Heterorhabditis bacteriophora HBH HİBRİT IRKININ *IN VIVO* VE *IN VITRO* ÜRETİM SONRASI TOPRAĞA UYGULANAN BAZI PESTİSİTLERE KARŞI DAYANIKLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI

Ecem Ezgi ARABACI

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Heterorhabditis bacteriophora HBH HİBRİT IRKININ *IN VIVO* VE *IN VITRO* ÜRETİM SONRASI TOPRAĞA UYGULANAN BAZI PESTİSİTLERE KARŞI DAYANIKLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI

Ecem Ezgi ARABACI
0009-0001-2046-1643

Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

BURSA – 2023
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Heterorhabditis bacteriophora HBH HİBRİT IRKININ *IN VIVO* VE *IN VITRO* ÜRETİM SONRASI TOPRAĞA UYGULANAN BAZI PESTİSİTLERE KARŞI DAYANIKLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI

Ecem Ezgi ARABACI

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK

Son yıllarda Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde örtü altı yetiştiriciliğinde, entomopatojen nematodlar (EPN) toprak kökenli zararlılara karşı etkin biyolojik mücadele yöntemi olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. EPN'ler birçok zararlıya karşı etkili olmaları, konukçu arama yetenekleri, standart ekipmanlar ile kolay uygulanabilir olmaları ve toprakta aktif olarak uzun süreli etkinlik göstermeleri nedeniyle biyolojik mücadelede çekici hale gelmiştir. Ayrıca, EPN'lerin bazı pestisitlerle birlikte kullanılabilmeleri, entegre mücadele stratejileri kapsamında büyük avantaj sağlamaktadır.

Bu çalışmada, ülkemizde yaygın olarak kullanılan üç farklı pestisit grubunu (insektisit, herbisit, fungusit) içeren üç farklı aktif maddeye (Lambda cyhalothrin, Pendimethalin, Kükürt) maruz kalan entomopatojen nematod *Heterorhabditis bacteriophora* HBH hibrit ırkının canlı kalma oranları farklı süreler (24, 48 ve 72 saat) boyunca incelenmiştir. Aynı zamanda, *in vivo* ve *in vitro* yöntemlerle elde edilen infektif juvenillerin dayanıklılığı kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Çalışma sonuçları istatistiksel olarak incelendiğinde en olumsuz etki, pentimethalin aktif maddesine maruz bırakılan ve *in vitro* yöntem ile üretilen *H. bacteriophora* IJ'leri üzerinde gözlenmiştir. *H. bacteriophora*'nın bu çalışmada kullanılan aktif maddelerle bir arada kullanılmasında herhangi bir sakınca görülmemiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulguların gelecekteki entegre mücadele uygulamalarına ışık tutması amaçlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Entomopatojen nematod, *Heterorhabditis bacteriophora*, HBH hibrit ırkı, *In vivo* Üretim, *In vitro* Üretim, Pestisit, Dayanıklılık, Lambda cyhalothrin, Pendimethalin, Kükürt

2023, viii + 53 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE RESISTANCE OF *Heterorhabditis bacteriophora* HBH HYBRID STRAIN TO SELECTED PESTICIDES APPLIED TO SOIL AFTER *IN VIVO* AND *IN VITRO* PRODUCTIONS

Ecem Ezgi ARABACI

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

Supervisor: Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK

In recent years, entomopathogenic nematodes (EPNs) have been successfully utilized as an effective biological control method against soil-borne pests in greenhouse horticulture in Europe and the United States. The effectiveness of EPNs against a wide range of pests, their host-seeking abilities, ease of application with standard equipment, and their long-lasting activity in the soil have made them attractive for biological pest control. Additionally, the ability of EPNs to be used in conjunction with certain pesticides provides significant advantages within integrated pest management strategies.

In this study, the viability of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* HBH hybrid strain, exposed to three different pesticide groups (insecticide, herbicide, fungicide) containing three distinct active ingredients (Lambda cyhalothrin, Pendimethalin, Sulfur) commonly used in our country, was examined at different exposure durations (24, 48, and 72 hours). Furthermore, the resilience of infective juveniles obtained through *in vivo* and *in vitro* methods was compared. When the results of the study were statistically analyzed, the most negative impact was observed on H. bacteriophora IJs exposed to the active ingredient pentimethalin using an in vitro method. No adverse effects were found in the simultaneous use of *H. bacteriophora* with the active ingredients used in this study. The findings of this study aim to shed light on future integrated pest management practices.

Key words: Entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*, HBH hybrid strain, *In vivo* production, *In vitro* production, Pesticide, Resistance, Lambda cyhalothrin, Pendimethalin, Kükürt

2023, ix + 53 pages.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması boyunca bana desteklerini esirgemeyen birçok kişiye teşekkür etmek istiyorum.

Öncelikle, tez çalışmamın başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesindeki rehberliği, yönlendirmeleri ve değerli akademik danışmanlığı için Sayın Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK hocama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma TÜBİTAK'ın TOVAG grubu tarafından fonlanan 219O370 numaralı proje ile desteklenmiştir. Çalışmadaki finansal desteğinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, eğitimime katkıda bulunan, bu çalışmanın yapılabilmesi için gerekli olan kaynakları sağlayan Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'ndeki değerli hocalarıma, yardımlarını esirgemeyen Ar. Gör. Yavuz Selim ŞAHİN'e çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesine manevi katkıda bulunan, desteklerini her zaman hissettiğim Perla Fruit Laboratuvar ekibindeki tüm arkadaşlarıma, değerli yöneticim Gülden HAZARHUN'a teşekkür ederim. Beni her zaman yüreklendirdiğiniz için minnettarım.

Son olarak, tez çalışması sürecinde ve daima beni her anlamda destekleyen çok değerli aileme ve sevgili Evren BAŞER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Sizlerin motivasyonu ve sevgisi olmadan bu çalışmayı tamamlayamazdım.

Hepinize teşekkür ederim.

Ecem Ezgi ARABACI
22/06/2023

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....i
ABSTRACT.....ii
TEŞEKKÜR.....iii
İÇİNDEKİLER.....iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....ix
1. GİRİŞ.....1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....7
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....16
3.1. *Galleria mellonella* Larvalarının Üretilmesi.....16
3.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Ortamlar ve İçerikleri.....19
3.3.1. Ringer Solüsyonu.....19
3.3.2. YS (Yeast Extract) Sıvı Besin Ortamı.....20
3.3.3. NBTA (Nutrient bromothymol blue agar) Agar.....21
3.3.4 Nutrient Lipid (Wouts) Agar.....22
3.3.5. Sterilizasyon Solüsyonu.....23
3.4. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının *In Vivo* Yöntem ile Üretilmesi24
3.5. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının *In Vitro* Yöntem ile Üretilmesi25
3.5.1. *Photorhabdus* spp. Bakteri İzolasyonu.....25
3.5.2. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkı Yumurta İzolasyonu.....27
3.5.3. Katı Nematod Kültürünün Oluşturulması.....29
3.6. *In Vivo* ve *In Vitro* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Toprağa Uygulanan Bazı Pestisitlere Karşı Dayanıklılığının Belirlenmesi.....31
3.6.1. *In Vivo* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Toprağa Uygulanan Bazı Pestisitlere Karşı Dayanıklılığının Belirlenmesi.....32
3.6.2. *In Vitro* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Toprağa Uygulanan Bazı Pestisitlere Karşı Dayanıklılığının Belirlenmesi.....33
3.7. İstatistiksel Analizler.....35
4. BULGULAR.....36
4.1. *In Vivo* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Toprağa Uygulanan Bazı Pestisitlere Karşı Dayanıklılığı.....36
4.1.1. *In Vivo* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Lambda Cyhalothrin Aktif Maddesine Karşı Dayanıklılığı.....36
4.1.2. *In Vivo* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Pendimethalin Aktif Maddesine Karşı Dayanıklılığı.....37
4.1.3. *In Vivo* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Kükürt Aktif Maddesine Karşı Dayanıklılığı.....38
4.2. *In Vitro* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Toprağa Uygulanan Bazı Pestisitlere Karşı Dayanıklılığı.....39
4.2.1. *In Vitro* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Lambda Cyhalothrin Aktif Maddesine Karşı Dayanıklılığı.....39
4.2.2. *In Vitro* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Pendimethalin Aktif Maddesine Karşı Dayanıklılığı.....41

4.2.3. *In Vitro* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Kükürt Aktif Maddesine Karşı Dayanıklılığı 42
4.3. *In Vivo* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının *In Vitro* Yöntem ile Üretilen HBH Hibrit Irkına Göre Toprağa Uygulanan Bazı Pestisitlere Karşı Dayanıklılığının Karşılaştırılması 43
4.3.1. *In Vivo* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının *In Vitro* Yöntem ile Üretilen HBH Hibrit Irkına Göre Lambda Cyhalohtrin Aktif Maddesine Karşı Dayanıklılığının Karşılaştırılması 44
4.3.2. *In Vivo* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının *In Vitro* Yöntem ile Üretilen HBH Hibrit Irkına Göre Pendimethalin Aktif Maddesine Karşı Dayanıklılığının Karşılaştırılması 45
4.3.3. *In Vivo* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının *In Vitro* Yöntem ile Üretilen HBH Hibrit Irkına Göre Kükürt Aktif Maddesine Karşı Dayanıklılığının Karşılaştırılması 46
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 48
KAYNAKLAR 49
ÖZGEÇMİŞ 53

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
g	Gram
kg	Kilogram
l	Litre
ml	Mililitre
µm	Mikrometre
µl	Mikrolitre
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
%	Yüzde

Kısaltmalar	Açıklama
dk	Dakika
EPN	Entomopatojen Nematod
IJ	Infektif Jüvenil
NBTA	Nutrient Bromothymolblue Agar
rpm	Revolutions Per Minute
spp.	Türler
YS	Yeast Extract

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 1. 1.	Heterorhabditis bacteriophora. A: Erkek, B: Infektif Jüvenil (Nguyen ve Smart, 1995)	4
Şekil 3. 1.	Galleria mellonella'ya ait son dönem larvalar (Sadıç, 2017)	16
Şekil 3. 2.	Galleria mellonella yumurtaları için hazırlanan cam kavanozlar (Arabacı,2023).....	17
Şekil 3. 3.	Galleria mellonella üretimi için hazırlanan besin (Arabacı, 2023)...	18
Şekil 3. 4.	Son dönem Galleria mellonella larvalarının kavanozdaki görüntüsü (Arabacı, 2023).....	18
Şekil 3. 5.	YS sıvı besin ortamı hazırlama aşaması (Düzenli, 2021).....	21
Şekil 3. 6.	Petrideki NBTA agar görüntüsü (Arabacı, 2022).....	22
Şekil 3. 7.	Petrideki Wouts Agar görüntüsü (Arabacı, 2022)	23
Şekil 3. 8.	Steril kabin içerisinde hücre kültür kabı (Arabacı, 2023).....	29
Şekil 3. 9.	Petri kapağına çıkan IJ'lerin mikroskoptaki görüntüsü (Arabacı, 2022).....	31
Şekil 3. 10.	Pendimethalin aktif maddesinin in vivo yöntem ile üretilen IJ'lere uygulanması (Arabacı, 2023)	32
Şekil 3. 11.	Canlı IJ'lerin stereo mikroskop altındaki görüntüsü (Arabacı, 2023)	33
Şekil 3. 12.	IJ sayımı için kullanılan 24 kuyulu hücre kültür kabı (Arabacı, 2023)	33
Şekil 3. 13.	Stereo mikroskop altında canlı IJ sayımı (Arabacı, 2023).....	34
Şekil 3. 14.	Kükürt aktif maddesinin uygulandığı petri kapları (Arabacı, 2022).	34
Şekil 4. 1.	In vivo yöntemle üretilen HBH hibrit ırkının lambda cyhalothrin aktif maddesine farklı maruziyet süreleri (24, 48 ve 72 saat) sonucunda canlı IJ sayılarının kontrol ve uygulama gruplarıyla karşılaştırılması (F (7, 32) = 190.3564, p <0.0001).....	37
Şekil 4. 2.	In vivo yöntemle üretilen HBH hibrit ırkının pendimethalin aktif maddesine farklı maruziyet süreleri (24, 48 ve 72 saat) sonucunda canlı IJ sayılarının kontrol ve uygulama gruplarıyla karşılaştırılması (F (7, 32) = 319.1163, p <0.0001).....	38
Şekil 4. 3.	In vivo yöntemle üretilen HBH hibrit ırkının kükürt aktif maddesine farklı maruziyet süreleri (24, 48 ve 72 saat) sonucunda canlı IJ sayılarının kontrol ve uygulama gruplarıyla karşılaştırılması (F (7, 32) = 163.4692, p <0.0001).....	39
Şekil 4. 4.	In vitro yöntemle üretilen HBH hibrit ırkının lambda cyhalothrin aktif maddesine farklı maruziyet süreleri (24, 48 ve 72 saat) sonucunda canlı IJ sayılarının kontrol ve uygulama gruplarıyla karşılaştırılması (F= 21,45; df= 7, 32; p <0.001).	41
Şekil 4. 5.	In vitro yöntemle üretilen HBH hibrit ırkının pendimethalin aktif maddesine farklı maruziyet süreleri (24, 48 ve 72 saat) sonucunda canlı IJ sayılarının kontrol ve uygulama gruplarıyla karşılaştırılması (F= 222,29; df= 7, 32; p <0.001).....	42
Şekil 4. 6.	In vitro yöntemle üretilen HBH hibrit ırkının kükürt aktif maddesine farklı maruziyet süreleri (24, 48 ve 72 saat) sonucunda canlı IJ sayılarının kontrol ve uygulama gruplarıyla karşılaştırılması (F= 19,34; df= 7, 32; p <0.001).....	43

Şekil 4. 7. Lambda cyhalothrin uygulanan grupta canlı IJ sayılarının in vivo yöntem ve in vitro yöntem ile kıyaslanması (F= 49,22; df= 15, 64; p <0.001) 45
Şekil 4. 8. Pendimethalin uygulanan grupta canlı IJ sayılarının in vivo yöntem ve in vitro yöntem ile kıyaslanması (F= 237,59; df= 15, 64; p <0.001) 46
Şekil 4. 9. Kükürt uygulanan grupta canlı IJ sayılarının in vivo yöntem ve in vitro yöntem ile kıyaslanması (F= 36,00; df= 15, 64; p <0.001) 47

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 3. 1.	Galleria mellonella üretimi için besin içeriği ve miktarları	18
Çizelge 3. 2.	*Heterorhabditis bacteriophora* HBH hibrit ırkı ve ebeveynleri	19
Çizelge 3. 3.	Ringer solüsyonu içeriği	20
Çizelge 3. 4.	YS sıvı besin ortamı içeriği	20
Çizelge 3. 5.	NBTA (Nutrient bromothymol blue agar) agar içeriği	22
Çizelge 3. 6.	Nutrient Lipid (Wouts) agar içeriği	23
Çizelge 3. 7.	Sterilizasyon solüsyonu içeriği	23

1. GİRİŞ

Tarım, besin maddelerinin üretildiği, bu maddelerin işlenerek çeşitlendirildiği, insanlığın da bu besin maddelerine olan ihtiyacını karşılayan bir sektördür. Tarım sektörü, toplumların sağlığını ve gelişimini büyük ölçüde etkileyen bir endüstri olarak görülmektedir. İnsanlığın varlığını sürdürebilmesi için temel bir gereklilik olan gıda ihtiyacını karşılamaktadır. Tarım, ekonomik açıdan ülkemizin kritik bir sektörüdür. Ülkemizde çeşitli ekosistemlere sahip olan bölgelerde benzersiz ürünler yetişmektedir (Nalıncı, 2018).

Bitkisel üretimde hastalık, zararlı ve yabancı otlar gibi durumların varlığı üretimde ekonomik seviyede olumsuzluklar yaratmaktadır. Bitkilerin korunması, ürünün kalitesinin artması, tarımsal üretimin istenilen seviyede olması amacıyla, hastalık, zararlı ve yabancı otlara karşı farklı mücadele yöntemleri uygulanmaktadır. Uygulanan mücadele yöntemlerinin tümü "Bitki Koruma" konusu içinde "Zirai Mücadele" olarak adlandırılmaktadır (Kadıoğlu, 2012).

Dünya genelinde zirai mücadelede kullanılan en yaygın yöntem kimyasal mücadeledir (Sarwar, 2015). Kimyasal mücadelenin diğer mücadele yöntemlerine göre daha yaygın kullanılmasının sebepleri; düşük maliyetli, kolay uygulanabilir, hızlı sonuç alınabilir olarak sıralanabilmektedir. Kimyasal mücadele; bitkisel üretimde ekonomik kayba sebep olabilecek seviyedeki zararlı organizmalara karşı, toksik etkiye sahip sentetik veya doğal olarak elde edilmiş kimyasallar kullanılarak yapılan mücadeledir.

