 3.1. *G. mellonella* Besin İçeriği

Mısır Unu	15%
Gliserin	20%
Süt Tozu	10%
Bal	20%
Kepek	20%
Maya	5%
Soya Unu	10%

3.1.1. *Galleria mellonella* Larvalarının Yeminin Hazırlanışı

Öncelikle, soya unu, mısır unu, süt tozu ve kepek karıştırma kabında bir araya getirilmiştir. Gliserin ve bal, önceden ısıtılmış bir tencerede hot-plate (200 ℃) kullanılarak kaynatılmıştır. Kaynama sırasında, maya da eklenmiştir ve maya tamamen eriyene kadar karıştırılmıştır. Ardından, diğer malzemeler yavaşça tencereye eklenmiştir. Bu malzemelerin eklenmesi sırasında dikkatlice karıştırılarak homojen bir karışım sağlanmıştır. Son olarak, hazırlanan yem soğumaya bırakılmıştır.

3.2. *Heterorhabditis bacteriphora* HBH Hibrit Irkı

Bu tez çalışmasında, Bursa Uludağ Üniversitesi, Bitki Koruma Bölümünün, Nematoloji laboratuvarında üretilmiş ve ülke koşullarına adapte olmuş, üstün bir hibrit ırk *Heterorhabditis bacteriophora* HBH, kullanılmıştır.

Heterorhabditis bacteriophora hibrit ırkı, laboratuvar koşullarında *in vivo* üretim aşamalarına uyularak üretilmiştir (Kaya ve Stock 1997). HBH ırkı IJ bireyleri, *G. mellonella* üzerinde üretilmiş ve +4 ºC'deki kültür kaplarında buzdolabında saklanmaktadır (Şekil 3.3.). Kültürlerin bulaşmasını veya saprofit mikroorganizma üremelerini önlemek için Ringers solüsyonu kullanılarak saklanmıştır (Ringers, 1882) (Çizelge 3.2.) (Şekil 3.4.).

Çizelge 3.2. Ringers Solüsyon İçeriği

Kimyasal Maddeler	Miktar (g)
KCl	0.42
$NaHCO_3$	0.20
NaCl	9.00
Saf su	1000
$CaCl_2x2H_2O$	0.37



Şekil 3.3. HBH stok kültürlerin genel görüntüsü (Susurluk ve Doğan, 2023)



Şekil 3.4. Stokta 4-6 °C saklanan HBH kültürleri (Susurluk ve Doğan, 2023)

Genellikle entomopatojen nematodların etkinliği ile ilgili yapılan çalışmlarda larva üzerine uygulanacak olan IJ adetinin miktarı büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, flakslar içerisindeki IJ miktarının belirlenmiş ve akabinde dozaj hesaplaması gerçekleştirilmiştir. Dozaj hesaplama işlemi için flakslardan 20 µl sıvı, mikropipet kullanılarak alınmış ve sayım kabına aktarılmıştır. Ringers solüsyonu ilave edilip nazikçe çalkalanarak IJ'lerin sayım kabı içerisinde yayılması sağlanmıştır. Daha sonra, alınan örnek stereo mikroskop altında sayılmıştır. Bu işlem beş defa tekrarlanmıştır. 20 µl içerisindeki ortalama IJ miktarı belirlenmiş ve flask üzerine not edilmiştir.

3.3. *In vivo* Ortamda HBH üretimi

Enfeksiyon işlemi, toplamda 24 adet kuyucuğa sahip, derinliğin 2 cm ve çapı 1,5 cm olan plateler içinde gerçekleştirilmiştir. Bu sebeple her bir kuyucuğa ortalama 1 larva konulmuş ve üzerleri %10 oranında steril Ringers solüsyonuyla ıslatılmıştır 2,5 cm^3 steril kumla kaplanmıştır. Daha sonra yaklaşık 40 IJ/larva dozunda IJ inokülasyonu yapmak için içerisine larva eklenip, üzeri kum ile örtülmüş olan kuyucuklara uygulanmıştır ve parafilm kullanılarak plate kapakları sarılmıştır (Şekil 3.5.). Plateler 4 gün süreyle 25 °C'de inkübe edilmiştir. Plateler içerisinden 4 gün sonrasında alınan larvalar steril Ringers solüsyonuyla yıkanmış ve akabinde White trap üzerine yerleştirilmiştir. White trap düzeneğini oluşturmak için çapları 6 cm ve 9 cm Petri kapları tercih edilmiştir. 9 cm çapındaki Petri kapları içerisine, 6 cm çaplı bir Petri kapağı yerleştirilmiş üzeri filtre kağıdıyla kaplanmıştır ve üzerine 20 ml steril Ringers solüsyonu ilave edilerek kapatılmıştır (Şekil 3.6.). 4 gün sonra enfekte larvalardan yeni nesil IJ'lerin biriktiği steril Ringers solüsyonu, 200 ml'lik flasklara pastör pipeti yardımıyla aktarılmıştır. Bu nesil, çalışmada kullanılmak üzere 4-6ºC'de buzdolabında saklanmıştır.



Şekil 3.5. Plate içerisinde HBH inokülasyonu (Susurluk ve Doğan, 2023)



Şekil 3.6. Plate içerisinde HBH inokülasyonu (Susurluk ve Doğan, 2023)

3.4. *In vitro* Ortamda HBH Üretimi

3.4.1. Simbiyont Bakteri İzolasyonu

Bu işlem için, *Galleria mellonella* olgun larvalarının her biri 100 IJ miktarında EPN ile inokülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. "EPN Enfeksiyon Denemesinin Kurulması ve *in vivo* EPN Üretimi" bölümünde belirtildiği gibi inokülasyon işlemi, platelerde gerçekleştirilmiştir. Platelerin her bir kuyucuğuna larva yerleştirilmiş ve üzerleri %10 steril Ringers solüsyonu ile ıslatılmıştır 3 cm^3 sterilize edilmiş kumla örtülmüştür. Belirtilen dozda IJ inokülasyonu yapılarak platelerin kapağı parafilm ile kapatılmış ve 1 gün süreyle 25 °C'de inkübe edilmiştir. Bir gün sonunda larvalar Plate içerisinde çıkarılarak steril Ringers solüsyonuyla yıkanmış ve her bir larva eppendorf tüpler içerisinde %70'lik etil alkolle sterilize edilmiştir (Şekil 3.7). Sterilizasyon işleminden sonra, her bir larvanın ventral tarafı steril bir iğne ucuyla hafifçe delinerek vücut sıvısı (hemolimf) alınmıştır (Şekil 3.8). Elde edilen larva hemolimfi sterilize edilmiş bir öze aracılığıyla alınarak NBTA agara ekilmiştir. Petriler kapakları parafilmle sarılarak 3 gün 25 °C'de inkübe edilmiştir (Çizelge 3.3). 3 günün sonunda agar üzerinde koloni gelişimi gözlemlenen bakterilerden steril bir öz yardımıyla bir ya da birkaç koloni alınarak, 80 ml steril olan YS sıvı besin ortamlarına alınmıştır (Şekil 3.9).

Sterilize edilmiş olan YS sıvı besin içeriği, 200 rpm hızında çalışan ve 25 °C'de sıcaklık kontrollü orbital çalkalayıcıya yerleştirilerek inkübasyona bırakılmıştır ve bu besi yerinde bakteriler üretilmiştir (Şekil 3.10) (Çizelge 3.4). 1 gün sonunda YS sıvı besi ortamında gelişen bakteriler stok kültür oluşturmak amacıyla alınmış ve %15 steril gliserin içerisine eklenmiştir. Elde edilen sıvı, eppendorf tüplere (1.5 ml) alınarak sonraki aşamalarda kullanılmak maksadıyla -20 °C'de tutulmuştur (Şekil 3.11).



Şekil 3.7. Enfekteli *G. mellonella* larvasının dezenfeksiyonu (Susurluk ve Doğan, 2023)

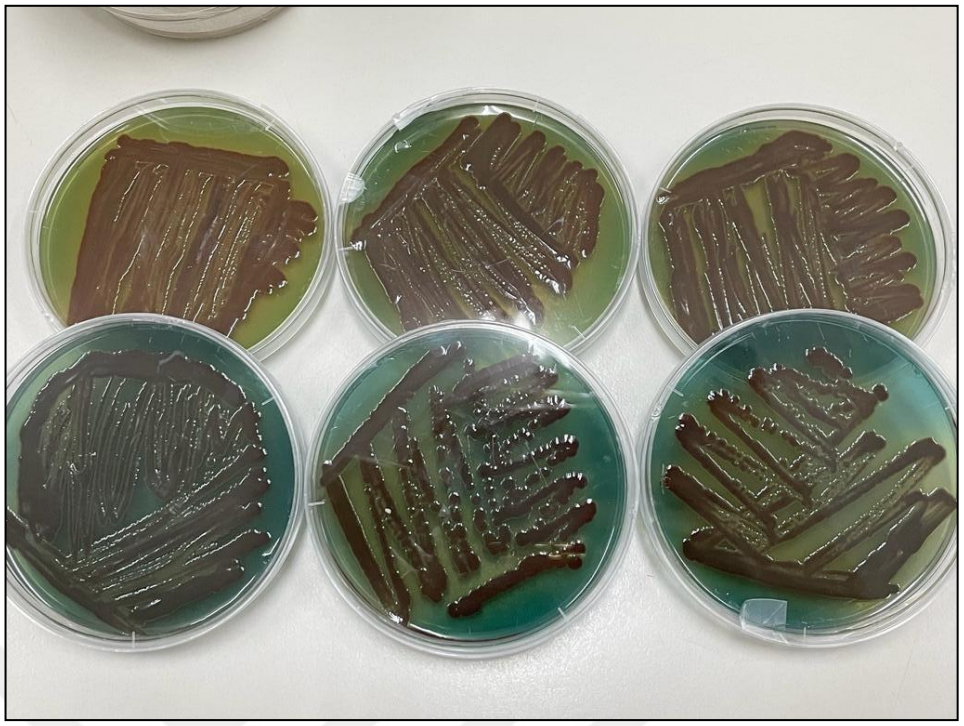


Şekil 3.8. Enfekteli *G. mellonella* larvasının hemolimfinin izolasyonu. (Susurluk ve Doğan, 2023)