Pestisit; bu mücadele yönteminde kullanılan kimyasallara verilen genel isimdir. Pestisitler hedef alınan canlının solunum, sindirim, sinir sistemi gibi sistemlerini kimyasal yollarla bloke etmek ve yaşamsal faaliyetlerini durdurmak suretiyle öldürürler (Birişik vd., 2018) Öldürme etkisine sahip bu kimyasal ilaçların kullanımının büyük faydaları olduğu gibi, bilinçsiz kullanımının da insanlar, hayvanlar ve çevre üzerinde oldukça ciddi riskler oluşturduğu da bilinmektedir (Tiryaki vd., 2010).

Dünyada ve Türkiye'de teknolojinin gelişmesi ve pestisitlerin bazı zararlarının ortaya çıkması ile birlikte devamlı olarak kimyasal kullanımını azaltmaya yönelik bazı çalışmalar geliştirilmiştir. Sürdürülebilir bir tarım için hastalık, zararlı ve yabancı otlarla

mücadelede entegre mücadelenin uygulanmasının en etkili yöntem olduğu bilinmektedir (Ulu vd., 2016).

Entegre Zararlı Yönetimi (EZY), diğer adı ile Entegre Mücadele, tarımsal üretimde zararlı olan türlerin çevre ile olan ilişkilerine ve bu türlerin popülasyonlarına önem vererek, bütün mücadele yöntem ve tekniklerinin birbiri ile uygun, uyumlu ve "entegre" biçimde kullanıldığı bir zirai mücadele yönetim sistemidir (Peshin ve Zhang, 2014). Entegre mücadelede, tarımsal zararlı popülasyonlarının ekonomik zarar seviyesini aşmamasını hedeflemektedir. EZY çalışmalarında tarımsal hastalık ve zararlılarla mücadele yöntemlerinin birkaçı veya tamamı birlikte kullanılarak pestisitlerin yarattığı olumsuz etkiler en alt seviyede tutulmaktadır.

EZY ile birlikte kullanılan mücadele yöntemleri; fiziksel, kültürel, biyoteknik, biyolojik ve kimyasal mücadele olarak sıralanabilmektedir. EZY ile bütünleşik olarak kullanmak için kimyasal mücadele en son tercih edilmelidir. Buna ek olarak, bu yöntemler arasında çevreye, insan ve diğer canlılara hiçbir zararı olmadığı gerekçesiyle biyolojik mücadelenin önemi artmaktadır. Günümüzde, kimyasal mücadele alternatifi olarak, kimyasalların aksine en uygulanabilir ve en başarılı yöntemin biyolojik mücadele olduğu belirtilmiştir (Ulu, 2021).

Biyolojik Mücadele terimi; Doğada canlılar arasındaki biyolojik, ekolojik, sistematik ilişkilerin araştırılmasıyla doğan bir terim olup ilk olarak Harry S. Smith ile 1919 senesinde kullanılmıştır (Smith, 1919). Smith biyolojik mücadeleyi "doğal düşmanlar aracılığı ile zararlıların kontrol altında tutulması" olarak tanımlamıştır. Bu tanım daha sonra "parazit, patojen veya avcılar aracılığıyla hedef alınan organizmaların popülasyonlarının normalden düşük seviyede tutulması" olarak değiştirilmiştir (De Bach, 1964).

Biyolojik Mücadele konusu, "Uygulamalı Biyolojik Mücadele" ve "Doğal Biyolojik Mücadele" başlıkları altında ele alınmaktadır. Uygulamalı biyolojik mücadele; insan eli ile doğal düşmanların kullanılması yoluyla zararlıların baskı altına alınması anlamına gelmektedir. Öte yandan doğal biyolojik mücadele; herhangi bir insan müdahalesi

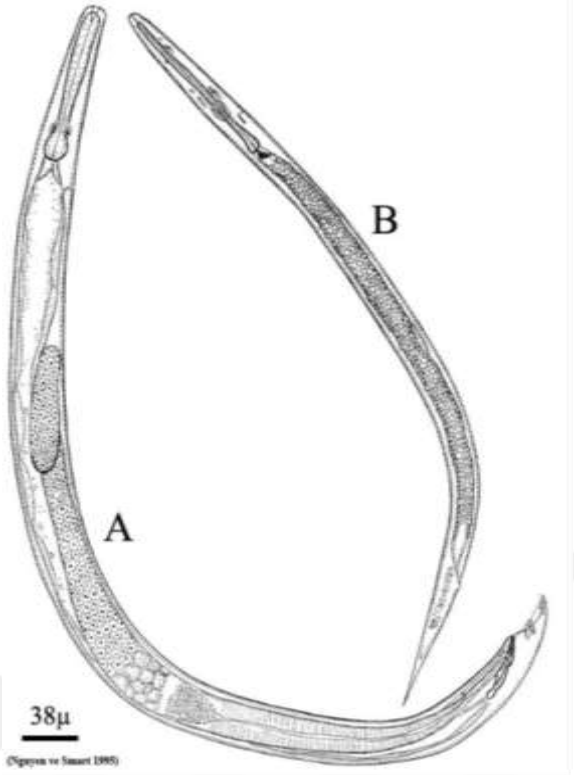
olmaksızın doğal düşmanların tarımsal zararlıları kontrol altına aldığı bir süreçtir (Van den Bosh vd., 1982).

Biyolojik mücadele yöntemi, zararlılara karşı kullanılan her türlü organizmayı içerir ve bu organizmalara ajan ismi verilmektedir. Entomopatojen Nematodlar (EPN) bu ajanlar arasında etkili, aktif şekilde kullanılan gruplardan biri olmaktadır (Gaugler, 2002).

Tarım açısından önemli olan nematodlar, bitki patojeni ve böcek patojeni olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Bitki patojeni nematodlar, bitkinin toprağın altındaki bölümlerinde zararlı etki gösterirler. Böcek patojeni nematodlar ise toprağın altındaki böcekleri hastalandırarak öldürme kabiliyetine sahiptirler. Bu açıdan değerlendirildiğinde, entomopatojen nematodların tarımsal açıdan önemli bir role sahip oldukları bilinmektedir (Sadıç, 2017).

EPN'ler; Nemata şubesine, Secernentea sınıfına, Rhabditida takımına, Heterorhabditidae ve Steinernematidae familyalarına aittir. Genel olarak ince, düz ve segmentsiz bir yapıya sahip mikroskobik canlılardır. "İplik solucanları" olarak da bilinmektedirler. Vücutları ince bir deri tabakasıyla kaplanmıştır ve halkalı bir görünüme sahiptirler. Bu halkaların her birine annül denilmektedir (Sadıç, 2017).

Bu canlılar, biyolojik yaşamlarının %90'ından fazlasını toprakta geçirmekte ve yaşamının devamlılığı için konukçu böceklere ihtiyaç duymaktadır ve obligat (zorunlu) endoparazitlerdir. EPN'ler mikroskobik boyutlarda olup, türlerine göre değişmekle birlikte ortalama olarak 500-1000 μm arasında değişen boyutlarda olabilirler (Nguyen ve Smart, 1995) (Şekil 1.1).



Şekil 1. 1. *Heterorhabditis bacteriophora*. A: Erkek, B: Infektif Jüvenil (Nguyen ve Smart, 1995)

EPN'ler, konukçu böceğe doğal açıklıklarından veya intersegmental zar aracılığıyla giriş yapmaktadırlar. Bu noktada, EPN'ler konukçu böceğin hemosolüne ulaşmakta ve kendi içinde taşıdığı simbiyont bakterileri konukçu böceğin hemolimfine salgılayarak konukçunun ölümüne neden olmaktadırlar (Poinar, 1979; Ehlers, 1996; Kaya ve Stock, 1997). Hemolimf, entomopatojen nematodlar ve EPN bünyesinde bulunan simbiyotik bakterilerin çoğalması için optimal şartları bulundurmaktadır.

Xenorhabdus ve *Photorhabdus* cinslerine ait bakteriler ile EPN'ler arasında benzersiz bir mutualist ilişki görülmektedir. Bu mutualist ilişki *Xenorhabdus* cins bakteriler için Steinernematidae familyası ile, *Photorhabdus* cins bakteriler için ise Heterorhabditidae familyası ile olmaktadır (Boemare vd., 1993). Ortak yaşayan (simbiyont) bakteriler, Entorobacteriaceae familyasına aittir (Ehlers vd., 1988). Bu bakteri-nematod ilişkisi, zararlı böceklerle olan biyolojik mücadelede kullanılmaktadır (Ehlers, 1996).

Infektif Juvenil (IJ)'ler, konukçu böceğin içine girdiğinde besin sinyalini algılamakta ve bağırsaklarında yer alan simbiyont bakteri hücrelerini konukçunun hemosolüne salgılamaktadırlar. Hemolimf içinde üreyen bakteriler, metabolitler ve toksinler üreterek konukçu böceği kan zehirlenmesi (septisemi) ile ortalama 2 gün içinde öldürmektedir (Simoes ve Rosa, 1996).

Bakteriler hızlıca çoğalmakta ve entomopatojen nematodun üreyip çoğalması için optimum koşulları sağlamaktadır. Besin olarak bu bakteri hücrelerini tüketen EPN'ler ergin hale gelmekte ve üremeye devam etmektedir. EPN'ler, konukçu içinde besin kaynağı tükendiğinde, jüveniller sinyali ile IJ formuna dönüşmektedirler. Konukçu böceğin içinde birkaç nesil üreme döngülerinin ardından, bağırsaklarında bulunan bakterilerle birlikte konukçu böceğin cesedini (kadavra) terk ederek toprağa çıkmakta ve yeni bir konukçu arayışına başlamaktadırlar (Popiel vd., 1989). IJ'ler kadavradan ayrıldıktan sonra beslenmeden toprakta aylarca hayatta kalma yeteneğine sahiptirler (Kaya ve Gaugler, 1993; Adams ve Nguyen, 2002).

Heterorhabditidae ve Steinernematidae familyasına ait olan nematodlar doğal ortamda obligat böcek patojenleri olarak bulunmaktadır. Bu nematodların, Antarktika hariç dünyanın çoğu yerinden doğal olarak elde edilebildiği bilinmektedir (Adams vd., 2006). Heterorhabditidae ve Steinernematidae familyalarına ait nematodlar geniş konukçu yelpazesine sahiptir. Bu nematodlar, açık alanlarda uygulanabilir olmak için *in vivo* ve *in vitro* yöntemlerle kitlesel şekilde üretilebilmektedir. Yalnızca böcekler üzerinde etkilidirler, insanlar ve çevre için herhangi bir tehlike oluşturmamaktadırlar. Bu özellikler, bu nematodların güvenilir bir biyolojik mücadele ajanı olarak kabul edilmesini sağlamıştır (Gaugler ve Kaya, 1990; Koppenhöfer, 2000). Heterorhabditidae ve Steinernematidae familyalarına ait olan nematodlar genellikle ticari olarak üretilmektedir. Bunun yanında EPN'ler mikrobiyal insektisit amacıyla da kullanılabilmektedir (Koppenhöfer, 2007).

Ülkemizde entomopatojen nematodlar ile ilgili çalışmalarda çeşitli alanlardan birçok tür izole edilmiş ve toprak altı zararlılarına karşı etkinlikleri test edilmiştir. *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae), ülkemizde tespit edilen entomopatojen nematodlardan biridir (Susurluk vd., 2001; Kepenekçi, 2002; Hazır vd.,

2003; Kepenekçi ve Susurluk, 2003). *H. bacteriophora*; Coleoptera, Diptera, Lepidoptera ve Thysanoptera takımlarında bulunan ve zararlı böcek türlerine karşı etkili olan obligat endoparazit bir EPN türüdür (Ehlers, 1996).

EPN'lerin doğal yaşam ortamında hayatta kalmasını etkileyen çeşitli biyotik ve abiyotik faktörler bulunmaktadır. Biyotik faktörler; konukçu varlığı, doğal düşmanlar ve bitki çeşitliliği gibi faktörlerken abiyotik faktörler arasında ise; sıcaklık, toprak yapısı, nem, pH seviyesi, UV ışınları, tuzluluk ve kimyasal pestisitler yer almaktadır (Kaya, 2002). Bu özelliklere ek olarak EPN'lerin bazı pestisitler ile birlikte aynı anda uygulanabilir olması, entegre mücadele içerisindeki kullanımlarını mümkün hale getirmektedir.

Bu araştırmada *H. bacteriophora* HBH hibrit ırkının, ülkemizde meyve ve sebze yetiştiriciliğiyle uğraşan çiftçilerin toprakta yaygın olarak kullandığı bazı pestisitlere dayanıklılık etkisinin, ayrıca *in vivo* ve *in vitro* üretim yöntemleri ile elde edilen *H. bacteriophora* IJ'leri arasındaki dayanıklılık etkisi farklılıklarının, *H. bacteriophora*'nın bu denemede kullanılan pestisitler ile entegre kullanımının belirlenmesi hedeflenmiştir. Elde edilen sonuçlar, *H. bacteriophora* HBH ırkı ile lambda cyhalothrin, pendimethalin, kükürt aktif maddeleri arasındaki uyumluluğu tespit ederek gelecekte çiftçilerin zararlılarla mücadelede kullanılan pestisit maliyetlerini azaltmaya ve biyolojik ve kimyasal mücadeleyi entegre bir biçimde kullanarak uygulama etkinliğini artırmaya yönelik bir amaç taşımaktadır.

Sonuç olarak bu çalışma, entegre mücadelenin etkinliği ve sürdürülebilirliği açısından önemli bir adım olarak değerlendirilebilir. *H. bacteriophora* HBH ırkının pestisit toleransının araştırılması, entegre ve biyolojik mücadele yöntemlerinin geliştirilmesine ve çevre dostu tarım uygulamalarının yaygınlaştırılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Koppenhöfer vd. (2003), *Steinernema carpocapsae, Steinernema feltiae, Heterorhabditis bacteriophora* ve *Heterorhabditis megidis* üzerinde yapılan bir çalışmada neonikotinoidlerin etkileri incelenmiştir. Zararlı larva olarak *Exomala orientalis* (Scarabaeidae familyası) kullanılmıştır. Bu çalışmada insektisit olarak Imidacloprid kullanılmış olup, ilaçlama tankının içerisinde nematodlarla karıştırıldığında herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca, nematod+imidacloprid uygulanan grubun, sadece nematod uygulanan gruba göre zararlıyı daha fazla enfekte etme oranına sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmaya göre kullanılan diğer insektisitler acetamiprid ve thiamethoxam ile *Steinernema carpocapsae, Steinernema feltiae, Heterorhabditis bacteriophora* ve *Heterorhabditis megidis* infektif juvenilleri karıştırılıp birlikte kullanıldığında, enfeksiyon oranı ve ölüm oranında önemli bir farklılık gözlenmemiştir. S. carpocapsae dışındaki nematodlarda, nematod üzerine uygulanan en yüksek pestisit dozu 1000 ppm'dir ve uygulanan doz arttıkça nematod ölümleri artmıştır. Bununla birlikte, bu ölümler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. S. carpocapsae'de ise en yüksek ölüm oranı %3 olarak bulunmuş, ancak bu oran istatistiksel açıdan önemli görülse de biyolojik açıdan önemsenmemiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada bahsedilen 3 adet neonikotinoid insektisit -Imidacloprid, Acetamiprid, Thiamethoxam- ile EPN'lerin ilaçlama tankında bir arada kullanılarak uygulanmasında herhangi bir sakınca görülmemiştir.

Alumai vd. (2004), laboratuvar koşullarında çim alanlarda kullanılan bazı pestisit formülasyonlarıyla iki entomopatojen nematodun, *Heterorhabditis bacteriophora HP88 ve Steinernema carpocapsae,* uyumluluğunu değerlendirmişlerdir. Nematodlar, önerilen dozlarda pestisitlere maruz bırakılmış ve 100, 300 ve 500 L/ha tank karışım hacimlerinde, 24 kuyucuklu plaklarda, oda sıcaklığında, 3 saat boyunca infektif juvenil canlılığı belirlenmiştir. Daha sonra *Galleria mellonella* larvalarına karşı +22°C'de, 96 saat boyunca IJ patojenitesini değerlendirmek için test edilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, *S. carpocapsae'*nin canlılığı hiçbir pestisit tarafından etkilenmemiş, ancak alüminyum tris ve trichlorfon tüm konsantrasyonlarda *S. carpocapsae* patojenitesini önemli ölçüde azaltmıştır. Thiamethoxam ve trichlorfon *H. bacteriophora* canlılığını önemli ölçüde

azaltmış olup, halofenozid, alüminyum tris, trichlorfon ve carbaryl *H. bacteriophora* patojenitesini de azalttığı gçrülmüştür. Buna karşın, imidacloprid ise *H. bacteriophora* patojenitesini önemli ölçüde arttırmıştır. Bu nedenle araştırmacılar, nematod-pestisit kombinasyonlarının çim zararlılarıyla mücadele programlarına entegrasyonu açısından tartışılması gerektiğini savunmaktadır.