3.4.2. NBTA Agar İçeriği

Çizelge 3.3. NBTA Agar İçeriği

Kimyasal Maddeler	Miktar (g)
2,3,5-Triphenyl-tetracoliumchloride	4
Bromthymolblue	0.025
Saf Su	1000
Standard-I-Nutrient Agar	37.0



Şekil 3.9. *Photorhabdus* spp. nin NBTA agar ortamında gelişimi (Susurluk ve Doğan, 2023)

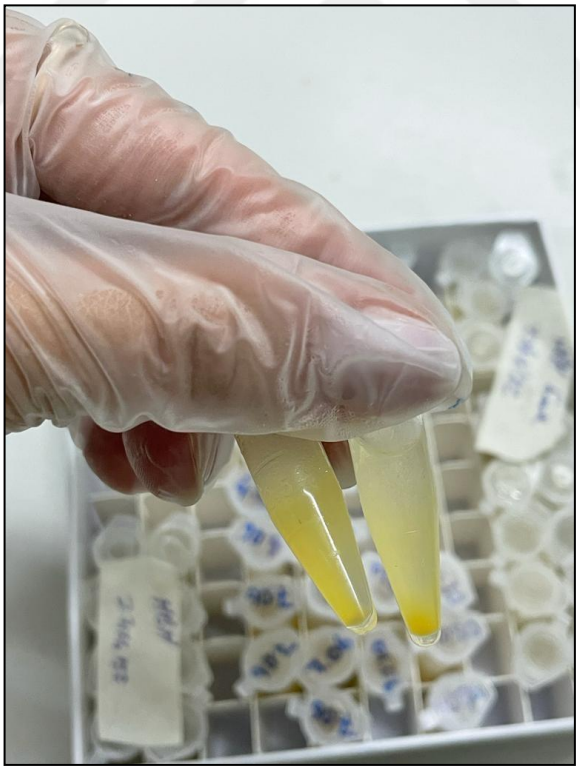
3.4.3. YS Sıvı Besin Ortamı

Çizelge 3.4. YS Sıvı Besin Ortamı

Kimyasal Madde Adı	Miktar(g)
$NH_4H_2PO_4$	0.5
K_2HPO_4	0.5
Yeast extract	5.0
NaCl	5.0
Saf su	1000



Şekil 3.10. *Photorhabdus* spp. nin YS sıvı besi ortamında gelişimi (Susurluk ve Doğan, 2023)

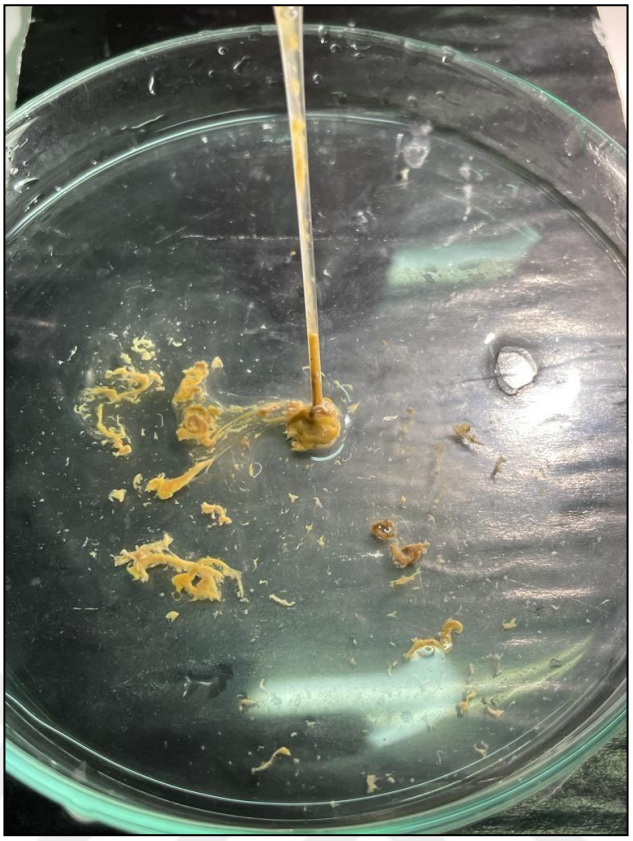


Şekil 3.11. *Photorhabdus* spp. nin kültüre alınması ve stoklanması (Susurluk ve Doğan, 2023)

3.4.4. Yumurta İzolasyonu İşlemi

50 IJ miktarında *H. bacteriophora* kullanılarak *G. mellonella*'nın 6. dönem larvaları, inoküle edilmiştir. Sonrasında, 25 ºC'de 4 gün boyunca inkübe edilerek enfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Bu işlem 24 kuyucuklu platelerde gerçekleştirilmiştir, her bir kuyucuğa 1 adet *G. mellonella* larvası yerleştirilmiş ve üzerleri %10'luk steril Ringers solüsyonu ile ıslatılmış 3 cm^3 steril kumla kaplanmıştır. Kuyucuklara belirlenmiş olan dozda IJ'ler mikro pipet kullanılarak uygulanmıştır. Kuyucuklu kapların kapağı parafilm ile kapatılmıştır.

4 gün sonra, IJ enfeksiyon denemesi için kurulan kuyucuklu kaplar açılmıştır. Ölü larvalar steril su ile üzerlerinde bulunan toprağın arındırılması için yıkanmıştır. Devamında, Ringers solüsyonu içeren Petri kabında diseksiyon yapılmıştır (Şekil 3.12). Yaklaşık 200 adet hermafrodit birey, nematod iğnesi aracılığıyla ayrıştırılmıştır ve sterik Ringers solüsyonu içeren 6 cm'lik Petri kaplarına yerleştirilmiştir. Mikroskop altında hermafroditlerin yumurtalarının döllenme durumu gözlemlenmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.12. Enfekteli *G. mellonella* larvalarının disekte işlemi (Susurluk ve Doğan, 2023)



Şekil 3.13. Hermafrodit bireyler içerisinde gelişen yumurtaların mikroskop görüntüsü (Susurluk ve Doğan, 2023)

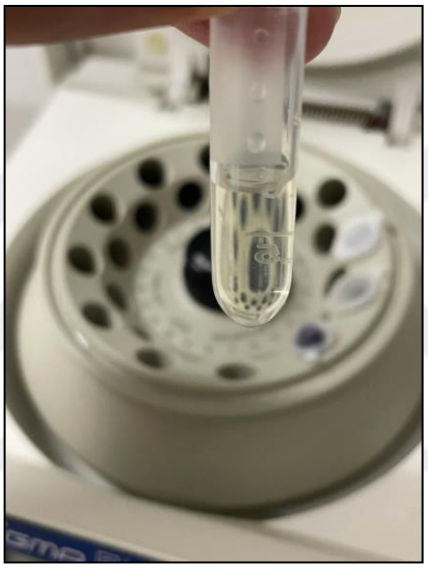
Elde edilen hermafrodit bireylerin tümü, pastör pipet kullanılarak cam tüplere alınmıştır ve üzerine 5 ml steril Ringers solüsyonu ilave edilmiştir (Şekil 3.14). Hermafrodit bireylerin yumurtalarını çıkarmak için parçalanmış jiletler cam tüp içerisine konulmuştur. Cam tüp, vorteks yardımıyla 1-2 dakika boyunca çalkalanmıştır. Bu içerik, yumurtaların açığa çıkmasıyla şeffaflığını kaybederek bulanıklaşmıştır. Sonrasında bu içerik, 72 µm'lik bir tülle süzülmüş ve artıklardan arınmıştır. Tülün altındaki yumurtalarında bulunduğu sıvı farklı bir tüpe aktarılmıştır. Süreç, hermafroditlerden yeterli miktarda yumurtaya ulaşılıncaya dek tekrarlanmıştır.