Strandberg vd. (2004), Pendimetalin'in omurgasızlar üzerindeki etkisi ile ilgili yalnızca birkaç çalışma olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle, sürdürülebilirlikle ilgili önemli türler üzerindeki olası etkiler yeterince ele alınmamıştır. Yapılan bir çalışmada, Das vd. (1998), Hindistan hardal tarlasında kök ur nematodları (*Meloidogyne incognita*) üzerindeki pendimethalin etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada pendimethalin uygulaması 0.75 kg/ha ve 1.0 kg/ha olarak yapılmıştır. Her iki konsantrasyon da nematod popülasyonunu ve büyüme hızlarını azaltmıştır. 1.0 kg/ha uygulamasında nematod popülasyonu %60'a kadar azalırken, 0.75 kg/ha uygulaması popülasyonu %35'e kadar azaltmıştır. Bu etkinin doğrudan mı yoksa yabani otların da öldürülmesiyle değişen habitat nedeniyle mi olduğu bilinmemektedir. Ayrıca uygulamadan sonra, toprak mikrobiyotasının 4 hafta boyunca pendimethalin etkisinde kaldığı tespit edilmiştir.

Cuthbertson vd. (2008), Beyazsinek (*Bemisia tabaci*) ikinci larvalarının kontrolü için kimyasal insektisitler ile entomopatojen nematod *Steinernema carpocapsae'*nin (Wesier) infektif juvenillerinin entegrasyonunu araştırmışlardır. Bir kum testi (bioassay) kullanılarak, *S. carpocapsae'*nin 24 saat boyunca dört insektisitin (spiromesifen, thiacloprid, imidacloprid ve pymetrozine) tarla oranı seyreltmelerine doğrudan maruz kalmanın *Galleria mellonella* larvalarına olan enfektiviteye etkisi test edilmiştir. Nematodlar, thiacloprid ve spiromesifen ile birlikte kullanıldığında (sırasıyla %86.5 ve %94.3) nematodların tek başına kullanımına kıyasla (%75.2) domates bitkilerinde *B. tabaci* ölümünde daha yüksek oranlar sağlanmıştır. Imidacloprid, pymetrozine ve spiromesifen kimyasallarını nematodlarla birlikte kullanıldığında *B. tabaci* ölümünde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bununla birlikte, thiaclopridin nematodlarla birlikte kullanılması, kimyasalın tek başına kullanılmasından çok daha yüksek ve önemli ölçüde *B. tabaci* ölümüne neden olmuştur.

Gutierrez vd. (2008), yerli ırk olan *Steinernema feltiae Rioja* ve *Steinernema feltiae*'nin ticari ırk olan 'Entonem' preparatının infektif juvenilleri üzerinde üç nörotoksik insektisit uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan insektisitler; *Spodoptera littoralis* mücadelesi için seçilen Primicarb, Chlorpyrifos ve Cypermethrin'dir. Bu insektisitlerin önerilen en yüksek dozlarına dayanarak bir karışım hazırlanmış ve IJ'ler tankın içine ilave edilmiştir. IJ'ler, 48 saat boyunca bu tankta ilaca maruz bırakılmış ve ardından IJ'lerin sayımları yapılıp, üreme ve ölüm oranları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, asetilkolin esteraz inhibitörü olduğu bilinen Primicarb ve Chlorpyriphos'un uygulandığı S. feltiae'nin yerli ve ticari ırklarında herhangi bir etki gözlenmemiş ancak, Chlorpyrifos uygulanan gruplarda ise IJ etkinliği önemli ölçüde azalmıştır. Sinir zarlarındaki sodyum kanallarına etkili olduğu bilinen Cypermethrin uygulandığında, S. feltiae'nin ticari ırkında ölüm oranı %10'dan daha düşük bulunurken, yerli ırkında ölüm oranı %30'a kadar yükselmiştir.

Koppenhöfer vd. (2008), anthranilic diamide, chlorantraniliprole, entomopatojen nematod *Heterorhabditis bacteriophora* kombinasyonlarını çim alanlardaki üçüncü evre beyaz kurtçukların kontrolü için denemişlerdir. Serada yapılan denemelerde, chlorantraniliprole etken maddesinin *H. bacteriophora'*dan 1 hafta önce veya aynı anda uygulanması durumunda kombinasyonların *Anomala (Exomala) orientalis* bireylerinin ölümleri üzerinde sinerjistik etkisi olmuştur. Kombinasyonların, tek başına uygulanan maddelere göre, ölümleri daha hızlı gerçekleştirdiği görülmüştür. Serada yapılan denemelerde, *H. bacteriophora* – chlorantraniliprole kombinasyonlarının *Popillia japonica* ve *Cyclocephala borealis* larvalarının ölümünde sinerjistik bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. İstatistiksel sonuçlara bakıldığında, kombinasyonların %64'ünde sinerjistik etkileşimler gözlemlenmiştir. Seradaki denemelerde, *H. bacteriophora* tek başına ve kombinasyon kullanımında ölü larvaların üzerindeki nematod üremesi birbirinden farklı olmamıştır. Kombinasyon uygulamaları sayesinde daha yüksek sayıda larvanın nematod enfeksiyonuna yenik düşmesi nedeniyle, uygulamadan 28 gün sonra topraktaki nematod yoğunlukları daha yüksek görülmüştür. *H. bacteriophora* ve chlorantraniliprole tank karışımlarında birbiri ile uyumlu olmuştur. Son olarak bu çalışmada, *H. bacteriophora* - chlorantraniliprole kombinasyonlarının, beyaz kurtçuk kontrolü için güvenli ve entegre zararlı yönetimiyle uyumlu bir alternatif olduğu tespit edilmiştir.

Garcia-del-Pino vd. (2010), Glyphosate ve MCPA'nın etkilerini gözlemlemek amacıyla S. feltiae ve *H. bacteriophora* IJ'leri üzerinde bir araştırma yapılmıştır. Bu çalışmada, IJ'ler 72 saat boyunca Glyphosate, MCPA ve Glyphosate+MCPA kombinasyonu olan herbisitlere maruz bırakılmıştır. Tüm herbisit uygulamalarında ve tüm konsantrasyonlarda, S. feltiae'nin *H. bacteriophora*'dan daha yüksek toleransa sahip olduğu tespit edilmiştir. Glyphosate+MCPA'ya maruz kalan nematodlarda %57 ile en yüksek ölüm oranı tespit edilmiş; sadece glyphosate uygulanan grupta ölüm oranı %15 ve sadece MCPA uygulanan grupta ölüm oranı ise %19 olarak bulunmuştur. *Galleria mellonella* larvaları üzerinde yapılan etkinlik testinde, Glyphosate+MCPA uygulanan grupta sinerjistik etki gözlenmiş ve etkinlik oranı önemli ölçüde azalmıştır. Diğer iki grupta ise, etkinlik açısından bakıldığında, kontrol grubu ile aralarında herhangi bir fark bulunmamıştır. Sonuç olarak, EPN'ler üzerinde bu aktif madde kombinasyonlarının sinerjistik etkiye sahip olabileceği düşünülmüş ve EPN'ler ile pestisitlerin ilaçlama tankına karıştırılmadan önce deneme yapılmasının daha faydalı olabileceği öngörülmüştür.

Atwa vd. (2013), yürüttüğü başka bir denemede ise; laboratuvar koşullarında *Steinernema* türü ve *Heterorhabditis* türü üzerinde 11 farklı fungusit etkisi incelenmiştir. Yapılan denemelerde *Steinernema* türünün *Heterorhabditis* türüne göre daha dirençli olduğu tespit edilmiştir. *Steinernema* nematod ırkının infektif juvenillerinin canlılık oranı, Chlorfluazuron uygulandığında %5'in altında bulunmuşken, Captan, Methomyl, Mancozeb, Benomyl, Trimiltox forte ve Diafenthiuron uygulanan gruplarda infektif juvenillerin canlılığı %90'dan fazla olmuştur. Ancak, *H. bacteriophora*'nın canlı/ölü oranının *Steinernema* sp. ırkından daha düşük olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, her iki ırk arasında farklı etken maddelere maruz kalma süreleri (48 ve 96 saat) ile üreme oranları açısından önemli derecede bir farklılık görülmemiştir.

Kulkarni vd. (2013), *Steinernema carpocapsae*'nin 2 insektisit imidacloprid ve thiomethoxam; 3 biyopestisit Neemgold, Spinosad ve Agropest Bt.'e karşı toleransı, kombine ve belirli uygulama türleri için rapor edilmiştir. Infektif juvenil (IJ) olan *S. carpocapsae,* farklı konsantrasyonlarda (0.05% ile 2.00% arasında) orman böceklerine karşı 72 saat boyunca maruz bırakılmış ve IJ'lerin hayatta kalma verileri kaydedilmiştir. Hayatta kalan IJ'lerin enfektivitesi, balmumu güvesi larvalarına karşı laboratuvar

ortamında test edilmiştir. Sonuçlar, *S. carpocapsae* IJ'lerinin test edilen pestisitlere karşı uyumlu olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak, önerilen dozlardan daha yüksek konsantrasyonlarda bile hayatta kalma ve enfektivite açısından kullanılabileceği tespit edilmiştir.

Laznik vd. (2013), çalışmalarında infektif juvenillerin (IJ'ler) (*Steinernema* ve *Heterorhabditis*) laboratuvar koşullarında 8 kimyasal ve biyo-pestisit ile uyumluluğu araştırılmıştır. IJ'lerin insektisitler ile doğrudan 6 ve 24 saat maruz kalmasının etkisi, 15, 20 ve 25°C'de bir petri kabında test edilmiştir. Çalışma, *S. carpocapsae ve S. kraussei*'nin tüm test edilen insektisitlere duyarlı olduğunu göstermiştir. *Steinernema feltiae*, azadirachtin, *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* toksini ve imidacloprid ile uyumlu iken, *H. bacteriophora* sadece abamectin ve lufenuron'a duyarlıdır. Hayatta kalan IJ'lerin yüzdesi, istatistiksel olarak en yüksek oranın 15°C'de 6 saatte %82 ve 20°C'de %80 olduğunu göstermiştir. 25°C'de ise %76 canlılık oranı istatistiksel olarak en düşük oran olmuştur. 24 saat sonra, 15°C - %55 ve 20°C - %55 arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmezken, 25°C'de hayatta kalan IJ'lerin yüzdesi istatistiksel olarak %59 ile en yüksek bulunmuştur. Bu araştırmaya göre. *S. feltiae* ve *H. bacteriophora*, azadirachtin ve pirimicarb ile uyumludur ve farklı sebze zararlılarına karşı böcek kontrolünde maliyeti düşürebilecek etkili bir alternatif sunabileceği düşünülmüştür.

Anes vd. (2016), *Steinernema thermophilum* entomopatojen nematodunun yaygın olarak kullanılan 12 insektisit, 5 herbisit ve 4 fungisit ile uyumluluğu değerlendirilmiştir. Triazofos, chlorpyrifos ve endosülfanın tüm test dozlarında ve en yüksek önerilen dozun iki katı 2, 4-D sodyum tuzu dışında, incelenen tüm pestisitlerde %98'den fazla nematodun hayatta kaldığı gözlemlenmiştir. *Galleria mellonella*'nın 4. dönem larvalarıyla en yüksek önerilen pestisit dozlarına maruz kalan infektif juvenillerin (IJ'ler), triazofos, chlorpyrifos ve endosülfan uygulanan IJ'ler dışında, virülensin korunduğunu doğrulamıştır. Çalışma, acetamiprid, bifentrin, carbosülfan, cypermethrin, deltametrin, imidacloprid, lambda-cyhalothrin, spinosad, thiomethoxam, atrazin, 2, 4-D sodyum tuzu, cyhalofop-butyl, isoproturon, pendimethalin, validamycin, mancozeb, carbendazim ve hexaconazole gibi önerilen pestisit dozlarının *S. thermophilum* ile tamamen uyumlu olduğunu ve entegre kullanım için püskürtme yöntemi ile tank karışımı olarak kullanılabileceğini sonuçlandırmıştır.

Ulu vd. (2016), ülkemizde sıklıkla kullanılan pestisitlerin TUR-S3 IJ'leri üzerindeki toksisitesi incelenmiştir. Toksisite testlerinde, 24 saat sonraki sayımlar sonucunda, Glyphosate ve Fosetyl-al uygulamalarının TUR-S3 IJ'leri üzerinde istatistiksel anlamda toksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak, Captan ve Chlorpyrifos-ethyl uygulamaları aynı ırk üzerinde istatistiksel olarak toksik bir etki göstermemiştir. 48 saat sonra yapılan sayımlarda ise kullanılan bütün pestisitlerin, kontrol grubuna göre TUR-S3 IJ'leri üzerinde istatistiksel olarak toksik etkiye sahip olduğu görülürken, pestisitler arasında da farklı toksik etkiler gözlenmiştir. Fosetyl-al en yüksek toksik etkiyi gösterirken, captan en düşük toksik etkiyi göstermiştir. Etkinlik testlerinde, pestisit içerisinde bekletilen ve *G. mellonella* üzerine enfeksiyon yapılan IJ'lerin etkinliği, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel açıdan sadece captan uygulamasındaki etkinlikte azalma görülmüş, diğer uygulamalarda herhangi bir olumsuz etki gözlenmemiştir. Tüm bu sonuçlara göre, araştırmada kullanılan aktif maddelerin genel olarak TUR-S3 IJ'leri üzerinde aşırı toksik etkiye sahip olmadığı ve captan haricinde EPN'lerin etkinliğinde herhangi bir düşüş olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, TUR-S3'ün Glyphosate, Chlorpyrifos-etil, Captan ve Fosetyl-al ile aynı tank içinde karıştırılarak uygulanmasında bir sakınca olmadığı görülmüştür. Aynı zamanda, toprak üzerinde doğal olarak bulunan entomopatojen nematodların da pestisitlerden olumsuz etkilenmeyeceği düşünülmüştür.

Kwizera (2017), laboratuvar ortamında yürüttüğü denemelerde, üç farklı EPN türü; *Steinernema carpocapsae, Steinernema feltiae, Heterorhabditis bacteriophora* ile üç farklı insektisit; acetamiprid, imidacloprid ve spinosadın birbiri ile olan etkilerini incelemiştir. Entomopatojen nematodların ölüm sayımları 24., 48., 96. saatlerde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, bazı neonikotinoidlerin ve EPN'lerin zararlı böcek larvalarına karşı oluşturduğu sinerjiden esinlenilmiş ve bu insektisitlerin EPN'ler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, imidaclopridin EPN'ler üzerinde daha az ölüme neden olduğu, ancak acetamipridin yüksek ölüm oranlarına sebep olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, çalışmada kullanılan insektisitlerin EPN'lere olumsuz bir etki yaratmadan zararlı böceklere karşı etkili bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

Chavan vd. (2018), laboratuvar koşullarında, pirinç ekosistemlerinde yaygın olarak kullanılan 14 insektisit, 6 fungisit ve 7 herbisitin entomopatojen nematod *Heterorhabditis indica* ile uyumluluğu araştırılmıştır. Bu kimyasalların, önerilen konsantrasyonlarda doğrudan maruziyet sonrası nematodun canlılığı ve virülansı üzerine etkisi incelenmiştir. *H. indica*, test edilen çoğu insektisite karşı tolere olmuş ve insektisitlerin tümünde (%19,5 monocrotophos ve %100 cartap hydroclorür hariç) %10'dan az nematod ölümü gözlenmiştir. Fungisitlerin tümünde (%14,5 trisiklazol ve %21,5 carbendazim+mancozeb hariç) %10'dan az ölüm gözlenmiştir. Herbisitlerin etkisine bağlı olarak nematod ölümü, maruziyetin 72. saatinde %3,5 ila %18 arasında değişmiştir. Insektisitler, *H. indica'*nın virülansı üzerinde sadece sınırlı bir etki göstermiştir. *Galleria mellonella* larvalarının tüm uygulamalardaki ölüm oranı, chlorpyrifos (%80) ve monocrotophos (%60) ile muamele edilen infektif juveniller hariç, %90'dan fazla olmuştur. Bu sonuçlar, *H. indica*'nın insektisitlerin çoğuyla, fungisitlerin çoğuyla (trisiklozol ve karbendazyum+mankozeb hariç) ve herbisitlerin biri olan pendimethalin ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

Yüksel vd. (2019), Entomopatojen nematodların (EPN) biyopestisitlerle birlikte kullanımının önemini vurgulamışlardır. Biyopestisitlerin EPN'ler üzerindeki toksik etkilerinin belirlenmesi, bu uygulamaların başarılı olabilmesi için önemli bulunmuştur. Bu sebeple araştırmada, üç farklı yerel EPN türünün (*Steinernema feltiae E-76, Heterorhabditis indica 216-H, S. littorale MGZ-4-S*) hayatta kalma ve virülensliği tespiti için iki farklı biyopestisitin (Azadirachtin ve Spinosad) etkisini değerlendirilmiştir. Denemeler, 24 ve 48 saatlik sürelerde, laboratuvar koşullarında, son dönem *Galleria mellonella* larvaları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Spinosad ve Azadirachtin'e doğrudan maruz kalan EPN türleri arasında ilk 24 saatte en yüksek canlılık oranına (%94) *H. indica 216-H* türünün sahip olduğu görülmüştür. Azadirachtine maruz kalanlar arasında *ise Steinernema littorale MGZ-4-S* izolatının en duyarlı tür olduğu belirlenmiş olup, 24 saatlik periyotta %11, 48 saatlik periyotta ise %12 ölüm oranlarına ulaşılmıştır. Test edilen EPN türlerinin *G. mellonella* larvaları üzerinde neden olduğu ölüm oranları %80 ila %100 arasında değişmiştir. Bu bulgular, laboratuvar koşullarında test edilen EPN türlerinin Spinosad ve Azadirachtin ile uyumlu olduğunu göstermiştir.