Şekil 3.14. *G. mellonella* larvalarından disekte edilen HBH'lerin hermafrodit bireylerinin görüntüsü (Susurluk ve Doğan, 2023)

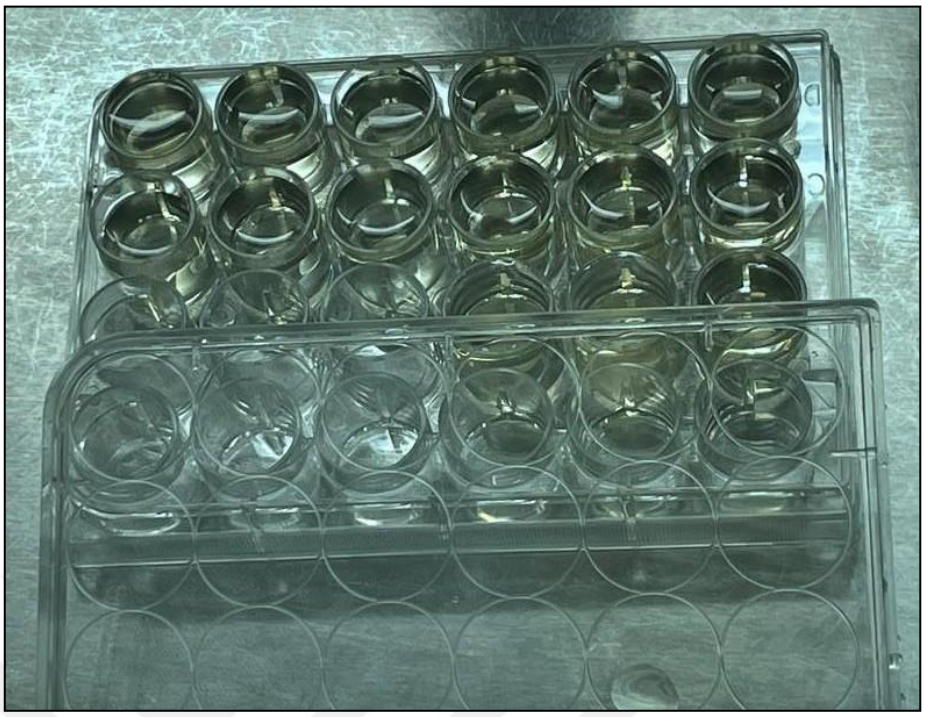
Yumurtalar, Steril Ringers solüsyonu içindeki cam tüpten eppendorf tüpler (1.5 ml) içerisine aktarılmıştır. Daha sonra, 2000 rpm hızında 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, mikro pipet kullanılarak eppendorf tüplerinin dibine çöken yumurtaların üstündeki sıvı alındı. Son olarak, steril Ringers solüsyonu eklenerek tekrar 2000 rpm hızında 1 dakika boyunca santrifüj edildi. (Şekil 3.15).

Bu süreç, *G. mellonella* hermafroditlerini ve yumurta kalıntılarını arındırmak için 3 kez yinelenmiştir. Son santrifüj işleminden yumurtaların dibe çökmesi sonucunda yumurtaların üzerinde bulunan sıvı tüp içerisinden ayrıştırılmıştır. Yumurtaların sterilizasyonunu gerçekleştirmek sebebiyle sterilizasyon solüsyonu tüpteki yumurtaların üzerine ilave edilmiştir (Çizelge 3.5). Hazır hale getirilen tüpler, 3-4 dakika çalkalandıktan sonra 2-3 dakika süresince 3000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Sterilizasyon işleminin çok uzun sürmemesine dikkat edilmiş ve yumurtaların yüzey sterilizasyon işlemi 7 dakikayı aşmamıştır.



Şekil 3.15. Hermafrodit bireylerden elde edilen yumurtaların santrifüj edilmesi (Susurluk ve Doğan, 2023)

Santrifüjden sonra sterilizasyon sıvısı tüpteki dibe çökmüş olan yumurtaların üstünden, pastör pipet aracılığıyla ayrıştırılmıştır. YS sıvı besin ortamı, tüpteki yumurtaların üzerine eklenerek 2 dakika süreyle 3000 rpm hızında santrifüj edilmiştir. Son santrifüj işleminin devamında steril kabin içinde 300 µl steril olan YS sıvı besin ortamına yumurtalar eklenmiş sonrasında steril Platelere alınmıştır (Şekil 3.16). Plate kapakları parafilm ile sarılmıştır. 48 saat boyunca, 25 ºC'de inkübe edilmiştir. Süre sonunda açılan yumurtadan dışarı çıkan IJ'lerde bulaşıklık olup olmadığı incelenmiştir.



Şekil 3.16. Santrifuj edilen HBH yumurtalarının YS sıvı besi ortamına aktarılması (Susurluk ve Doğan, 2023)

Çizelge 3.5. Sterilizasyon Solüsyonu İçeriği

Kimyasal Maddeler	Miktar (g)
Saf su	10
4MNaOH	1
NaOCl	1

3.4.5. HBH'lerin Katı Besi Ortamına Aktarılması

In vitro üretim amacıyla ilk olarak, öncesinde izole edilen eppendorf tüplerde (1.5 ml) -20°C'de saklanan *Photorhabdus* spp. simbiyotik bakteri stoğundan iki adet alınmıştır ve oda sıcaklığında bu bakterilerin buzu çözünmüştür. Çözülen simbiyotik bakteriler, steril YS sıvı besin ortamı içeren 250 ml'lik erlen içine aktarılmıştır. Sonrasında, karanlık bir ortamda ve 25°C'de 180 rpm hızında inkübasyon yapılmıştır ve simbiyotik bakterileri kültürlerinin üremesi sağlanmıştır.

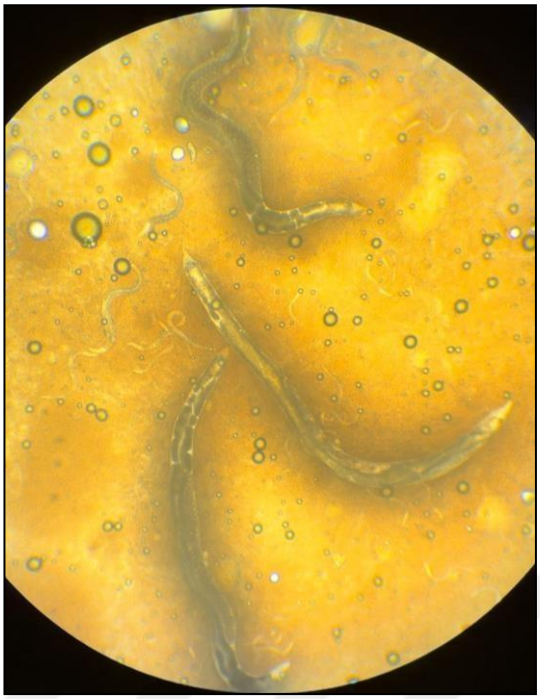
YS sıvı besin ortamında elde edilmiş olan bakteri kültüründen ortalama 5-6 damla (100 µl) alınarak, yaklaşık 6 cm çapında Petri kaplarda bulunan nutrient lipid agar (WOUTS Agar) ortamına inoküle edilmiştir ve bir gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Çizelge 3.6). YS sıvı besi ortamında inkübe edilen yumurtalar, 48 saatlik bir inkübasyon sürecinin ardından başarılı bir şekilde açılmıştır ve çıkan birinci dönem juveniller (J1) WOUTS Agar ortamına aktarılmıştır. Petri kapakları parafilm ile bantlanmıştır ve 25°C'de ışıksız bir ortamda inkübe edilmiştir. Besin olarak bakteri içeren agarda bulunan bireyler, besin sinyalini alarak beslenmeye başlamıştır ve üremeleri sağlanmıştır (Şekil 3.17). IJ'lerin gelişiminin gözlemlenmesi amacıyla tüm Petri kapları, iki hafta boyunca günlük olarak kontrol edilmiştir (Şekil 3.18). IJ'lerin Petri kapaklarına çıktığı durumlarda, kapaklar steril Ringers solüsyonu ile yıkanmıştır ve IJ'ler flasklara aktarılmıştır (Şekil 3.19). Bu aşamalar sonucunda EPN'ler, *in vitro* katı yapay ortamda üretilmiştir.

Çizelge 3.6. WOUTS Agar İçeriği

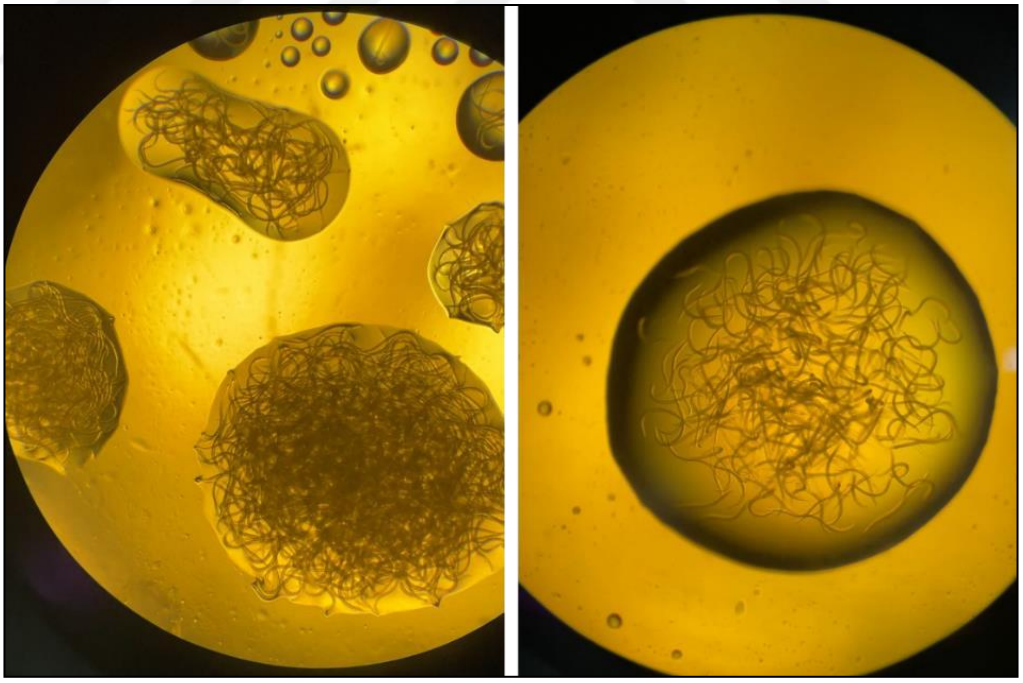
Kimyasal Maddeler	Miktar (g)
Saf Su	1000
Bacto Agar (Difco)	12.0
Bacto Nutrient Broth (Difco)	16.0
Ayçiçeği yağı	5.0