Özdemir vd. (2020), Türkiye'de sebze ürünleri için kayıtlı altı adet kimyasal pestisitin Türk entomopatojen nematod izolatları *Steinernema feltiae* (Filipjev) ve *Heterorhabditis*

bacteriophora (Poinar) ile uyumluluğu araştırılmıştır. Pestisitlerle muamele edilmiş EPN'lerin ölüm oranı ve üreme kapasitesi değerlendirilmiştir. Çalışmada, imidacloprid ve cyflumetofen'in EPN'lerin hayatta kalma ve üreme oranları üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı görülmüş ve en uyumlu pestisitler olarak kabul edilebilir oldukları düşünülmüştür. Fungisitler fluxapyroxad + difenoconazole ve ametoctradin + dimethomorph karışımları, *S. feltiae* üzerinde önemli ölüm oranlarına neden olmuş; ancak sadece fluxapyroxad + difenoconazole *H. bacteriophora'*nın canlılığı üzerinde olumsuz etki göstermiştir. Spiromesifen, spinosad ve fluxapyroxad + difenoconazole uygulanan *H. bacteriophora'*nın üreme kapasitesi önemli ölçüde düşük olsa da test edilen pestisitler arasında *S. feltiae'*nin üreme kapasitesi üzerinde olumsuz bir etki gözlenmemiştir. Bu çalışmada, cyflumetofen, fluxapyroxad + difenoconazole ve ametoctradin + dimethomorph'un EPN'lerle uyumluluğu ilk kez bildirilmiştir.

Kary vd. (2021), çalışmalarında iki tür entomopatojen nematodun, *Heterorhabditis bacteriophora* ve *Steinernema feltiae,* Patates yumru güvesi (*Phthorimaea operculella*)'ne karşı etkinliklerini karşılaştırmış ve aynı zamanda insektisit olarak kullanılan abamectin ile kombinasyonlarının laboratuvar ve sera denemelerindeki etkisini değerlendirmiştir. Sonuçlar, *S. feltiae'*nin, *Phthorimaea operculella*'nın ön-pupa ve pupa evresine karşı *H. bacteriophora'*ya göre önemli ölçüde daha virulent olduğunu göstermiştir. Her iki EPN türü de abamectin tarafından olumsuz etkilenmiştir, ancak etkisi *H. bacteriophora* üzerinde daha az belirgindir. Bu çalışma, nematodların kimyasal pestisitlerle etkileşim derecesinin nematod türü, kombinasyonun konsantrasyonu, hedeflenen zararlıların gelişim aşaması, maruz kalma yöntemi ve etkileşimin gerçekleştiği ortamın karmaşıklığı gibi bir dizi faktöre bağlı olduğunu göstermiştir. Sera çalışmasında, *S. feltiae* için sinerjistik etkiler, yalnızca daha düşük abamectin dozları ve daha yüksek *S. feltiae* konsantrasyonlarını içeren kombinasyonlarda gözlemlenmiştir. *H. bacteriophora* için, insektisit ve nematodun daha düşük konsantrasyonlarında sinerjistik etkili olmuştur. *H. bacteriophora* + insektisit kombinasyonlarında daha fazla sinerjistik etkileşim olması, *H. bacteriophora'*nın *S. feltiae'*ye kıyasla abamectine karşı daha düşük duyarlılığından kaynaklanmıştır. Bu çalışma, kimyasal insektisitler ve entomopatojen nematodların birlikte uygulanmasının hem girdilerin azaltılmasına hem de ekonomik

açıdan çekici bir seçenek olmasına olanak sağladığını göstermiştir. Son kullanıcılar için, nematod ve abamectin girdilerini azaltmak hem ekonomik açıdan hem de direnç yönetimi stratejisi olarak entegre kullanımı son derece çekici bir öneri haline getirmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. *Galleria mellonella* Larvalarının Üretilmesi

Arı kovanlarında önemli zararlara yol açan *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvaları, büyük balmumu güvesi veya petek güvesi olarak da bilinmektedir. Genellikle EPN'lerin *in vivo* üretiminde tercih edilen bu larvalar, laboratuvar şartlarında kolaylıkla yetiştirilebilmesi, büyük boyutlara sahip olmaları ve EPN'lere karşı hassas olmaları avantaj sağlamaktadır. EPN ile ilgili çalışmalarda *G. mellonella*'nın son dönem larvaları kullanılmaktadır (Şekil 3.1.) (Woodring ve Kaya 1988, Ehlers 1996, Shapiro-Ilan ve Gaugler 2002).



Şekil 3. 1. *Galleria mellonella*'ya ait son dönem larvalar (Sadıç, 2017)

Test böceği olarak kullanılan *G. mellonella* larvaları, inkübatörde 30-32 °C aralığındaki sıcaklıkta yetiştirilmektedir. *G. mellonella* larvaları için Çizelge 3.1'de belirtildiği ölçülerde gliserin, bal, kepek, soya unu, mısır unu, süt tozu, maya karıştırılarak özel bir besin hazırlanmaktadır (Kaya ve Stock, 1997).

İlk olarak; kepek, soya unu, mısır unu ve süt tozu bir karıştırma kabında karıştırılır. Başka bir kabın içerisinde bal ve gliserin hot-plate (ısıtıcı) kullanılarak 200 °C'ye kadar kaynatılır ve kaynayan bu karışımın üzerine maya eklenir. Maya eritildikten sonra diğer malzemeler yavaşça bal-gliserin-maya karışımının içerisine ilave edilir. Karışım homojen bir hal alana kadar karıştırma işlemine devam edilir. Sonrasında, hazırlanan besin soğuması için beklemeye alınır. Yeterince soğuyan besin cam kavanozların (1 kg'lık) tamamını doldurmayacak şekilde (Şekil 3.2.) kavanozlara doldurulur ve kavanozun

içerisine *G. mellonella* yumurtaları ilave edilir. Cam kavanozun ağız kısmı 2 mm çapında, sık gözenekli tellerle kaplanır ve kelepçe ile sıkıştırılarak kapatılır. Besinli kavanoza konan yumurtalar açılmaya başlayarak son dönem larva evresine ulaşmaları yaklaşık olarak 4 hafta sürmektedir (Özbudak, 2021).



Şekil 3. 2. *Galleria mellonella* yumurtaları için hazırlanan cam kavanozlar (Arabacı,2023)

Bu tez çalışmasında son dönem larvalar kavanoz içerisindeki besin ortamından temizlenip ayıklanarak, EPN'lerin *in vivo* ve *in vitro* üretilmesi aşamalarında ve araştırılmasında kullanılmıştır.

Üretim döngüsünün sürekliliğini sağlamak için yeteri kadar larva ayrılır, pupa ve ergin birey oluşumu gerçekleşmesinin ardından ergin bireylerin yumurta bırakması için hazırlanan tellerin üzerine kâğıt konulmaktadır. Böylece elde edilen yumurtalar, besin içeren farklı bir cam kavanoza alınarak *G. mellonella* üretiminin devamlılığı sağlanmaktadır.

Çizelge 3. 1. *Galleria mellonella* üretimi için besin içeriği ve miktarları

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



Şekil 3. 3. *Galleria mellonella* üretimi için hazırlanan besin (Arabacı, 2023)



Şekil 3. 4. Son dönem *Galleria mellonella* larvalarının kavanozdaki görüntüsü (Arabacı, 2023)

3.2. *Heterorhabditis bacteriophora* HbH Hibrit Irkı

Bu çalışmada kullanılmak üzere, entomopatojen nematod olarak *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Rhabtidita: Heterorhabditidae) türüne ait olan HBH hibrit ırkı tercih edilmiştir. HBH hibrit ırkı, Bursa Uludağ Üniversitesi bünyesinde bulunan Ziraat Fakültesi'nin Bitki Koruma Bölümü'nde Nematoloji Laboratuvarı tarafından 2010-2013 yılları arasında yürütülen TÜBİTAK projesi (TOVAG 110O161) kapsamında elde edilmiştir. Bu projede, Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilen farklı *H. bacteriophora* izolatları hibritlenmiş ve daha üstün özelliklere sahip olan HBH hibrit ırkı geliştirilmiştir. HBH hibrit ırkı, yüksek sıcaklığa dayanıklılık, yüksek üreme kabiliyeti ve yüksek etkinlik gibi özelliklere sahiptir (Ulu, 2021). Ayrıca söz konusu bu hibrit ırk, Türk Patent ve Marka Kurumu tarafından 2018 yılında patent almıştır (Patent No: TR 2013 06141 B). Bu tez çalışmasında HBH hibrit ırkı; dünya genelinde kolayca bulunan bir EPN türüne dayanması, ülkemize uyum sağlamış izolatlar kullanılarak elde edilmesi ve gelecekte EPN kullanımının artmasıyla birlikte ticari üretim için gereksinim duyulan bir ırk olacağı öngörüsüyle tercih edilmiştir.

Çizelge 3. 2. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH hibrit ırkı ve ebeveynleri

Ebeveyn Irklar	Hibrit Irk
Hb.4 ♀ × Hb.1138 ♂	HbH

3.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Ortamlar ve İçerikleri

In vivo ve *in vitro* üretim aşamaları için, çeşitli ortamlar ve kimyasal maddeler de dahil olmak üzere birtakım ön işlemler gerekmektedir. Katı ortamlar, steril plastik petrilere (çapı 6 cm) hazırlanmıştır. Sıvı ortamlar ise 250 ml hacimli erlenmeyer flasklara hazırlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan ortamlar ve ortamların içerikleri aşağıdaki çizelgelerde belirtilmiştir.

3.3.1. Ringer Solüsyonu

Ringer çözeltisi, tıp ve biyoloji alanlarında kullanılan steril izotonik bir çözeltidir. İlk olarak 19. yüzyılda İngiliz bir fizyolog olan Sydney Ringer tarafından canlı dokuların fizyolojisini incelemek amacıyla geliştirilmiştir.

Ringer çözeltisi genellikle birkaç temel elektrolit olan sodyum klorür (NaCl), potasyum klorür (KCl), kalsiyum klorür (CaCl2) ve sodyum bikarbonat (NaHCO3) kombinasyonunu içerir ve saf su içinde çözünmüştür (Şendir, 2018). Tam bileşimi kullanım amacına veya uygulamaya bağlı olarak değişebilmektedir.

Çizelge 3. 3. Ringer solüsyonu içeriği

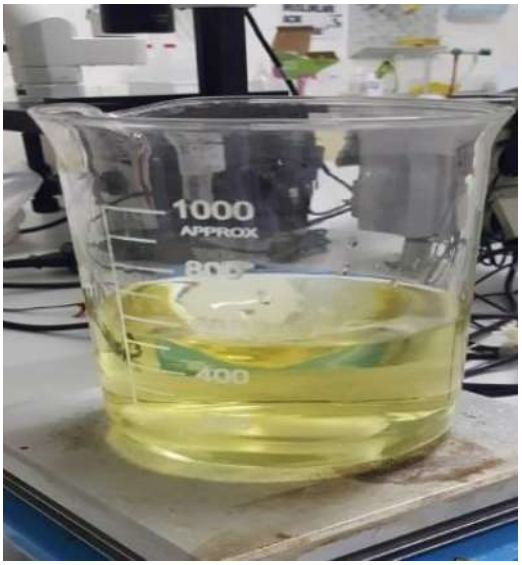
Kimyasal Madde	Miktar
NaCl	9.00 g
KCl	0.42 g
$CaCl_{2x}2H_2O$	0.37 g
$NaHCO_3$	0.20 g
Saf su	1000 ml

3.3.2. YS (Yeast Extract) Sıvı Besin Ortamı

Yeast extract (YS) kombinasyonu, bir besiyeri ortamında mikroorganizmaların büyümesini desteklemek için kullanılmaktadır. Maya özütü; zengin bir besin kaynağını, tuz ise osmotik dengeyi sağlamaktadır (Tangüler, 2004). Bu bileşenler, mikroorganizmaların beslenmesi, büyümesi ve metabolik faaliyetlerini gerçekleştirmesi için gereken temel ihtiyaçları karşılamaktadır. YS sıvı besin ortamı, mikroorganizmaların çoğalması ve gelişimi için uygun bir ortam oluşturmaktadır.

Çizelge 3. 4. YS sıvı besin ortamı içeriği

Kimyasal Madde	Miktar
Yeast Extract	5.0 g
NaCl	5.0 g
NH4H2PO4	0.5 g
K2HPO4	0.5 g
MgSO4x7H2O	0.2 g
Saf Su	1000 ml



Şekil 3. 5. YS sıvı besin ortamı hazırlama aşaması (Düzenli, 2021)

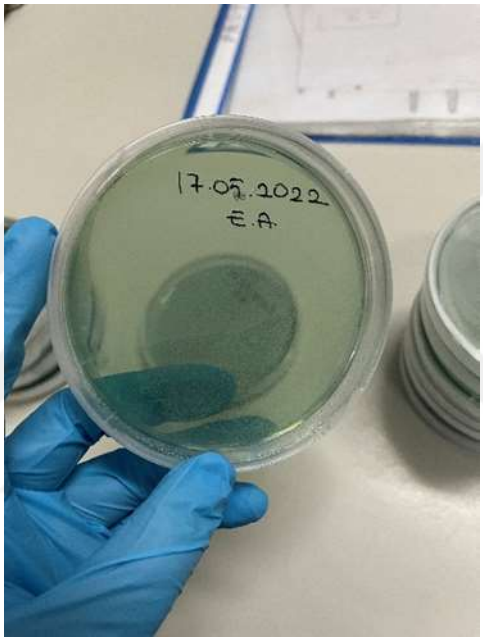
3.3.3. NBTA (Nutrient bromothymol blue agar) Agar

NBTA Agar (Nutrient Broth with Triphenyltetrazolium Chloride and Agar), mikrobiyolojide kullanılan bir besiyeridir. NBTA Agar, Triphenyl-tetracolium chloride (TTC) içeren bir nutrient broth (besi çözeltisi) üzerine agar katılaştırıcı eklenerek hazırlanmaktadır.

NBTA Agar, özellikle bazı bakteri türlerinin indirgenme yeteneklerini değerlendirmek için kullanılır. TTC'nin indirgenmesi sonucunda oluşan formazan, besiyeri üzerinde kırmızı bir renk oluşturur. Bu renk, mikroorganizmaların büyümesi ve metabolik aktiviteleriyle ilişkilidir (Akhurts, 1980).

Çizelge 3. 5. NBTA (Nutrient bromothymol blue agar) agar içeriği

Kimyasal Madde	Miktar
Standard-I-Nutrient Agar 2,3,5-Triphenyl-tetracoliumchloride solution Bromthymolblue Saf Su	37.0 g 4.0 g 0.025 g 1000 ml



Şekil 3. 6. Petrideki NBTA agar görüntüsü (Arabacı, 2022)

3.3.4 Nutrient Lipid (Wouts) Agar

Nutrient Lipid Agar (NLA), lipofilik (yağ seven) mikroorganizmaların yetiştirilmesi ve izolasyonu için kullanılan bir besiyeridir. Bu besiyerinin amacı, lipitleri kullanarak büyüyebilen mikroorganizmaların gelişmesini teşvik etmektir.