Şekil 3.17. HBH'nin WOUTS agar ortamında gelişimi (Susurluk ve Doğan, 2023)



Şekil 3.18. WOUTS agar ortamındaki HBH'nin mikroskop görüntüsü (Susurluk ve Doğan, 2023)



Şekil 3.19. WOUTS agar ortamında gelişen IJ'lerin Petri kapağındaki mikroskop görüntüsü (Susurluk ve Doğan, 2023)

3.5. Y- Olfaktometrenin Hazırlanışı

Olfaktometre, kelime anlamı olarak koku duyarlılık ölçer olan bir araçtır ve EPN'lerin doğal olmayan yaşam alanında konukçu bulma davranışlarının araştırılmasında Y-Olfaktometre düzeneğinin yarayışlı bir ekipman olduğu gözlemlenmiştir (Boff ve ark., 2001). Deneylerde kullanılan Y-Olfaktometre düzeneğinin her kol uzunluğu 10 cm'dir. Uç kısımları ise takılıp çıkarılabilen bir kapaktan oluşur. Olfaktometre düzeneğinindeki tüm kollar, bir metal parçaya bağlanır ve IJ'lerin Y-Olfaktometre düzeneğine aktarılabilmesi için metal parçanın tam ortasında yuvarlak bir delik bulunur. Metal parçanın her bir kolunun uzunluğu, boru bağlantısından itibaren 2,5 cm'dir. Y-Olfaktometre düzeneğinin iç hacmi, boru çapının 2,5 cm olduğu göz önünde bulundurularak yaklaşık olarak 184 cm^3 olarak hesaplanmıştır. Y-Olfaktometre düzeneğinin her bir koluna farklı isimler verilmiştir ve her tekrarda kollar aynı açıda konumlandırılmıştır. Metal bölmenin delik kısmı üste gelecek şekilde yatay konumda bulunurken, Y-Olfaktometrenin sol koluna "Kontrol 1" (K1), sağ koluna "Kontrol 2" (K2) ve aşağıdaki kolu ise "Larva Kolu" (L) olarak adlandırılmıştır (Şekil 3.20).

Kollar ve orta nokta, %10 saf su ile nemlendirilen kuvars kumu ile doldurulmuştur. Y-Olfaktometre düzeneğinde, L kolunun en uç noktasına 3 adet 6. dönem *G. mellonella* larvası yerleştirilmiştir (Şekil 3.21). Larvaların düzenek içinde gezinmesini önlemek amacıyla borunun kapak kısmına metal kafes yerleştirilmiştir (Şekil 3.22). Düzeneğin orta noktasında bulunan açıklıktan mikropipet yardımıyla 1000±50 IJ'nin inokülasyonu sağlanmış ve nem kaybının yaşanmaması amacıyla metal parçadaki açıklık ve tüm birleşme noktaları parafilm ile sarılmıştır. Son olarak, hazırlık tarihi içeren etiketleme işleminin akabinde Y-Olfaktometre 2 ve 4 gün süreyle 25 ˚C'ye ayarlanmış bir etüvde inkübe edilmiştir. 2 ve 4 günün sonunda açılan ve Y-Olfaktometreden dışarıya çıkarılan kadavralar, kumdan ayrıldıktan sonra bir Petri kabına alınmış ve Ringers solüsyonu ilave edilerek parçalanmıştır. Disekte edilmiş olan kadavralarda bulunan EPN'lerin Ringers solüsyonuna geçmesi için pastör pipeti kullanılmıştır. Ayrıca, Y-Olfaktometre düzeneğindeki kollardan çıkarılan kuvars kumu, elekler üzerinde yıkanmış ve olfaktometre düzeneğinin kollarına yönelen EPN'ler ayrıştırılmıştır. Elde edilen EPN'lerin inverted mikroskopta sayımı gerçekleştirilmiştir. Yapılan sayımlarda larva

içerisine enfekte olan ve kum içerisinden ayrıştırılan EPN'ler sayılmış, Y-Olfaktometre kollarına yönelim miktarları belirlenmiştir.



Şekil 3.20. Çalışmada kullanılan Y-Olfaktometre düzeneği (Susurluk ve Doğan, 2023)



Şekil 3.21. Y-Olfaktometre düzeneğinin silis kumu ile doldurulması (Susurluk ve Doğan, 2023)



Şekil 3.22. Y-Olfaktometre içerisindeki *G. mellonella* larvalarının kafes düzeneği (Susurluk ve Doğan, 2023)

3.5.1. Silis Kumu

Silis kumu ya da kuvars kumu olarak da adlandırılır (Hacıfazlıoğlu, 2011). Bu kum, yerkabuğunda bol miktarda bulunur ve cam, döküm ve refrakter sanayi gibi başlıca sektörlerde kullanılır. Ayrıca inşaat sektörlerü başta olmak üzere kimya ve filtrasyon gibi sektörlerde de tercih edilir (Kurşun ve İpekoğlu, 1995). Kuvars kumunun ayrıca akvaryumlar için de kullanıldığı bilinir.

3.6. İstatistiksel Analiz

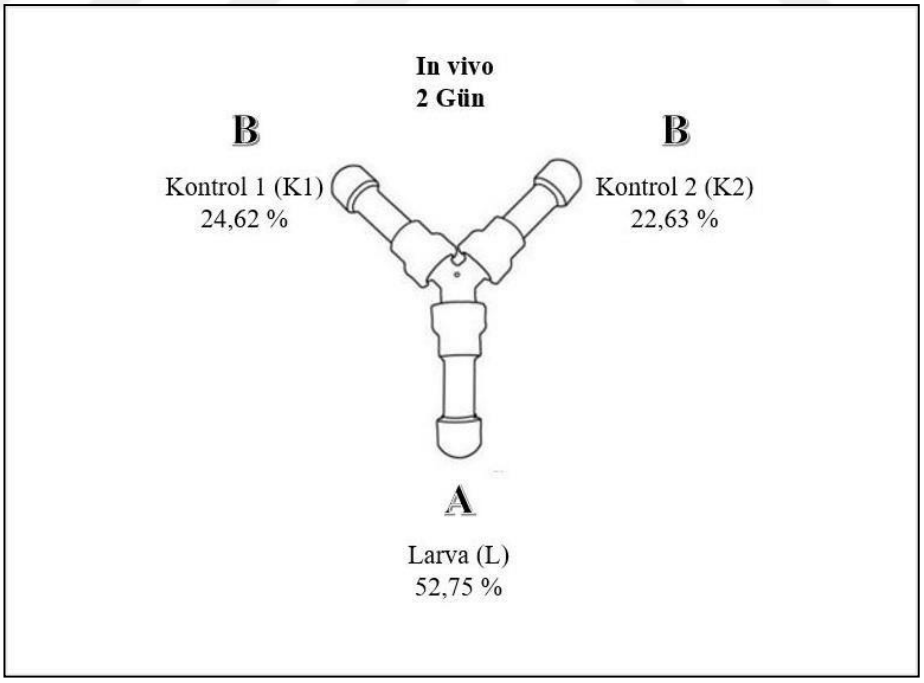
Heterorhabditis bacteriophora HBH hibrit ırkının *In vivo* ve *in vitro* üretimle elde edilen bireylerinin Y-olfaktometre düzeneğinde konukçu arama davranışlarının, istatistiksel olarak anlam farklılıklarını belirlemek amacıyla tek yönlü ANOVA (varyans analizi) yöntemi uygulanmıştır. Yönelim ortalamalarının karşılaştırılması için p = 0,05 düzeyinde LSD (Least Significant Differences) testi kullanılmıştır. Analizler, JMP® 16.0 istatistiksel analiz programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. *In vivo Üretimle* Elde Edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkının Y-Olfaktometre İçerisinde 2. Günde Yönelimi

Bu tez çalışmasında, laboratuvar böceği olarakda kullanılan *G. mellonella* 6. dönem larvaları *H. bacteriophora* HBH hibrit ırkı ile 1000±50 IJ miktarında enfeksiyon denemesi oluşturulmuştur. Bu denemenin devamında 2. ve 4. günlerde olfaktometre düzenekleri açılmış ve kollardaki (K1, K2, L) ve Larva kollarındaki inoküle olan *G. mellonella* larvaları disekte edilerek içerisinde bulunan IJ'ler sayılmıştır.