NLA' nın bileşimi, temel bir besiyerine ek olarak lipid kaynakları ve diğer besin maddelerini içermektedir. Agar besiyeri, uygun bileşenlerin karıştırılması, sterilizasyonu ve petri kaplarına dökülerek katılaştırma işlemiyle hazırlanmaktadır.

Çizelge 3. 6. Nutrient Lipid (Wouts) agar içeriği

Kimyasal Madde	Miktar
Nutrient Broth	16.0 g
Ayçiçek Yağı	5.0 g
Agar Powder, Bacteriological	12.0 g
Saf Su	1000 ml



Şekil 3. 7. Petrideki Wouts Agar görüntüsü (Arabacı, 2022)

3.3.5. Sterilizasyon Solüsyonu

Sterilizasyon solüsyonları, laboratuvar ortamlarında veya sağlık sektöründe sterilizasyon işlemlerinin gerçekleştirilmesi için kullanılan kimyasal maddelerdir. Bu solüsyonlar, mikroorganizmaların öldürülmesi veya etkisiz hale getirilmesi amacıyla kullanılmaktadır**.**

Çizelge 3. 7. Sterilizasyon solüsyonu içeriği

Kimyasal Madde	Miktar
4 M NaOH	1 ml
NaOCl	1 ml
Saf Su	10 ml

3.4. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının *In Vivo* Yöntem ile Üretilmesi

Galleria mellonella' nın son dönem larvaları ve 24 kuyulu hücre kültür kapları (düz kuyulu plak) kullanılarak *in vivo* üretim yapılmıştır. Düz kuyulu plaklarda 2 cm derinlikte ve 1,5 cm çapında olan hücrelere bir adet larva konulmuştur. Kuyucukların üzeri Ringer solüsyonu ile nemlendirilmiş steril kum ile kapatılmıştır. Ringer solüsyonu ile nemlendirilen kumun nem oranı %10' dur.

Kuyucukların içerisinde bulunan her bir larva için 100 adet infektif juvenil (IJ) inoküle edilmiş ve kaplar plastik parafin film ile hava almayacak şekilde kapatılmıştır (Susurluk vd. 2001, 2003). Kaplar +24°C' de inkübasyona bırakılmıştır ve 4 gün içinde inokulasyon tamamlanmış, *G. mellonella* larvaları ölmüştür. Ölen larvalara "kadavra" denilmektedir. Larvaların ölümünden bir süre sonra, kadavralarda yumuşaklık ve renk değişiklikleri meydana gelmektedir. Büyük mum güvesi (*G. mellonella*) larvalarında, nematod türüne bağlı olarak kadavralarda farklı renklenmeler gözlemlenmektedir. *Steinernema* spp. enfeksiyonunda koyu sarıdan başlayarak kahverenginin çeşitli tonlarına veya tamamen siyah renge kadar değişiklikler görülürken, *Heterorhabditis* spp. ile enfekte böceklerde kırmızı, tuğla rengi, mor, turuncu veya sarı renkler görülmektedir. Kadavranın renklenmesi özellikle *Photorhabdus* spp. bakterilerinin üretmiş olduğu pigmentlerle ilişkilidir (Woodring ve Kaya, 1988). Bu çalışmada *H. bacteriophora* hibrit ırkı kullanıldığı için kadavraların rengi kırmızı-bordo olarak gözlenmiştir.

Kadavralar Ringer solüsyonuyla yıkanmış ve White Trap düzeneğine yerleştirilmiştir. White Trap düzeneğinde 9 cm çapında cam petrinin içine ters çevrilmiş 6 cm çaplı başka bir cam petri yerleştirilerek üzerine filtre kâğıdı konulmuştur. Daha sonra EPN'lerle enfekte olan larvalar bu filtre kâğıdının üzerine yerleştirilmiştir. Düzeneğin içerisine 15 ml steril Ringer solüsyonu eklenerek 14 gün boyunca takip edilmiştir. Yeterli sayıda IJ'nin çıkması ve petrideki Ringer solüsyonu içinde birikmesiyle *in vivo* üretim tamamlanmıştır. IJ'ler pastör pipet yardımıyla alınmış olup oksijen alışverişi sağlayan özel kapaklı flask kutular içerisine aktarılmıştır. Flask kutulara aktarılan IJ'ler +4°C'de buzdolabında saklanmıştır (Kaya ve Stock, 1997).

Flask kutularda Ringer solüsyonu içerisinde depolanan bu kültürlerin laboratuvarda, gerekli araştırmalarda, kullanılabilirliğinin aksamaması amacıyla *in vivo* üretim yöntemi

kullanılarak devamlı bir kültür yenilemesi yapılmıştır. Ringer solüsyonu, depolama süresince mikroorganizma büyümesini engellemektedir (Sadıç, 2017).

3.5. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının *In Vitro* Yöntem ile Üretilmesi

Entomopatojen nematodların *in vitro* koşullardaki üretimi iki farklı şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Bunlar; sıvı agar ortamı ve katı agar ortamıdır. Bu tez çalışmasında, *in vitro* üretim katı agar ortamında yapılmıştır.

Katı agar ortamında iki aşama bulunmaktadır. İlk aşama; EPN ile simbiyont ilişkide olan bakterinin izole edilmesini içerir. İkinci aşama ise; üretim yapılacak EPN'den yumurtaların izole edilmesini içerir. Bu iki aşama başarılı bir şekilde tamamlandığında, *H. bacteriophora* HBH Hibrit ırkına ait sağlıklı bireyler katı agar ortamında *in vitro* olarak elde edilebilir. Bu aşamaların detayları aşağıdaki alt başlıklarda verilmiştir.

3.5.1. *Photorhabdus* spp. Bakteri İzolasyonu

Entomopatojen nematodlar biyolojileri sebebiyle, konukçunun öldürülebilmesi ve hayat döngülerinin devamlılığı için simbiyotik bakterilere ihtiyaç duymaktadır (Poinar, 1975; Forst vd. 1997). *H. bacteriophora* ile simbiyont ilişkisi içerisinde olan *Photorhabdus luminescens* adlı bakteri, özel bir kese içinde bulunur. Bu bakteri, *H. bacteriophora*'nın barsak kısmında yer almaktadır (Endo ve Nickle 1994, Duchaud vd. 2003). *Photorhabdus* spp. ile EPN arasında olan bu simbiyont ilişki EPN'lerin *in vitro* üretiminde önemli bir rol oynamaktadır.

Photorhabdus spp. izolasyonu için öncelikle *G. mellonella* larvaları ile EPN'lerin bir araya getirilmesi gerekmektedir. Bu sebeple, toplamda 5 adet son dönem larva olacak şekilde, hücre kültürüne koyulan her bir *G. mellonella* larvasının üzerine Ringer solüsyonuyla nemlendirilen steril kum ilave edilmiştir. Yine her bir larvanın üzerine 100 adet IJ inokulasyonu yapılmıştır. *In vivo* üretimde olduğu gibi kaplar plastik parafin film ile hava almayacak şekilde kapatılmıştır. Hücre kültürü kapları +24 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

İnokulasyonun ardından 24-36 saat içinde yaşamsal fonksiyonları yavaşlayan ve ölmek üzere olan larvalar, hücre kültür kaplarından çıkartılarak üzerlerindeki kumdan arındırılması amacıyla Ringer solüsyonu ile yıkanmıştır. Larvalar mikrosantrifüj tüplere (Eppendorf tüp) alınmış ve tüplere %70'lik etil alkol eklenerek yaklaşık 5 dakika bekletilmiştir. Bekletme süresinin 5 dakikayı aşmaması, bakterinin canlı kalması açısından önemlidir (Çakır, 2022). Bu şekilde yüzey sterilizasyonu sağlanan larvalar steril bir ortamda (steril kabin) kurutulmuş ve bakteri izolasyon işlemine hazır bir hale getirilmiştir.

Yüzeyi kuruyan larvalar, steril kabin içerisinde, steril iğne ile, larvanın intersegmental zarından veya abdomen bacaklarından delinmiş ve hemolimf sıvısının delinen noktadan bir miktar çıkması sağlanmıştır. Çıkan hemolimf sıvısı, steril öze ile NBTA agar üzerine sürülüp parafin film ile kapatılmıştır. İşlem yapılan petri kapları inkübasyon için +24 °C'de 3 gün boyunca bekletilmiştir. Simbiyotik bakterinin katı ortamda üretilmesinin amacı, istenmeyen mikroorganizmaların izolasyon işlemi sırasında tespit edilmesi ve henüz daha agar ortamında iken elimine edilmesidir (Ulu, 2021).

Agar üzerinde bakteri kolonileri gözlemlenmeye başladığında, steril öze yardımıyla kolonilerden bir miktar alınarak 250 ml'lik erlenmeyer içindeki 80 ml'lik YS sıvı besin ortamına transfer edilmiştir. YS besin ortamı, orbital çalkalayıcıda (180 rpm), +25°C'de, ışık almayan bir ortamda 1 gün bekletilerek bakterilerin çoğalması için uygun ortam sağlanmıştır.

Bir gün YS besin ortamında, belirtilen koşullarda bekletilen bakteriler sonraki çalışmaların daha hızlı yürütülebilmesi amacıyla stoklanmıştır.
Stok oluşturabilmek için, steril kabin içerisinde bakteri kültürüne %10 gliserin ilave edilmiştir. Hazırlanan bu karışım mikrosantrifüj tüplere 1'er ml olacak şekilde aktarılmış ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de buzdolabında saklanmıştır (Lunau vd., 1993).

3.5.2. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkı Yumurta İzolasyonu

Entomopatojen nematodların sıvı ve katı ortamlarda toplu üretiminin yapabilmesi için yumurta izolasyonu adı verilen bir ön işlemin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu işlem için, dişi veya hermafrodit bireyin döllenmiş yumurtaları steril bir ortamda izole edilerek açılması ve belirli bir süre boyunca yumurtaların gelişmesi beklenmektedir. *In vitro* üretimin tamamlanması için, bakteri izolasyonunun ardından yumurta izolasyonu gerçekleştirilmektedir.

İlk olarak, *in vivo* üretime benzer şekilde 24 kuyulu hücre kültür kabının her bir hücresine 1 adet *G. mellonella* larvası koyulmuştur. Larvaların üzeri %10 ringer solüsyonu ile nemlendirilen steril kum ile kapatılmıştır. Her bir larva için, mikropipet ile 100 adet IJ inoküle edilmiştir. Hücre kültür kabı parafin film ile kapatılmış 3-4 gün süre ile +24°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon tamamlandığında hücre kültür kabı açılmış ve hermafrodit bireylerin döllenmesinin kontrolü için larvalar cam petriye alınarak disekte edilmiştir. Diseksiyon; herhangi bir organizmanın iç yapısını gözlemlemek amacıyla dışının yarılıp parçalara ayrılması anlamına gelmektedir.

Bu işlemin ardından, cam petri (6cm çaplı) içerisine ringer solüsyonu eklenmiş ve elde edilen 250-300 adet hermafrodit birey başka bir cam petriye aktarılmıştır. Yumurtaların döllenmesi durumu mikroskop altında kontrol edilmiştir.

Döllendiği tespit edilen yumurtaların temizlenip izole edilebilmesi için, hermafrodit bireyler pastör pipet ile cam tüp (laboratuvar tüpü) içerisine aktarılmıştır. Cam tüp içerisine 5 ml ringer solüsyonu ilave edilip hermafrodit bireylerin dibe çökmesi beklenmiş ve yukarıda kalan kirli ringer solüsyonu pipet ile çekilip tüpten uzaklaştırılmıştır. Hermafrodit bireyler kadavra pisliklerinden arındırılana dek, yüzey yıkama işlemi tekrar edilmiştir.

Cam tüp içerisine, kesilerek küçültülmüş jilet parçaları ilave edilmiş ve 1 dakika boyunca vorteks yapılmıştır. Bu işlem ile hermafrodit bireylerin parçalanması hedeflenmektedir.

Bu sayede, parçalanan hermafroditlerin içindeki yumurtalar açığa çıkmaktadır. Vorteks süresinin belirtilen süreden daha az tutulması, hermafroditlerin parçalanmamasına; vorteks süresinin belirtilen süreden daha çok tutulması ise yumurtaların parçalanmasına sebep olabilmektedir. Bu gibi istenmeyen durumlarla karşılaşılmaması için, vorteks süresi kritiktir (Düzenli, 2021). Ringer solüsyonun bulanık-beyazımsı bir renk alması idealdir.

Hermafrodit bireylerden ayrılan yumurtalar başka bir cam tüpe aktarılması amacıyla ince bir tül kullanılarak süzülmüştür. Hermafrodit bireylerde de yapıldığı gibi, yumurtalar yüzey temizliği için mikrosantrifüj tüplere aktarılmıştır. İçerisinde yaklaşık 1 ml ringer solüsyonlu yumurta bulunan tüpler 2000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra, yumurtalar tüpün tabanına çökmüş durumda (pellet), üst kısımda kalan sıvı ise (supernatant) cam pipet ile alınmış ve üzerine ringer solüsyonu ilave edilmiştir. Bu aşama, yumurtaların yüzeyinde bulunan hermafrodit ve diğer bazı artıkların temizlenmesi amacıyla 3-4 kez tekrar edilmiştir. Santrifüj esnasında bazı yumurtalar kaybedilmektedir. Aynı işlemin fazla sayıda tekrar edilmesi ise tüm yumurtaların kaybına yol açabilmektedir (Düzenli, 2021). Son santrifüj işlemiyle yumurtalar tamamen tabana inmiş ve supernatant temizlenmiştir.

Bu adımdan sonra geriye kalan sıvı, cam pipetle alınmış ve yumurtaların yüzey sterilizasyonunun yapılması için mikrosantrifüj tüplere sterilizasyon solüsyonu eklenmiştir. Sterilizasyon işleminin tamamı yedi dakikada tamamlanmalıdır. Aksi halde, daha kısa sürede tamamlanması sonraki aşamalarda kontaminasyon sorununa yol açarken daha uzun sürede tamamlanması ise yumurtaların ölmesine sebep olmaktadır (Ulu, 2021).

Sterilizasyonu solüsyonu eklenen mikrosantrifüj tüpler dört dakika boyunca elde nazikçe çalkalanmış, ardından 3000 rpm'de iki dk. süresince santrifüj edilmiştir. Sterilizasyon solüsyonu ile yalnızca bir kez santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir.

Santrifüj işlemi sayesinde dibe çöken yumurtaların üzerinde kalan sterilizasyon solüsyonunu tüplerden uzaklaştırmak amacıyla steril cam pipet kullanılmıştır. Sterilizasyon solüsyonundan ayrılan yumurtaların üzerine YS besin ortamı ilave

edilmiştir. Bu işlem steril kabin içerisinde ve mikrosantrifüj tüplerin tüp standına dizilmesiyle gerçekleştirilmiştir.

İçerisinde besin ortamı ve yumurtaların bulunduğu tüpler iki dakika süreyle 3000 rpm'de son kez santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen tüpler ve steril 24 kuyulu hücre kültür kabı steril kabin içerisine getirilmiştir. Burada açılan hücre kültür kabının hücrelerine eşit miktarda YS sıvı besin ortamı koyulmuş ve üzerine yumurtalar eklenmiştir. Hücre kültür kabının etrafı parafin film ile hava almayacak şekilde kapatılmıştır.

Hücre kültür kabı 48-72 saat +24°C yumurtaların açılması amacıyla inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3. 8. Steril kabin içerisinde hücre kültür kabı (Arabacı, 2023)

3.5.3. Katı Nematod Kültürünün Oluşturulması

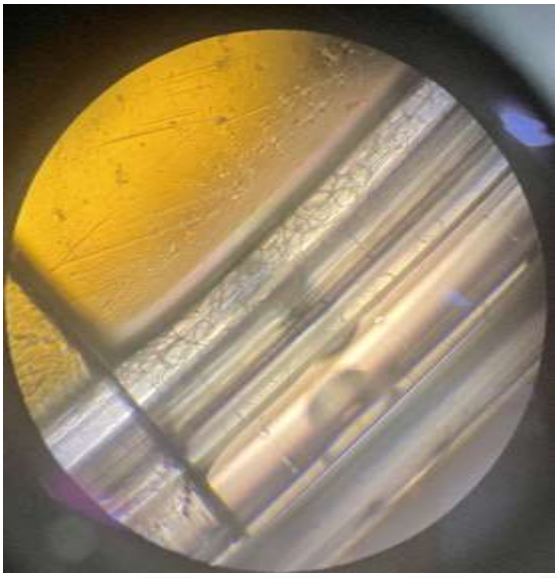
Entomopatojen nematodların *in vitro* üretimi çoğuklukla monoksenik kültür şeklinde gerçekleştirilmektedir. Monoksenik kültür; ortamda başka bir organizmanın bulunmadığı, bilinen tek bir bakteri varlığı ile kontrollü bir üretim şeklidir. Yalnızca EPN ve simbiyotik bakteriyi içermektedir (Ulu, 2018). EPN; nematodun kendisi ve simbiyotik bakteriden oluşan bir biyolojiye sahiptir. Bu nedenle üretim sürecinde yumurta izolasyonu ve bakteri izolasyonu gibi iki ayrı işlem bulunmaktadır.