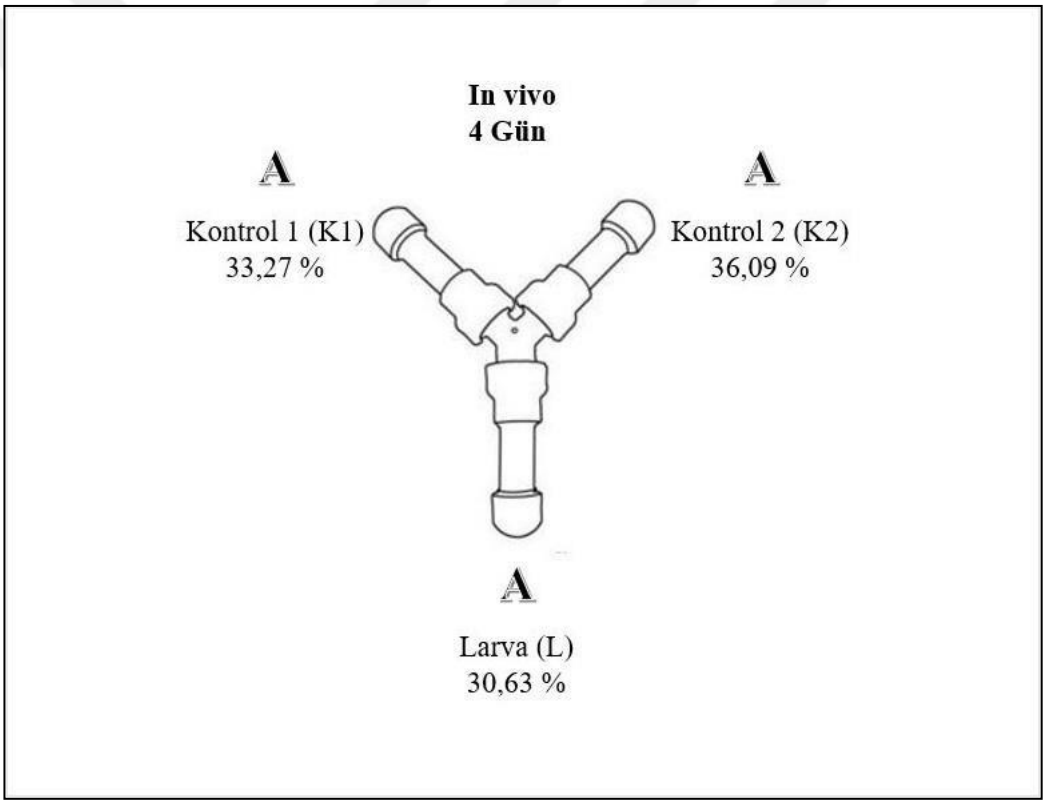
Elde edilen veriler sonucunda K1 kolunda bulunan IJ'lerin ortalama miktarı 215 adet (24,62%) olarak belirlenmiştir. K2 kolunda bu değer 197,667 adet (22,63%) olarak bulunmuştur. L kolunda bu değer kontrol kollarına kıyasla artış göstermiştir. L kolunda bulunan IJ miktarı ortalama olarak 460,667 adet (52,75%) olarak bulunmuştur. Bu değerler karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark belirlenmiştir (F=292,537; df=2,6; P<0.0001) (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. *In vivo* üretimle elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH bireylerinin 2. Günde K1, K2 ve L kollarına yönelim dağılımı (F=292,537; df=2,6; P<0.0001)

4.2. *In vivo* Üretimle Elde Edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkının Y-Olfaktometre İçerisinde 4. Günde Yönelimi

Elde edilen veriler sonucunda 4. günde K1 kolunda bulunan IJ'lerin ortalama miktarı 298,333 adet (33,27%) olarak belirlenmiştir. K2 kolunda bu değer ortalama 323,667 adet (36,09%) olarak bulunmuştur. L kolunda bu değer kontrol kollarına kıyasla ortalama miktar olarak azalma göstermiştir. L kolunda bulunan IJ miktarı ortalama olarak 274,667 adet (30,63%) olarak bulunmuştur. Bu değerler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmemiştir (F=0,8153; df=2;6, P<0,4862) (Şekil 4.2.).

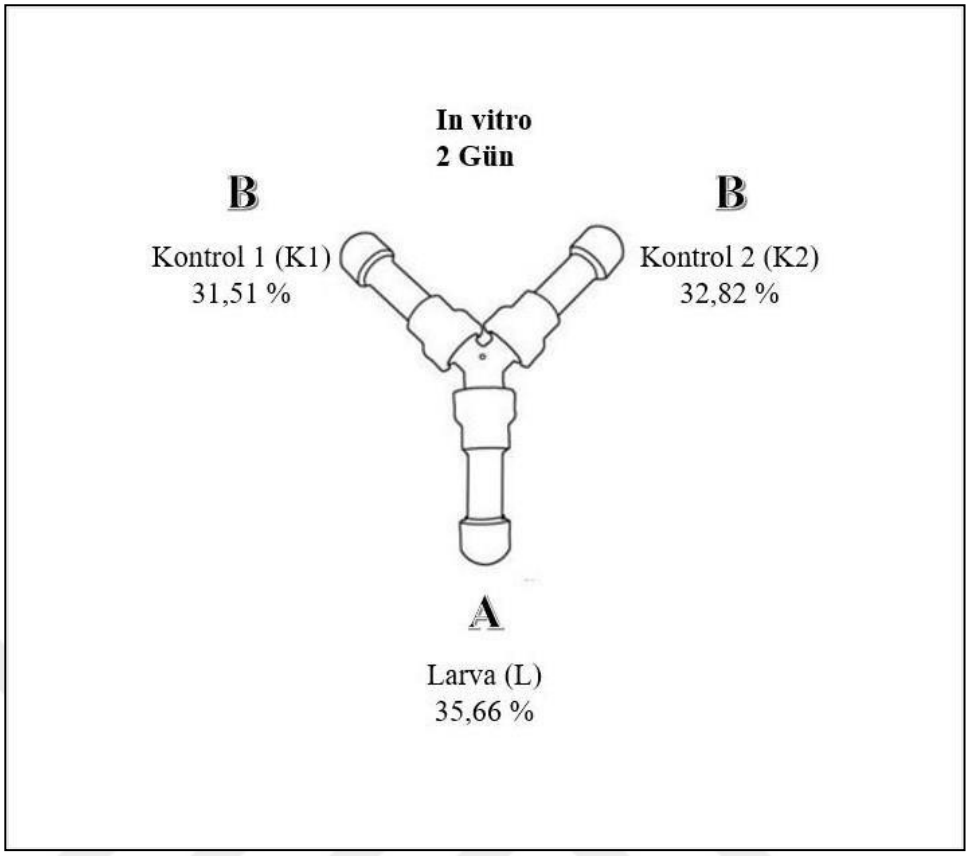


Şekil 4.2. *In vivo* üretimle elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH bireylerinin 4. Günde K1, K2 ve L kollarına yönelim dağılımı (F=0,8153; df=2;6, P<0,4862)

4.3. *In vitro* Üretimle Elde Edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkının Y-Olfaktometre İçerisinde 2. Günde Yönelimi

In vivo üretimle elde edilen *H. bacteriophora* HBH ırkının Y-Olfaktometre içerisinde yönelim potansiyelinin belirlendiği çalışma için uygulanan prosedürler benzer bir şekilde *in vitro* üretim sonucunda elde edilmiş olan HBH'ler içinde uygulanmıştır. *G. mellonella* 6. dönem larvaları, *H. bacteriophora* HBH ırkı infektif jüveniller ile 1000 IJ dozunda enfeksiyon uygulaması oluşturulmuştur. Bu uygulamanın devamında 2. ve 4. günlerde olfaktometre düzenekleri açılmış ve kollardaki (K1, K2, L) ve larva kollarındaki inoküle olan *G. mellonella* larvaları disekte edilerek içerisinde bulunan IJ'ler sayılmıştır.

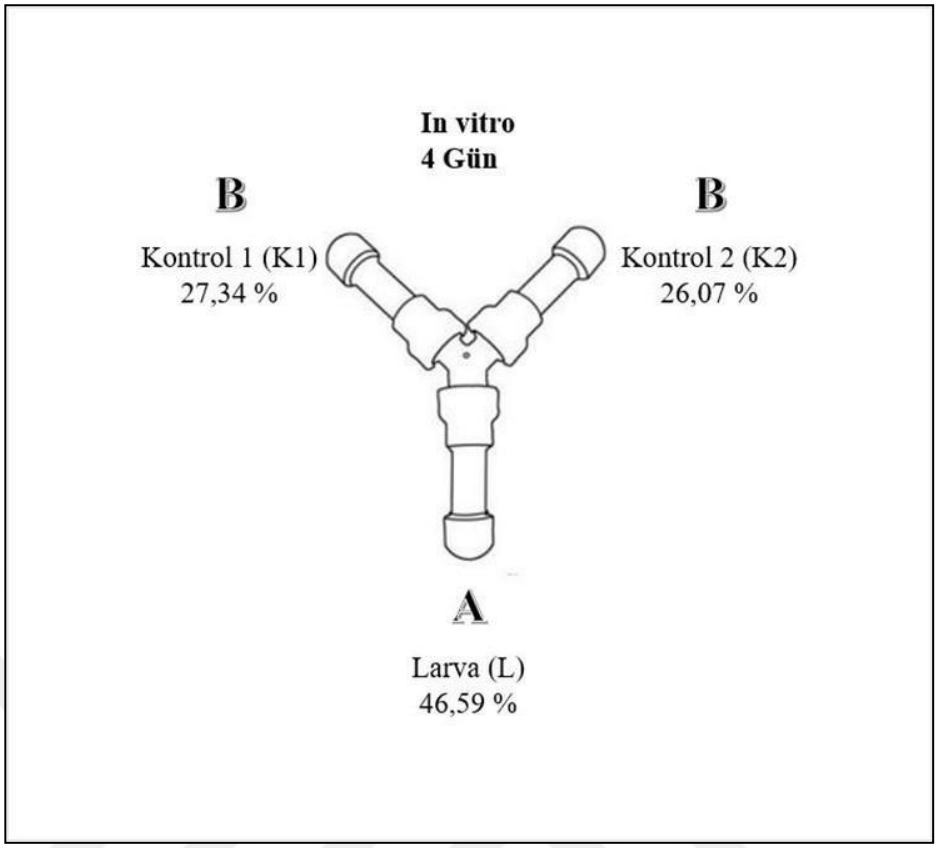
Elde edilen veriler sonucunda 4. günde K1 kolunda bulunan IJ'lerin ortalama miktarı 296 adet (31,51%) olarak belirlenmiştir. K2 kolunda bu değer 308,333 adet (32,82%) olarak bulunmuştur. L kolunda bu değer kontrol kollarına kıyasla ortalama miktar olarak artış göstermiştir. L kolunda bulunan IJ miktarı ortalama olarak 335 adet (35,66%) olarak bulunmuştur. Bu değerler karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark elde edilmiştir ($F=15,5945$; $df=2;6$, $P<0,0042$) (Şekil 4.3.)