HBH hibrit ırkının *in vitro* üretimi için yumurta izolasyonu aşaması gerçekleştirilmiş, yumurtalar başarılı bir şekilde açılmış ve bir kontaminasyon olmadan işlem tamamlanmıştır. Öte yandan, bakteri izolasyonu da tamamlanmış ve sıvı ortamda simbiyotik bakteriler başarılı bir şekilde üretilmiştir. Katı nematod kültürünün oluşturulmasıyla, yumurtalardan çıkış yapan J1'ler ve simbiyont bakterilerin bir araya getirilmesi amaçlanmaktadır.

HBH hibrit ırkının *in vitro* üretimi için ilk adımda, daha önce izole edilip mikrosantrifüj tüplerde, -20°C'de saklanan simbiyont bakteri stoklarından iki adet tüp çıkartılmış ve oda sıcaklığında çözündürülmüştür. Oda sıcaklığına gelen simbiyont bakteri, 250 ml'lik erlenmeyer flask içerisine, 70 ml steril YS sıvı besin ile birlikte ilave edilmiştir. Karanlık bir ortamda, +25°C'de ve 180 rpm hızında ayarlanmış orbital çalkalayıcıda 1 gün süreyle inkübe edilerek simbiyont bakterilerin üremesi sağlanmıştır.

Gelişen bakteri kültüründen yaklaşık 100 µl (5-6 damla) olacak şekilde, 6 cm çapında plastik petri kaplarındaki nutrient lipid (wouts) agar üzerine dökülmüş ve bir gün süre ile inoküle edilmiştir. İnokülasyon işleminin ardından hermafroditlerden izole edilmiş olan yumurtalardan başarılı bir şekilde çıkış yapan J1'ler, simbiyont bakteriyle inokule edilmiş wouts agara aktarılmıştır. Petri kapları parafin film ile kapatılmış olup +25°C'de karanlık bir ortamda inkübe edilmiştir.

Agar içerisindeki bireyler bakteri ile karşı karşıya geldiğinde, besin sinyalini almış ve üremeleri sağlanmıştır. İnkübe edilen tüm petri kapları, IJ'lerin gelişiminin gözlemlenmesi amacıyla günlük olarak iki hafta süresince kontrol edilmiştir. Petri kaplarının kapağı açılarak, kapağın üzerine kadar çıkan IJ'lerin alınması için Ringer solüsyonuyla yıkanıp flasklara transfer edilmiştir. Bu işlemlerin başarılı bir şekilde tamamlanması ile EPN'ler *in vitro* katı ortamda üretilmiştir.



Şekil 3. 9. Petri kapağına çıkan IJ'lerin mikroskoptaki görüntüsü (Arabacı, 2022)

3.6. *In Vivo* ve *In Vitro* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Toprağa Uygulanan Bazı Pestisitlere Karşı Dayanıklılığının Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında kullanılmak üzere; ülkemizdeki üreticilerin tarımsal hastalık, zararlı ve yabancı otlar ile mücadelede tercih etmesi, ayrıca entomopatojen nematodların toprak altında yaşamsal faaliyetlerini devam ettirmesi sebebiyle toprağa uygulanan 3 adet pestisit seçilmiştir. Bu pestisitler; 1 adet insektisit, 1 adet herbisit ve 1adet fungusit şeklinde planlanmıştır. İnsektisit olarak Lambda cyhalothrin; herbisit olarak Pendimethalin; fungusit olarak ise Kükürt aktif maddeleri belirlenmiştir.

Seçilen pestisitlerin tarla dozları seyreltilmiş olup her bir petri için, 1,5 ml lambda cyhalothrin/5 ml su, 8,5 µl pendimethalin/5 ml su, 3 µl kükürt/5 ml su dozlarda hazırlanmıştır. Her bir petri kabına yaklaşık 200 adet IJ konulmuştur. Denemelerde 6 cm'lik plastik petri kapları kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan *H. bacteriophora* HBH ırkı IJ'leri, *in vivo* ve *in vitro* olmak üzere iki farklı yöntem ile üretilmiştir. IJ üretim yöntem ve aşamaları bölüm **3.4.** ve **3.5.**'te ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır. Denemeler oda sıcaklığında, 5 tekerrürlü olarak yürütülmüştür.

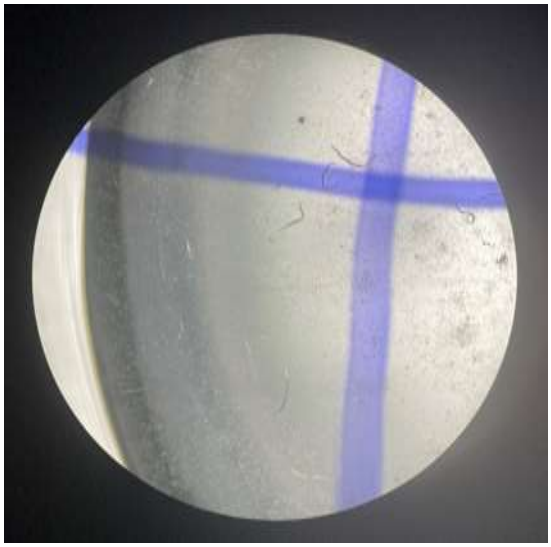
3.6.1. *In Vivo* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Toprağa Uygulanan Bazı Pestisitlere Karşı Dayanıklılığının Belirlenmesi

In vivo yöntem ile üretilen ve stoklanan *H. bacteriophora* IJ'lerinin stereo mikroskop altında sayımı yapılmıştır. IJ'ler 24 kuyulu hücre kültür kapları içerisine alınarak sayım işlemi kolaylaştırılmıştır. Her aktif madde (lambda cyhalothrin, pendimethalin, kükürt) için 5 tekerrür ve 1 kontrol düzeneği hazırlanmıştır. Toplamda 18 adet 6 cm çaplı plastik petrilere, petri başına yaklaşık 200 IJ eklenmiştir. Belirlenen dozlarda (1,5 ml lambda cyhalothrin/5 ml su; 8,5 µl pendimethalin/5 ml su; 3 µl kükürt/5 ml su) hazırlanan aktif maddeler mikropipet yardımı ile petrilerin içerisine ayrı ayrı ilave edilmiş ve IJ'ler ile buluşturulmuştur. Petrilerin kapakları kapatılıp etrafı parafin film ile hava almayacak şekilde sarılmıştır.



Şekil 3. 10. Pendimethalin aktif maddesinin in vivo yöntem ile üretilen IJ'lere uygulanması (Arabacı, 2023)

24. saatin sonunda stereo mikroskopta canlı IJ sayımları gerçekleştirilmiştir. Sayım sırasında petri içerisindeki aktif madde – IJ karışımının sıcaklık, nem gibi durumlardan etkilenmemesi amacıyla petrilerin kapakları daima kapalı kalmıştır. Bu işlem her bir aktif madde için, 48. ve 72. saatlerde de tekrarlanarak canlı IJ sayıları not edilmiştir.



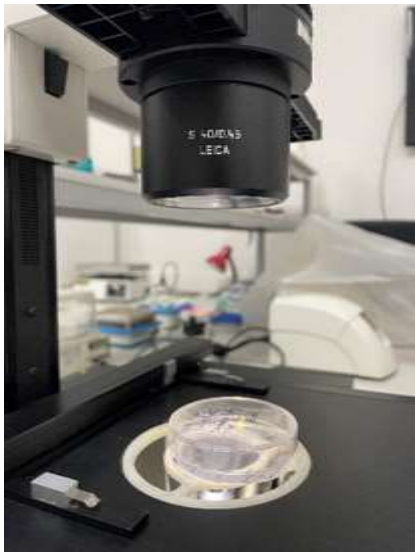
Şekil 3. 11. Canlı IJ'lerin stereo mikroskop altındaki görüntüsü (Arabacı, 2023)

3.6.2. *In Vitro* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Toprağa Uygulanan Bazı Pestisitlere Karşı Dayanıklılığının Belirlenmesi

In vivo yöntem ile üretilen HBH hibrit ırkının lambda cyhalothrin, pendimethalin ve kükürt aktif maddelerine karşı dayanıklılığının belirlenmesinde uygulanan işlemlerin tamamı *in vitro* yöntem ile üretilen IJ'ler için de uygulanmıştır. *In vitro* yöntem ile üretilen *H. bacteriophora* IJ'lerinin sayımı stereo mikroskop altında gerçekleştirilmiştir. Sayım işlemi için 24 kuyulu hücre kültür kabı kullanılmıştır.



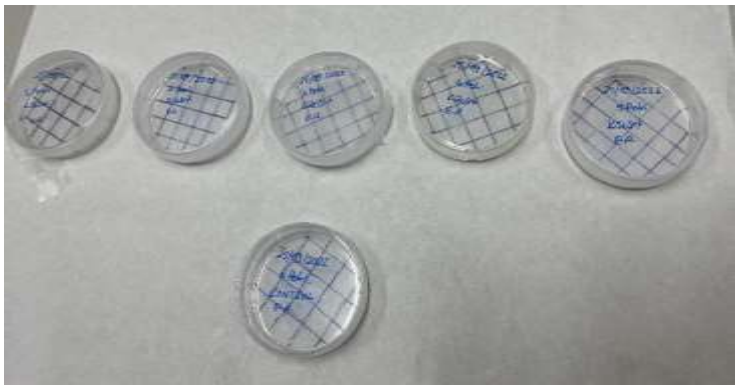
Şekil 3. 12. IJ sayımı için kullanılan 24 kuyulu hücre kültür kabı (Arabacı, 2023)



Şekil 3. 13. Stereo mikroskop altında canlı IJ sayımı (Arabacı, 2023)

Lambda cyhalothrin, pendimethalin ve kükürt aktif maddeleri için ayrı ayrı 5 tekrar ve 1 kontrol grubu olmak üzere toplamda 18 adet 6 cm çaplı plastik petri hazırlanmıştır. Her bir petriye yaklaşık olarak 200 IJ eklenmiştir. Belirlenen dozlarda (1,5 ml lambda cyhalothrin/5 ml su; 8,5 µl pendimethalin/5 ml su; 3 µl kükürt/5 ml su) su ile seyreltilen aktif maddeler, mikropipet kullanılarak ayrı ayrı petrilere eklenmiş ve IJ'ler ile bir araya getirilmiştir. Petri kapakları kapatılarak etrafı parafin film ile sarılmıştır.

Canlı IJ'lerin sayımları 24. saatin sonunda stereo mikroskop altında gerçekleştirilmiştir. Sayım sürecinde, petrilerin dış ortamdaki faktörlerden etkilenmemesi için petri kapakları her zaman kapalı tutulmuştur. Bu işlem, her bir aktif madde için 48. ve 72. saatlerde tekrarlanmış ve canlı IJ sayıları kaydedilmiştir.



Şekil 3. 14. Kükürt aktif maddesinin uygulandığı petri kapları (Arabacı, 2022)

3.7. İstatistiksel Analizler

Heterorhabditis bacteriophora HBH ırkının *in vivo* ve *in vitro* üretim sonrası toprağa uygulanan bazı pestisitlere karşı dayanıklılığını belirlemek amacıyla yapılan denemelerde elde edilen veriler, tek yönlü varyans analizi (Oneway Anova) yöntemiyle analiz edilmiştir.

Uygulamalar arasındaki farkların belirlenmesi için $p<0.05$ düzeyinde LSD (Least Significant Differences) testi kullanılmıştır. Bu test, farklı uygulama grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farkları belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Tüm istatistiksel analizler, JMP® 7.0 programında gerçekleştirilmiştir. Bu yazılım, istatistiksel analizlerin yapılması ve sonuçların değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılan bir istatistiksel analiz aracıdır.

4. BULGULAR

4.1. *In Vivo* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Toprağa Uygulanan Bazı Pestisitlere Karşı Dayanıklılığı

Yapılan denemeler sonucunda elde edilen canlı IJ verileri dikkate alındığında, *in vivo* üretim yolu ile üretilen *H. bacteriophora* HBH hibrit ırkının lambda cyhalothrin, pendimethalin ve kükürt aktif maddelerine karşı canlı kalma yüzdeleri istatistiksel açıdan incelenmiştir. Bulgular aşağıdaki maddelerde detaylı olarak incelenmektedir.

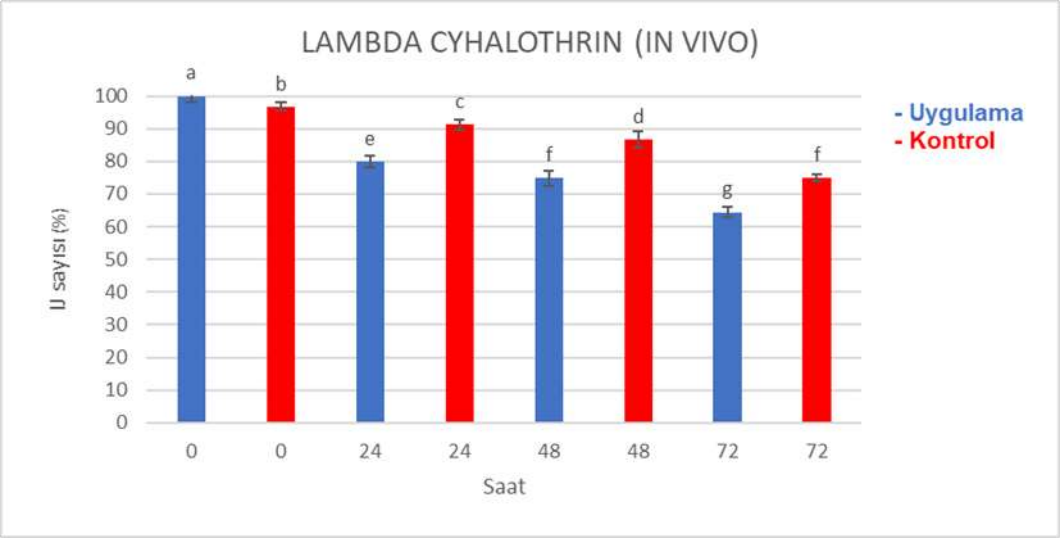
4.1.1. *In Vivo* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Lambda Cyhalothrin Aktif Maddesine Karşı Dayanıklılığı

In vivo yöntem ile elde edilen *H. bacteriophora'*ya ait infektif juveniller 24, 48 ve 72 saat boyunca lambda cyhalothrin aktif maddesine maruz bırakılmıştır.

24 saatlik maruziyet sonucunda canlı IJ sayılarında, kontrol grubuna (%91,29 canlı IJ) kıyasla uygulama grubunda (%79,82 canlı IJ) istatistiksel olarak azalma görülmüştür.

48 saatlik maruziyet sonucunda ise; canlı IJ sayılarında kontrol grubuna (%86,64 canlı IJ) kıyasla uygulama grubunda (%74,87 canlı IJ) istatistiksel olarak azalma görülmüştür. Son olarak 72 saatlik maruziyet sonucunda 24 ve 48 saatlik maruziyet sonuçlarında olduğu gibi; canlı IJ sayılarında kontrol grubuna (%74,97 canlı IJ) kıyasla uygulama grubunda (%64,39 canlı IJ) istatistiksel olarak azalma görülmüştür ($F = 190,35$; $df=7,32$; $p <0.001$).

Bu bulgular, lambda cyhalothrin aktif maddesine maruz kalma süresi arttıkça IJ'lerdeki canlılık oranının kontrol grubuna kıyasla azaldığını göstermektedir (Şekil 4.1.).



Şekil 4. 1. *In vivo* yöntemle üretilen HBH hibrit ırkının lambda cyhalothrin aktif maddesine farklı maruziyet süreleri (24, 48 ve 72 saat) sonucunda canlı IJ sayılarının kontrol ve uygulama gruplarıyla karşılaştırılması ($F(7, 32) = 190.3564$, $p < 0.0001$)

4.1.2. *In Vivo* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Pendimethalin Aktif Maddesine Karşı Dayanıklılığı

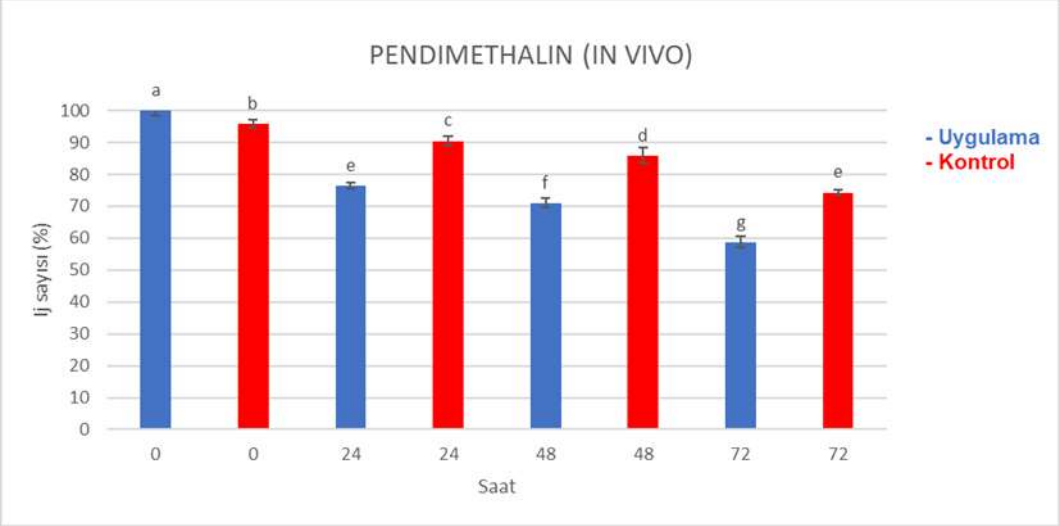
In vivo yöntem kullanılarak elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora*'ya ait infektif juveniller 24, 48 ve 72 saat süresince pendimethalin aktif maddesine maruz bırakılmıştır. 24 saatlik maruziyet sonucunda, canlı infektif juvenil (IJ) sayısında, kontrol grubuna (%90,49 canlı IJ) kıyasla uygulama grubunda (%76,47 canlı IJ) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir.

48 saatlik maruziyet sonucunda, canlı IJ sayısında kontrol grubuna (%85,88 canlı IJ) kıyasla uygulama grubunda (%70,98 canlı IJ) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir.

72 saatlik maruziyet sonucunda ise, 24 ve 48 saatlik maruziyet sonuçlarına benzer şekilde, canlı IJ sayısında kontrol grubuna (%74,31 canlı IJ) kıyasla uygulama grubunda (%58,72 canlı IJ) istatistiksel olarak önemli ölçüde azalma gözlenmiştir.

Bu bulgular, pendimethalin aktif maddesine maruziyetin *H. bacteriophora* HBH infektif juvenilleri üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Maruziyet süresi

arttıkça, canlı IJ sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir (F= 319,11; df= 7, 32; p <0.001) (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2. *In vivo* yöntemle üretilen HBH hibrit ırkının pendimethalin aktif maddesine farklı maruziyet süreleri (24, 48 ve 72 saat) sonucunda canlı IJ sayılarının kontrol ve uygulama gruplarıyla karşılaştırılması (F (7, 32) = 319.1163, p <0.0001)

4.1.3. *In Vivo* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Kükürt Aktif Maddesine Karşı Dayanıklılığı

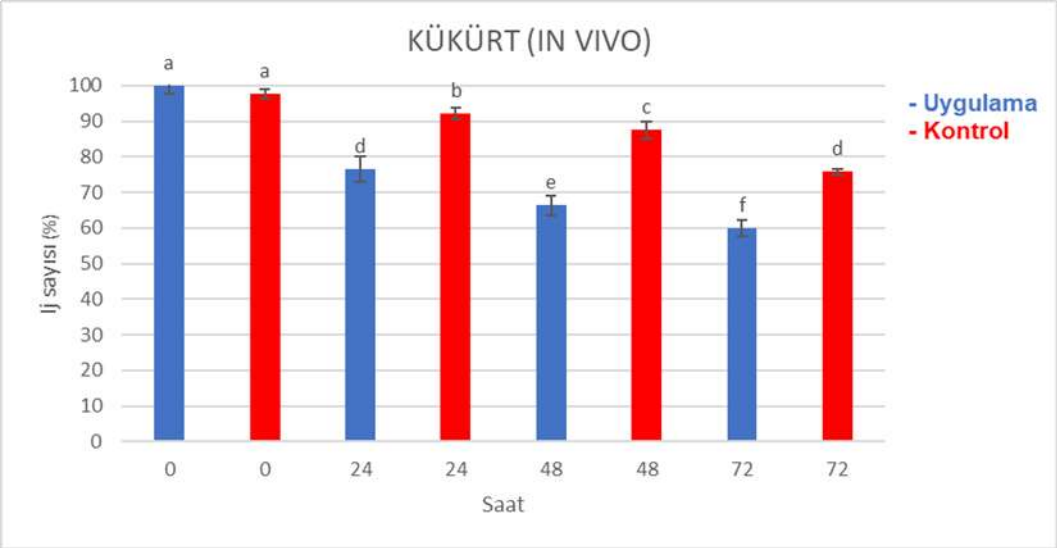
In vivo yöntem kullanılarak elde edilen *H. bacteriophora*'ya ait infektif juveniller, 24, 48 ve 72 saat boyunca kükürt aktif maddesine maruz bırakılmıştır.

24 saatlik maruziyet sonucunda, canlı infektif juvenil (IJ) sayısında, kontrol grubuna (%92,20 canlı IJ) kıyasla uygulama grubunda (%76,42 canlı IJ) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir.

48 saatlik maruziyet sonucunda, canlı IJ sayısında kontrol grubuna (%87,51 canlı IJ) kıyasla uygulama grubunda (%66,43 canlı IJ) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir.

72 saatlik maruziyet sonucunda ise, 24 ve 48 saatlik maruziyet sonuçlarına benzer şekilde, canlı IJ sayısında kontrol grubuna (%75,72 canlı IJ) kıyasla uygulama grubunda (%59,94 canlı IJ) istatistiksel olarak önemli ölçüde azalma gözlenmiştir.

Bu bulgular, kükürt aktif maddesine maruziyetin *H. bacteriophora* HBH infektif juvenilleri üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Maruziyet süresi arttıkça, uygulama grubundaki canlı IJ sayısı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır (F= 163,46; df= 7, 32; p <0.001) (Şekil 4.3.). Kükürt aktif maddesine uzun süreli maruziyetin IJ popülasyonunu olumsuz yönde etkilediği sonucuna varılmaktadır.



Şekil 4. 3. *In vivo* yöntemle üretilen HBH hibrit ırkının kükürt aktif maddesine farklı maruziyet süreleri (24, 48 ve 72 saat) sonucunda canlı IJ sayılarının kontrol ve uygulama gruplarıyla karşılaştırılması (F (7, 32) = 163.4692, p <0.0001)

4.2. *In Vitro* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Toprağa Uygulanan Bazı Pestisitlere Karşı Dayanıklılığı

Yapılan denemeler sonucunda elde edilen canlı infektif juvenil (IJ) verileri dikkate alınarak, *in vitro* üretim yöntemiyle üretilen *H. bacteriophora* HBH hibrit ırkının lambda cyhalothrin, pendimethalin ve kükürt aktif maddelerine karşı canlı kalma yüzdeleri istatistiksel olarak incelenmiştir. Bulgular aşağıdaki maddelerde detaylı olarak açıklanmaktadır.

4.2.1. *In Vitro* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Lambda Cyhalothrin Aktif Maddesine Karşı Dayanıklılığı

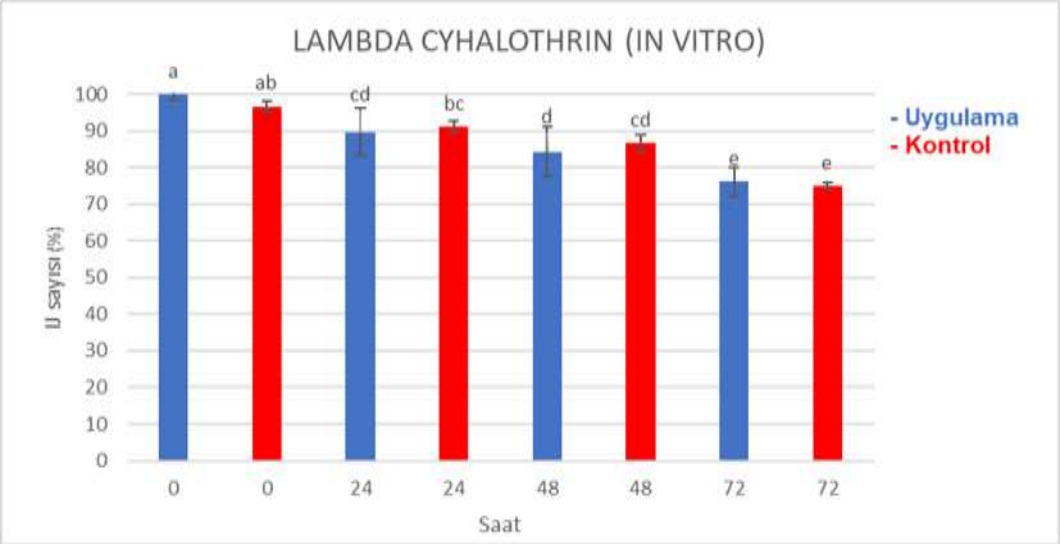
In vitro yöntem ile elde edilen *H. bacteriophora* HBH'ye ait infektif juveniller 24, 48 ve 72 saat boyunca lambda cyhalothrin aktif maddesine maruz bırakılmıştır.

Sonuçlara göre; 24 saatlik maruziyet süresinde, lambda cyhalothrin aktif maddesine maruz kalan IJ'lerin canlı kalma yüzdesi (%89,62) kontrol grubuna kıyasla (%91,20) istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel açıdan aralarında anlamlı bir fark görülmemiştir.

48 saatlik maruziyet süresinde ise, lambda cyhalothrin aktif maddesine maruz kalan infektif juvenillerin canlı birey sayısı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir. Kontrol grubunda %86,56 canlı IJ, uygulama grubunda ise %84,28 canlı IJ tespit edilmiştir.

72 saatlik maruziyet süresinde de 24 ve 48 saatlik maruziyet sonuçlarına benzer şekilde, lambda cyhalothrin aktif maddesine maruz kalan IJ'lerin canlı kalma yüzdesi (%76,08) kontrol grubuna (%74,90) kıyasla istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel açıdan aralarında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Bu bulgular ile, *in vitro* yöntem kullanılarak elde edilen *H. bacteriophora* HBH infektif juvenillerinin lambda cyhalothrin aktif maddesine maruziyet süresine bağlı olarak canlı kalma yetenekleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, lambda cyhalothrin aktif maddesine 24, 48 ve 72 saat maruz kalan infektif juvenillerin canlı kalma yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir ($F= 21,45$; $df= 7, 32$; $p <0.001$) (Şekil 4.4.).



Şekil 4. 4. *In vitro* yöntemle üretilen HBH hibrit ırkının lambda cyhalothrin aktif maddesine farklı maruziyet süreleri (24, 48 ve 72 saat) sonucunda canlı IJ sayılarının kontrol ve uygulama gruplarıyla karşılaştırılması (F= 21,45; df= 7, 32; p <0.001).

4.2.2. *In Vitro* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Pendimethalin Aktif Maddesine Karşı Dayanıklılığı

In vitro yöntem ile üretilen *H. bacteriophora* HBH'ye ait infektif juveniller 24, 48 ve 72 saat boyunca pendimethalin aktif maddesine maruz kalmıştır.

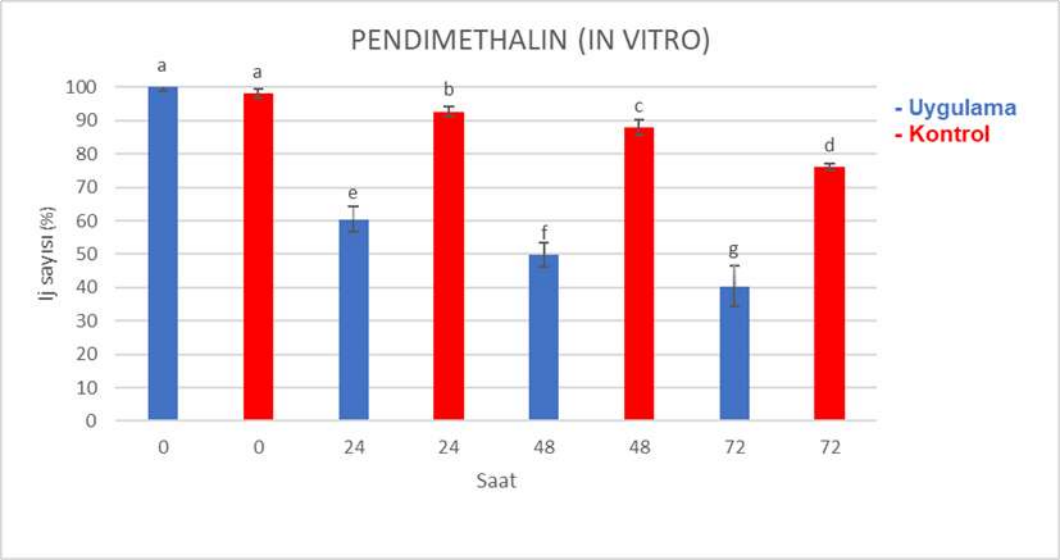
Elde edilen verilere göre, pendimethalin aktif maddesine 24 saat maruz kalan *H. bacteriophora* infektif juvenillerinin canlı kalma yüzdesi (%60,44), kontrol grubuna kıyasla (%92,67) istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda, pendimethalin aktif maddesine maruz bırakılan uygulama grubu ile kontrol grubu arasında canlı IJ sayılarında anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür.

48 saatlik maruziyet süresinde, pendimethalin aktif maddesine maruz kalan infektif juvenillerin canlı IJ sayısı kontrol grubunda %87,95 iken uygulama grubunda %49,79 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, uygulama grubundaki canlı IJ sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir.

72 saatlik maruziyet süresinde ise, pendimethalin aktif maddesine maruz IJ'lerin canlı kalma yüzdesi (%40,36), kontrol grubuna kıyasla (%76,10) istatistiksel olarak

değerlendirilmiştir. Pendimethalin maruziyetiyle kontrol grubu arasındaki canlı birey sayısı istatistiksel olarak büyük ölçüde azalmıştır.

Bu bulgular ile, *in vitro* yöntem kullanılarak elde edilen *H. bacteriophora* infektif juvenillerinin pendimethalin aktif maddesine maruziyet süresine bağlı olarak canlı kalma yetenekleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, pendimethalin maruziyetinin 24, 48 ve 72 saat süresince infektif juvenillerin canlı kalma yüzdesini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığını göstermektedir (F= 222,29; df= 7, 32; p <0.001) (Şekil 4.5.).



Şekil 4. 5. *In vitro* yöntemle üretilen HBH hibrit ırkının pendimethalin aktif maddesine farklı maruziyet süreleri (24, 48 ve 72 saat) sonucunda canlı IJ sayılarının kontrol ve uygulama gruplarıyla karşılaştırılması (F= 222,29; df= 7, 32; p <0.001)

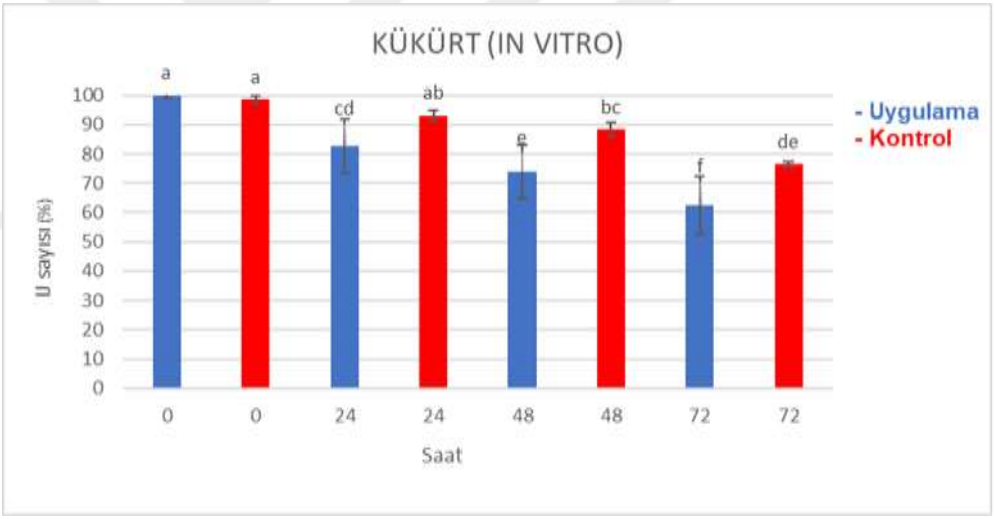
4.2.3. *In Vitro* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının Kükürt Aktif Maddesine Karşı Dayanıklılığı

Elde edilen verilere göre, *in vitro* yöntem kullanılarak üretilen *H. bacteriophora* HBH infektif juvenilleri, 24 saat boyunca kükürt aktif maddesine maruz kaldıklarında kontrol grubuna kıyasla canlı IJ sayılarında istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir. İstatistiksel analiz sonucunda, kükürt uygulanan grupta 24 saatin sonunda canlı IJ sayısı %82,54 iken kontrol grubunda canlı IJ sayısı %93,13 olup kükürt maddesinin IJ bireyleri üzerinde anlamlı bir azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir.