Şekil 4.3. *In vitro* üretimle elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH bireylerinin 2. Günde K1, K2 ve L kollarına yönelim dağılımı (F=15,5945; df=2;6, P<0,0042)

4.4. *In vitro* Üretimle Elde Edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkının Y-Olfaktometre İçerisinde 4. Günde Yönelimi

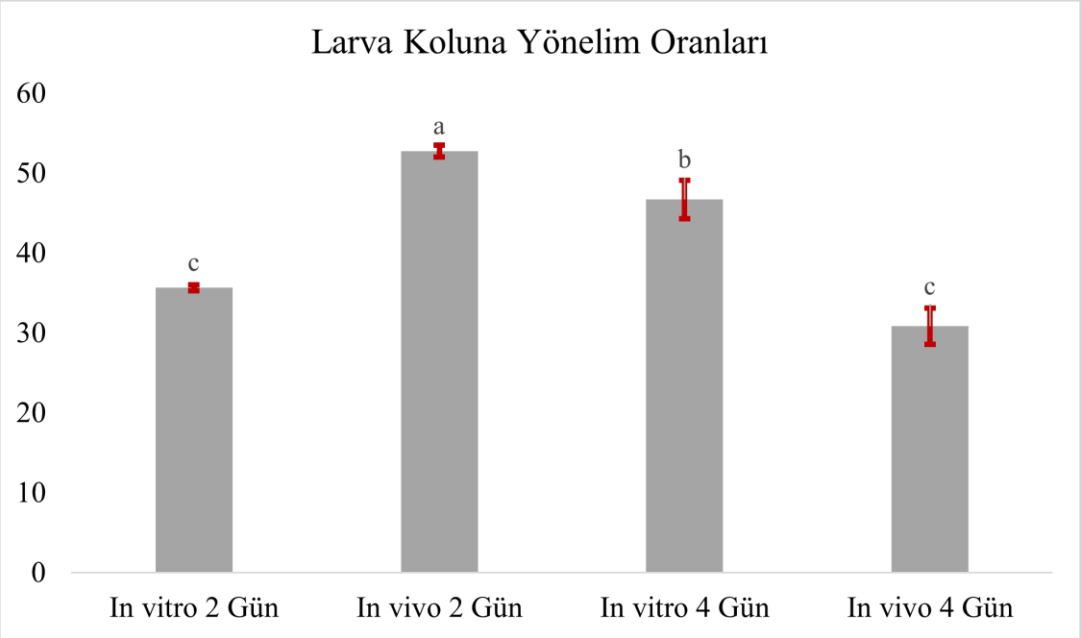
Elde edilen veriler doğrultusunda, 4. günde K1 kolunda bulunan IJ'lerin ortalama miktarı 180,333 adet (27,34%) olarak saptanmıştır. K2 kolunda bu değer 172 adet (26,07%) olarak tespit edilmiştir. L kolunda ise kontrol kollarıyla karşılaştırıldığında ortalama miktar olarak artış görülmüştür. L kolunda bulunan IJ miktarı ortalama olarak 307,333 adet (46,59%) olarak bulunmuştur. Bu değerlerin karşılaştırılması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (F=26,4449; df=2;6, P<0,0011) (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. *In vitro* üretimle elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH bireylerinin 4. Günde K1, K2 ve L kollarına yönelim dağılımı (F=26,4449; df=2;6, P<0,0011)

4.5. *In vitro* ve *in vivo* Üretimle Elde Edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkının Y-Olfaktometrede Larva Kollarına Yöneliminin Karşılaştırılması

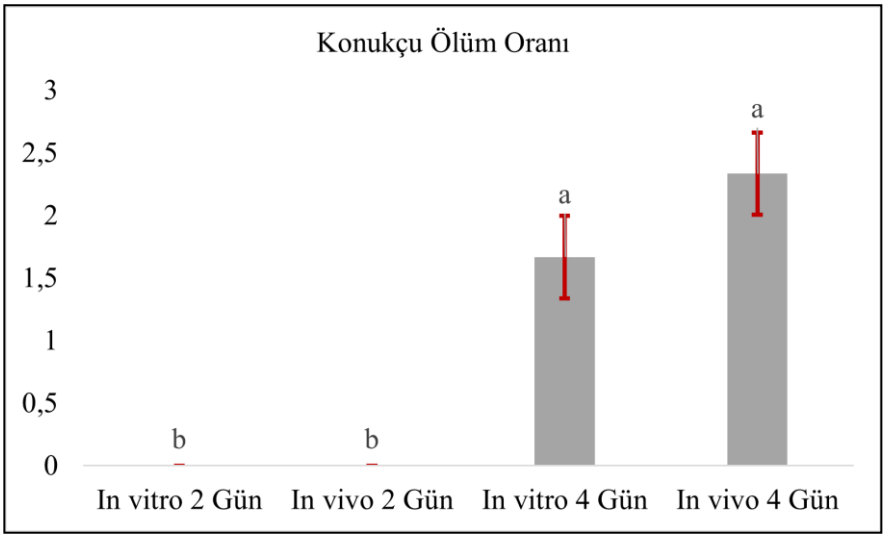
In vitro ve *in vivo* üretimle elde edilen *H. bacteriophora* HBH'nin 2. ve 4. günler sonunda, Y-Olfaktometrelerin L kollarına gösterdikleri yönelimler yüzdelik ifadeler ile belirlenmiştir. L koluna yönelim *in vivo* 2. günde %52,76, *in vivo* 4. günde %30,83 olarak belirlenmiştir. *In vitro* 2. günde %35,65, *in vitro* 4. günde ise L koluna yönelim %46,7 olarak belirlenmiştir. Tüm bu değerler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar elde edilmiştir (F=34.946; df=2;8, P<0.0001) (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. *In vitro* ve *in vivo* üretimle elde edilen *H.bacteriophora* HBH hibrit ırkı bireylerinin *G. mellonella* larvalarına yönelim davranışının karşılaştırılması (F=34.946; df=2;8, P<0.0001)

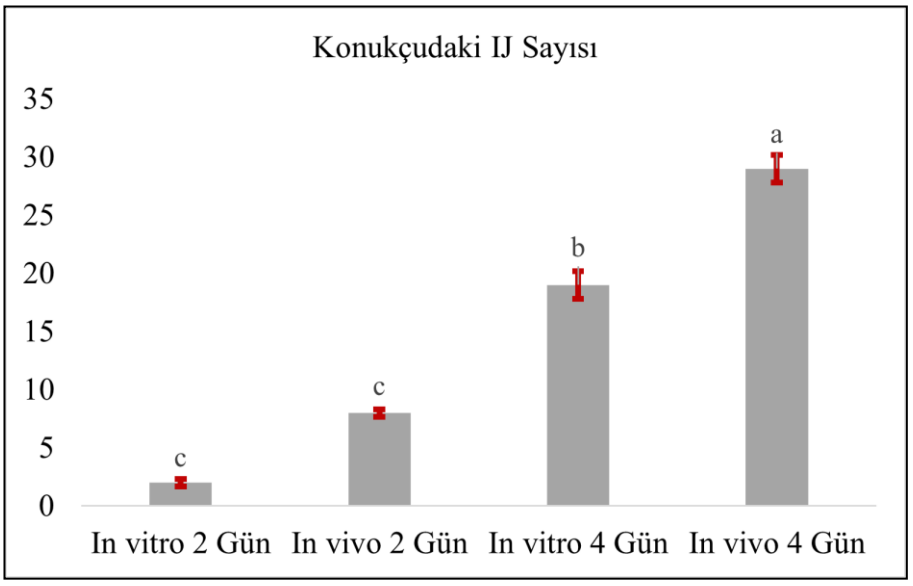
4.6. *In vitro* ve *in vivo* Üretimle Elde Edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkı IJ'lerinin Konukçudaki Sayısının ve Ölü Konukçu Sayısının Belirlenmesi

In vitro ve *In vivo* üretimle elde edilen *H. bacteriophora* HBH'nin 2. ve 4. günler sonunda, konukçu içerisine giren IJ sayısı ve enfeksiyon sonucunda ölümü gerçekleşen *G. mellonella* larvalarının sayısı karşılaştırılmıştır. Deneydeki tekerrürlerdeki toplam larva ölüm sayıları, *in vivo* 2. günde 0, 4. günde 7 olarak belirlenmiştir. Bu değerler *in vitro* 2. günde 0, 4. günde 5 olarak belirlenmiştir. İstatiksel olarak karşılaştırıldığında 2. ve 4. gün arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (F=25.333; df=3;8, P<0.0002) (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. *G.mellonella* larvalarının ölüm oranlarının karşılaştırılması (F= 46,768; df= 7, 32; P= <,0001)

Deneydeki tekerrürlerdeki toplam konukçudaki IJ sayıları, *in vivo* 2. günde 8, 4. günde 29 olarak belirlenmiştir. Bu değerler *in vitro* için 2. günde 2, 4. günde 19 olarak belirlenmiştir. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında hem gün hem de üretim yöntemleri açısından anlamlı bir fark elde edilmiştir (F=47.667; df=3;8, P<0.0004) (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. *In vivo* ve *in vitro* sonucu elde edilen *H. bacteriophora* HBH ırkı bireylerinin konukçudaki IJ sayılarının karşılaştırılması (F=47.667; df=3;8, P<0.0004)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, EPN *H. bacteriophora* HBH hibrit ırkının *in vitro* ve *in vivo* üretim sonrası konukçu arama davranışlarının araştırılması amaçlanmıştır. EPN'ler, birçok zararlı böceğe karşı biyolojik mücadelede kullanılan etkili bir etmen olarak bilinir. Bu çalışma, bu nematodların kitle üretim şekillerine göre konukçu arama sürecini anlamak için önemli bir adım olmuştur. Bu tez çalışmasında, entomopatojen nematodların (EPN) *in vivo* ve *in vitro* üretim sonrası konukçu arama davranışlarını araştırmayı amaçlamıştır. Yapılan çalışmada, EPN'lerin biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılabilmesi için farklı üretim yöntemleri ile elde edilen EPN'lerin konukçu bulma yeteneklerini ve bu yeteneğin farklı üretim yöntemleri ile ilişkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, EPN'lerin konukçu arama davranışlarının üretim yöntemlerine bağlı olarak farklılık gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Yapılan çalışmanın sonuçlarında, 2. gün sonunda *in vivo* üretim ile elde edilen HBH'lerin *in vitro* üretim ile elde edilen HBH'lere göre konukçuya yöneliminin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. 4. gün sonunda ise *in vitro* üretim ile elde edilen HBH'lerin *in vivo* üretim ile elde edilen HBH'lere göre konukçuya yöneliminin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Hem 2. gün hem 4. günde larva kollarına yönelen IJ miktarlarına bakıldığında en fazla yönelimin *in vivo* 2. günde olduğu belirlenmiştir, bunu sırasıyla *in vitro* 4. gün, *in vitro* 2. gün ve *in vivo* 4. gün takip etmektedir. Enfekte olan larvalar incelendiğinde konukçudaki en fazla IJ miktarı *in vivo* 4. günde görülmüştür. Konukçuda meydana gelen ölüm oranları da incelenmiştir. Konukçuda görülen en yüksek ölüm oranı *in vivo* 4. günde görülmüştür.

In vivo üretim ile elde edilen HBH'ler konukçuyu enfekte ederken doğal seleksiyon gerçekleşmiştir ve önceki döllerden konukçu arama yeteneğinin kalıtsal olarak geçmiş olabileceği düşünülmektedir. *In vitro* üretimde agar ortamında yumurtadan çıktıktan sonra konukçu arama davranışı göstermeden beslenen EPN'ler deneysel IJ'lerin atalarıdır ve konukçu arama yeteneklerinin azalmış olabileceği düşünülmektedir.

Baiocchi ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, EPN'lerin enfekte olmamış ve enfekte konukçuları ayırt edebildiğini ve konukçunun çekiciliğinin zamanla türlere özel olarak değiştiğini ortaya koymuştur. Potansiyel bir konukçunun enfeksiyon durumu ve kaynak erişilebilirliği hakkında bilgi taşıyan uçucu kimyasal ipuçlarını tanımlamak için katı faz mikroekstraksiyonu ve gaz kromatografi/kütle spektrometrisi kullanılmıştır. Enfekteli konukçuların kokusundan belirlenen kimyasallar arasında, 3-Metil-2-buten-1-ol (prenol) ve 3-Hidroksi-2-butanon (AMC), IJs'lerin enfekte konaklara karşı davranışsal değişiklikleriyle zamansal bir ilişkiye sahip oldukları için daha fazla davranış deneyi için seçilmiştir. Hem prenol hem de AMC bileşikleri, bir agar altlık üzerine uygulandığında *Steinernema glaseri* ve *S. riobrave* IJs'ler üzerinde doza bağlı olarak itici etkiler göstermiştir. Dahası, prenol'ün itici etkileri, enfekte olmayan konak kokularıyla birlikte sunulduğunda enfekte olmayan konaklara olan çekiciliği ortadan kaldırmıştır. Prenol aynı zamanda bazı serbest yaşayan nematodlar ve böcek larvalarında da çekicilik sağlamıştır. Bu bulgular, konukçu ile ilişkili kimyasal ipuçlarının EPN biyolojisinde birkaç sonuca sahip olabileceğini, sadece aynı türe ait bireyler için itici sinyaller olarak değil, aynı zamanda potansiyel yeni konukçular için çekici olarak da işlev görebileceğini düşündürmektedir. Aynı çalışmada EPN'lerin ölü larvalara yönelmediklerini, aksine ölü larva kokularının EPN'ler üzerinde itici bir etki oluşturduğunu belirtmişlerdir. Dolayısıyla, bu çalışmada elde edilen verilerden i*n vivo* 4. günde larva koluna yönelimin i*n vivo* 2. güne oranla daha düşük olmasına 2 günün ardından düzenekteki konukçuların enfekteli ve ölü durumdayken IJ'ler için çekici halde olmamasının neden olabileceği düşünülmektedir. Önceki yapılan çalışma ile bu çalışmada elde edilen veriler tutarlılık göstermektedir.

Grewal ve ark. (1993) yaptıkları çalışmada, *H. bacteriophora* ile *S. glaseri* türlerinin, dört farklı böcek türünün dışkılarıyla temas ettiklerinde davranışlarının nasıl değiştiği incelenmiştir. Sonuçlar, nematodların doğal konukçularının dışkılarıyla temas ettiklerinde ileri sürünme süresini azalttığını, durma ve baş itme davranışlarının süresini ve sıklığını artırdığını göstermiştir. Ayrıca, nematodların dışkılarla temas ettiklerinde geri sürünme süresini ve baş itme davranışının süresini ve sıklığını artırdığı da tespit edilmiştir. Ancak, nematodların tepkileri farklı deney konukçularının dışkılarına bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Ayrıca, çalışmada Alman hamam böceğinin dışkılarında bulunan amonyağın nematodlara karşı engelleyici bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, EPN'ler konukçularının dışkılarıyla temas ettiklerinde davranışlarında belirgin değişiklikler gösterdiği ve amonyağın nematodların hareketlerini engelleyici bir etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular ile bu çalışmada elde edilen verilerde Larva koluna yönelimde bu gibi faktörlerinde etkisi olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmanın bulguları, EPN'lerin kullanımıyla ilgili stratejilerin geliştirilmesi açısından önemlidir. *In vitro* üretim yöntemlerinin konukçu arama davranışlarını nasıl etkilediğini anlamamıza, bu organizmaları daha etkili ve verimli bir şekilde kullanmamıza yardımcı olabilir. Bu çalışma, biyolojik mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi ve zararlı böceklere karşı sürdürülebilir bir mücadele sağlanması açısından önemli verilere sahip olduğu düşünülmektedir.

Yetişkin (2016) tarafından yapılmış olan çalışmada farklı *Heterorhabditis bacteriophora* ebeveynlerine ait izolatlar kullanılarak, bu izolatların Y-Olfaktometre düzeneği içerisinde konukçulara yönelimleri incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda ise HB.C ismi verilmiş olan *H. bacteriophora* izolatı en fazla yönelimi göstermiştir. Yapılan çalışma ile bu çalışmanın sonuçları birbiriyle örtüşmektedir.

Bu alanda yapılan çalışmalar oldukça sınırlı olup hala EPN'leri konukçularına yöneliminde etkili olan faktörler tam olarak belirlenmemiştir. Bununla birlikte, çalışmanın sınırlamaları göz önüne alındığında, daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Örneğin, *in vitro* üretim sonrası konukçu arama davranışlarının neyin etkilediğini belirlemek için daha ayrıntılı bir analize ihtiyaç vardır. Ayrıca, farklı entomopatojen nematod türlerinin davranışlarını karşılaştırmak ve sonuçları daha geniş bir bağlama yerleştirmek de önemlidir. Gelecekteki yapılacak olan çalışmalar ile entomopatojen nematodların konukçu arama mekanizmaları daha ayrıntılı bir şekilde incelenerek bu alanda daha fazla bilgi edinilebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Baiocchi, T., Lee, G., Choe, D. H., & Dillman, A. R. (2017). Host seeking parasitic nematodes use specific odors to assess host resources. Scientific reports, 7(1), 1-13.

Bal, H.K., Grewal, P.S. 2015. Lateral Dispersal and Foraging Behavior of Entomopathogenic Nematodes in the Absence and Presence of Mobile and Non-Mobile Hosts. Plos One, 10(6): 1-19.

Birişik N., Kütük H., Karacaoğlu M., Yarpuzlu F., İslamoğlu M. ve Öztemiz S. 2013. Teoriden Pratiğe Biyolojik Mücadele, Tarım ve Orman Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara. 226 Sayfa

Bock, C. H., Shapiro-Ilan, D. I., Wedge, D. E., & Cantrell, C. L. (2014). Identification of the antifungal compound, trans-cinnamic acid, produced by *Photorhabdus luminescens*, a potential biopesticide against pecan scab. Journal of Pest Science, 87, 155-162.

Boff, M., Smits, P., Gerritsen, L., Wiegers, G. 2000. Development of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* strain NLH-E 87.3 in *Galleria mellonella*. Nematology, 2(3): 303-308.

Cakmak, İ., Hazır, S., Uluğ, D., Karagöz, M. 2013. Olfactory response of *Sancassania polyphyllae* (Acari: Acaridae) to its phoretic host larva killed by the entomopathogenic nematode, *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae). Biological Control, 65: 212–217.

Christen, J. M., Campbell, J. F., Lewis, E. E., Shapiro-Ilan, D. I., & Ramaswamy, S. B. (2007). Responses of the entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* to its insect hosts, *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor*. Parasitology, 134(6), 889-898.

De La Torre, M. (2003). Challenges for mass production of nematodes in submerged culture. Biotechnology advances, 21(5), 407-416.

Dede, E., Bütüner, A. K. & Susurluk, A. (2023). 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

Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C., Burçak, A. 2005. Türkiye'de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Organizmalarda Duyarlılık Azalışı Sorunları. *Türkiye Ziraat Mühendisligi*, *6*: 3-7.

Dunn, M. D., Belur, P. D., & Malan, A. P. (2020). *In vitro* liquid culture and optimization of Steinernema jeffreyense using shake flasks. BioControl, 65(2), 223-233.

Ehlers, R. U. (1998). Entomopathogenic nematodes-Save biocontrol agents for sustainable systems. Phytoprotection-Quebec-, 79, 94-102.

Ehlers, R. U. 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. Applied microbiology and biotechnology, 56(5): 623-633.

Eischen, F. A., & Dietz, A. (1990). Improved culture techniques for mass rearing *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). Entomological News, 101(2), 123-128.

Forst, S. ve Nealson, K., 1996. Molecular Biology of the Symbiotic-Pathogenic Bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. Microbiological Review., 60, 21-43.

Gaugler, R., Han, R. 2002a. Preface: Entomopathogenic Nematology, Ed.: Gaugler, R., CABI, UK, pp: 9-10.

Gözel, U., Güneş, Ç. 2013. Effect of entomopathogenic nematode species on the corn stalk borer (Sesamia cretica Led. Lepidoptera: Noctuidae) at different temperatures. Turkish Journal of Biology, 2013, 37 (1): 65-72.

Grewal P.S., Ehlers R.U., Shapiro-Ilan D.I. 2005. Nematodes as biocontrol agents. CABI Publishing, USA, 506 p.

Grewal, P. S., Gaugler, R., Selvan, S. 1993. Host recognition by entomopathogenic nematodes: behavioral response to contact with host feces. Journal of Chemical Ecology, 19, 1219-1231.

Hacıoğlu, H. (2011). Silis kumunun zenginleştirilmesinde kullanılan yöntemler ve flotasyon ile manyetik ayırma yöntemlerinin demir giderimi bakımından karşılaştırılması. Türkiye Maden Mühendisleri Odası Madencilik Dergisi, 44.

Kaya, H. K., & Stock, S. P. (1997). Techniques in insect nematology. In Manual of techniques in insect pathology (pp. 281-324). Academic Press.

Kepenekci, I., & Susurluk, I. A. (2003). Three entomopathogenic nematodes (Rhabditida) from Turkey. Pakistan Journal of Nematology (Pakistan).

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

Kurşun, İ., & İpekoğlu, B. (1995). 'Türkiye kuvars kumu potansiyeline genel bir bakış. Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu, 21-22.

Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M. S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: back to the future. Journal of invertebrate pathology,132, 1-41.

Lewis, E.E., Selvan, S., Campbell, J. F., Gaugler, R. 1995. Changes in foraging behavior during the infective stage of entomopathogenic nematodes. Parasitology, 110: 583 – 590.

Mansour, H. M., Sanad, R. E., & Saad, I. A. (2010). Biological and chemical control of the lepidopterous wax moths, *Galleria mellonella* L. and *Achroia grissella* Feb. infesting bee wax in storages. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 20(1), 55-59.

Nermut', J., Půža, V., & Mráček, Z. (2012). The effect of intraspecific competition on the development and quality of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Rhabditida: Rhabditidae). *Biocontrol Science and Technology*, *22*(12), 1389-1397.

Nježić, B., & Ehlers, R. U. (2020). Entomopathogenic nematodes control Plum Sawflies (*Hoplocampa minuta* and *H. flava*). *Journal of Applied Entomology*, *144*(6), 491-499.

Okumura, E., & Yoshiga, T. (2014). Host orientation using volatiles in the phoretic nematode Caenorhabditis japonica. *Journal of Experimental Biology*, *217*(18), 3197-3199.

Pezowicz, E. (2004). Fertility of the nematodes Steinernematidae and Heterorhabditidae inhabiting lead polluted areas. Chemia i Inżynieria Ekologiczna, 11(2-3), 240-243.

Ramos-Rodriguez, O., Campbell, J. F., Christen, J. M., Shapiro-Ilan, D. I., Lewis, E. E., & Ramaswamy, S. B. (2006). Attraction behaviour of three entomopathogenic nematode species towards infected and uninfected hosts. Parasitology, 134(5), 729-738.

Rasmann, S., & Turlings, T. C. (2007). Simultaneous feeding by aboveground and belowground herbivores attenuates plant-mediated attraction of their respective natural enemies. Ecology Letters, 10(10), 926-936.

Ringer, S. (1882). Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle. The Journal of physiology, 3(5-6), 380.

San-Blas, E., & Gowen, S. R. (2008). Facultative scavenging as a survival strategy of entomopathogenic nematodes. International Journal for Parasitology, 38(1), 85-91.

Shapiro-Ilan, D. I., Gouge, D. H., Piggott, S. J., & Fife, J. P. (2006). Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biological control*, *38*(1), 124-133.

Shapiro-Ilan, D. I., Lewis, E. E., Behle, R. W., & Mcguire, M. R. (2001). Formulation of Entomopathogenic Nematode-Infected Cadavers. Journal of Invertebrate Pathology, 78, 17–23.

Shapiro-Ilan, D.I., Gaugler, R. 2002. Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 28: 137-146.

Stock, S. P., Griffin, C. T., & Chaerani, R. (2004). Morphological and molecular characterisation of *Steinernema hermaphroditum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Indonesia, and its phylogenetic relationships with other members of the genus. Nematology, 6(3), 401–412.

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.

Struck, E., Ebssa, L., Ehlers, R. U., Poehling, H. M., Gaigl, A., & Borgemeister, C. (2004). Interactions between host plants, the subterranean burrower bug, *Cyrtomenus bergi*, and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis*. *Nematology*, *6*(5), 633-639.

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

Susurluk, I. A. (2011). Potential of *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) as a biological control agent against the cabbage maggot *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae) in oilseed rape. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 35(4), 413-419.

Tabassum, K. A., & Shahina, F. (2004). *In vitro* mass rearing of different species of entomopathogenic nematodes in monoxenic solid culture. Pakistan Journal of Nematology, 22(2), 167.

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

Tobias, N. J., Wolff, H., Djahanschiri, B., Grundmann, F., Kronenwerth, M., Shi, Y. M., ... & Bode, H. B. (2017). Natural product diversity associated with the nematode symbionts *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. *Nature microbiology*, *2*(12), 1676-1685.

Tonelli, M., Peñaflor, M. F. G. V., Leite, L. G., Silva, W. D., Martins, F., & Bento, J. M. S. (2016). Attraction of entomopathogenic nematodes to sugarcane root volatiles under herbivory by a sap-sucking insect. *Chemoecology*, *26*, 59-66.

Ulu, T. C., Sadic, B., & Susurluk, I. A. (2016). Effects of different pesticides on virulence and mortality of some entomopathogenic nematodes. *Invertebrate Survival Journal*, *13*(1), 111-115.

Uygun, N., Elekciooğlu, 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.

White, G. F. (1927). A Method for Obtaining Infective Nematode Larvae from Cultures. Scientific Apparatus and Laboratory Methods, 66(1709), 302–303.

Williams, J. L. (1997). Insects: Lepidoptera (moths). Honey bee pests, predators, and diseases, 3, 119-142.

Yetişkin, İ. (2016). Entomopatojen Nematod *Heterorhabditis Bacteriophora*'nın Bazı Hibrit Irkları Ile Ebeveynlerinin, Konukçu Arama Davranışlarının Karşılaştırılması Üzerine Araştırmalar (Doctoral dissertation, Bursa Uludag University (Turkey)).