48 saatlik maruziyet süresinde, infektif juvenillerin canlı IJ sayısı kontrol grubunda %88,39 iken kükürt uygulanan grupta %73,96 olarak belirlenmiştir. Bu durumda, uygulama grubundaki canlı IJ sayısında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir.

72 saatlik maruziyet süresinde ise, kükürt aktif maddesine maruz kalan IJ'lerin canlı kalma yüzdesi (%62,56), kontrol grubuna (%76,48) kıyasla istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda, kükürt maruziyetinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında canlı IJ sayısında anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür.

Tüm bu sonuçlar, kükürt maruziyetinin 24, 48 ve 72 saat süresince infektif juvenillerin canlı kalma yüzdesini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığını göstermektedir (F= 19,34; df= 7, 32; p <0.001) (Şekil 4.6.).



Şekil 4. 6. *In vitro* yöntemle üretilen HBH hibrit ırkının kükürt aktif maddesine farklı maruziyet süreleri (24, 48 ve 72 saat) sonucunda canlı IJ sayılarının kontrol ve uygulama gruplarıyla karşılaştırılması (F= 19,34; df= 7, 32; p <0.001)

4.3. *In Vivo* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının *In Vitro* Yöntem ile Üretilen HBH Hibrit Irkına Göre Toprağa Uygulanan Bazı Pestisitlere Karşı Dayanıklılığının Karşılaştırılması

Yapılan denemeler sonucunda elde edilen canlı IJ verileri dikkate alındığında, *in vivo* üretim yolu ile üretilen *H. bacteriophora* HBH hibrit ırkının lambda cyhalothrin, pendimethalin ve kükürt aktif maddelerine karşı canlı kalma yüzdeleri ile *in vitro* üretim

yöntemiyle üretilen *H. bacteriophora* IJ'lerinin canlı kalma yüzdeleri arasında istatistiksel açıdan bulunan farklar incelenmiştir. Bulgular aşağıdaki maddelerde detaylı olarak belirtilmektedir.

4.3.1. *In Vivo* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının *In Vitro* Yöntem ile Üretilen HBH Hibrit Irkına Göre Lambda Cyhalohtrin Aktif Maddesine Karşı Dayanıklılığının Karşılaştırılması

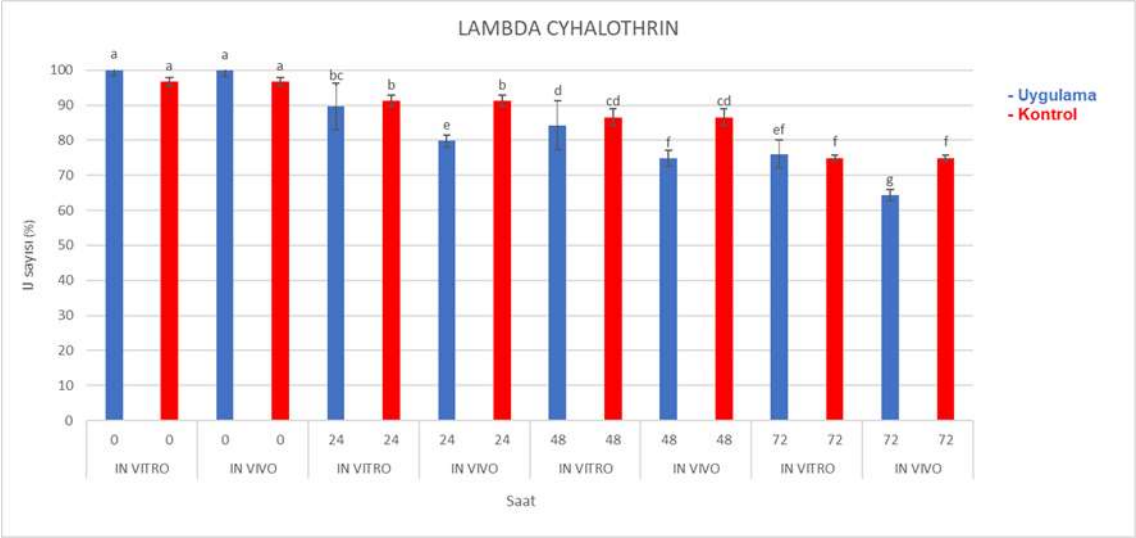
Heterorhabditis bacteriophora IJ'lerinin 24 saat süre ile lambda cyhalothrin aktif maddesine maruz bırakılması sonucu, kontrol grubundaki canlı IJ sayıları %91,20 olarak bulunmuştur.

Uygulama gruplarındaki canlı IJ sayıları, *in vivo* yöntemde %79,74 iken *in vitro* yöntemde bu oranın %89,62 olduğu görülmüştür.

48 saat süre sonunda uygulama gruplarındaki canlı IJ sayıları; *in vivo* yöntemde %74,80, *in vitro* yöntemde ise %84,28 olarak tespit edilmiştir. Bu durumda, *in vivo* yöntemdeki canlı IJ sayısında *in vitro* yönteme göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir.

72 saat maruziyet sonucunda ise; uygulama gruplarındaki canlı IJ sayıları *in vivo* yöntemde %64,32 iken *in vitro* yöntemde %76,08 olmuştur. Bu durumda da istatistiksel olarak *in vitro* yönteme kıyasla *in vivo* yöntemdeki canlı IJ sayılarında anlamlı bir azalma görülmüştür.

Sonuç olarak 24, 48 ve 72. saatin sonunda *in vivo* yöntemde *in vitro* yönteme kıyasla istatistiksel olarak canlı IJ sayılarının daha az olduğu tespit edilmiştir ($F= 49,22$; $df= 15, 64$; $p <0.001$) (Şekil 4.7.).



Şekil 4. 7. Lambda cyhalothrin uygulanan grupta canlı IJ sayılarının *in vivo* yöntem ve *in vitro* yöntem ile kıyaslanması (F= 49,22; df= 15, 64; p <0.001)

4.3.2. *In Vivo* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının *In Vitro* Yöntem ile Üretilen HBH Hibrit Irkına Göre Pendimethalin Aktif Maddesine Karşı Dayanıklılığının Karşılaştırılması

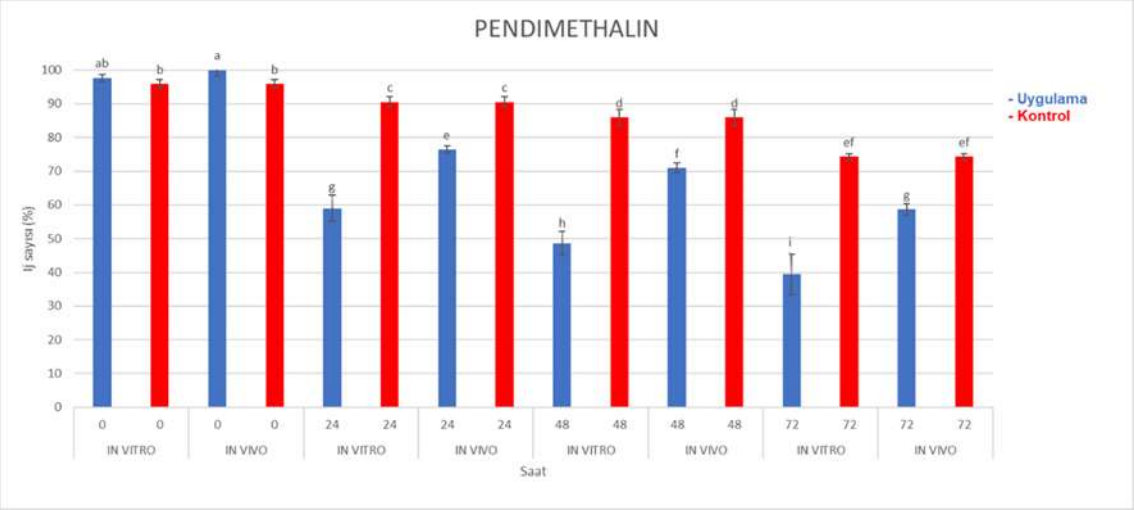
Heterorhabditis bacteriophora IJ'lerinin 24 saat süre ile pendimethalin aktif maddesine maruz bırakılması sonucu, kontrol grubundaki canlı IJ sayıları %90,49 olarak bulunmuştur.

Uygulama gruplarına bakıldığında, *in vivo* yöntemle elde edilen gruplarda canlı IJ sayısı %76,47 iken *in vitro* yöntemle elde edilen gruplarda bu oran %59,01 olarak tespit edilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda, *in vitro* yöntemle elde edilen gruplarda *in vivo* yönteme göre canlı IJ sayısında anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür.

48 saatlik maruziyet süresinde, uygulama gruplarında *in vivo* yöntemle elde edilen gruplarda %70,98, *in vitro* yöntemle elde edilen gruplarda ise %48,62 canlı IJ sayısı saptanmıştır. Bu durumda, *in vitro* yöntemle elde edilen gruplarda *in vivo* yönteme göre canlı IJ sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir.

72 saatlik maruziyet süresinde ise, uygulama gruplarında *in vivo* yöntemle elde edilen gruplarda %58,72, *in vitro* yöntemle elde edilen gruplarda ise %39,41 canlı IJ sayısı bulunmuştur. Bu durumda da *in vitro* yöntemle elde edilen gruplarda *in vivo* yönteme kıyasla canlı IJ sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür.

Sonuç olarak, 24, 48 ve 72 saat sonunda *in vitro* yöntemle elde edilen *H. bacteriophora* infektif juvenillerinde *in vivo* yönteme kıyasla canlı IJ sayısının istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olduğu tespit edilmiştir (F= 237,59; df= 15, 64; p <0.001) (Şekil 4.8.).



Şekil 4. 8. Pendimethalin uygulanan grupta canlı IJ sayılarının *in vivo* yöntem ve *in vitro* yöntem ile kıyaslanması (F= 237,59; df= 15, 64; p <0.001)

4.3.3. *In Vivo* Yöntem ile Üretilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının *In Vitro* Yöntem ile Üretilen HBH Hibrit Irkına Göre Kükürt Aktif Maddesine Karşı Dayanıklılığının Karşılaştırılması

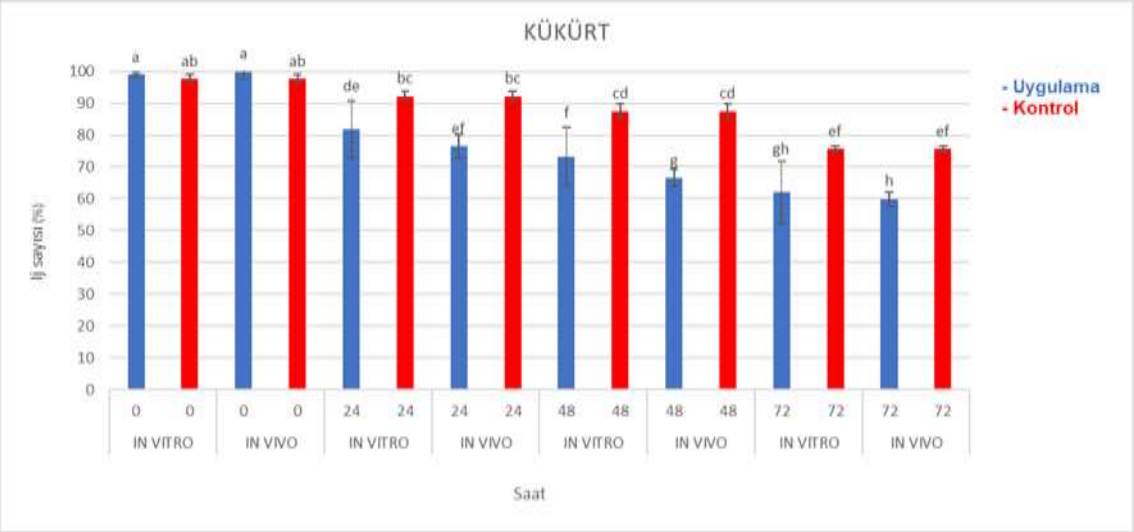
Heterorhabditis bacteriophora HBH infektif juvenillerinin 24 saat boyunca kükürt aktif maddesine maruz bırakılması sonucunda kontrol grubundaki canlı IJ sayısının %92,20 olduğu belirlenmiştir.

Uygulama gruplarına bakıldığında, *in vivo* yöntemle elde edilen gruplarda canlı IJ sayısı %76,41 iken *in vitro* yöntemle elde edilen gruplarda bu oran %81,72 olarak tespit edilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda, bu iki grup arasında canlı IJ sayısı açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

48 saatlik maruziyet süresinde, uygulama gruplarında *in vivo* yöntemle elde edilen gruplarda %66,43, *in vitro* yöntemle elde edilen gruplarda ise %73,22 canlı IJ sayısı saptanmıştır. Bu durumda, *in vivo* yöntemle elde edilen gruplarda *in vitro* yönteme göre canlı IJ sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir.

72 saat maruziyet sonucunda ise; uygulama gruplarındaki canlı IJ sayıları *in vivo* yöntemde %59,94 iken *in vitro* yöntemde %61,93 olmuştur.

Bu durumda da istatistiksel olarak *in vitro* yönteme kıyasla *in vivo* yöntemdeki canlı IJ sayılarında anlamlı bir fark görülmemiştir (F= 36,00; df= 15, 64; p <0.001) (Şekil 4.9.).



Şekil 4. 9. Kükürt uygulanan grupta canlı IJ sayılarının *in vivo* yöntem ve *in vitro* yöntem ile kıyaslanması (F= 36,00; df= 15, 64; p <0.001)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Elde edilen bulgulara ve farklı araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen çalışmalara dayanarak; EPN'lerin canlılık oranları veya ölüm oranları ve etkinliğinin, nematodların türüne, pestisitlerin çeşidine, pestisitlerin dozuna aktif maddenin kimyasal yapısına, nematodun aktif maddeye maruz kalma süresiyle yakından ilişkili olduğu anlaşılmaktadır. Bu bulgular, EPN'lerin tarım ilaçları içinde yaşamsal faaliyetlerini sürdürebileceğini ve etkinliklerini koruyabileceğini göstermektedir. Yapılan kaynak araştırmalarından elde edilen sonuçlar, bu çalışmadan elde edilen bulgularla birbirlerini destekleyici niteliktedir.

Bu bulguların ışığında, EPN'lerin pestisitlerle birlikte kullanımının, zararlı organizmaların mücadelesinde etkili bir yöntem olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, nematod türü, pestisit çeşidi, dozaj ve maruz kalma süresi gibi faktörlerin, EPN'lerin performansı üzerinde belirleyici bir rol oynadığı gözlemlenmiştir. Bu noktada, daha fazla araştırmanın yapılması ve farklı kombinasyonların etkisinin değerlendirilmesi önemlidir.

Nematodların yaşamsal faaliyetlerini pestisitler içinde koruyabilmeleri, entegre zararlı yönetimi kapsamında kimyasal mücadele ile birlikte kullanıldıklarında büyük bir avantaj sağlamaktadır. Bununla birlikte, EPN'lerin ilaçlama tankında pestisitlerle aynı tankta karıştırılıp araziye uygulanmadan önce 24 saatten daha uzun süre bekletilmemesi önerilmektedir. EPN'lerin ilaçlama tankında uzun süre bekletilmesi, olumsuz etkilerin ortaya çıkmasına neden olabilir. Bu durum, EPN'lerin canlılığını ve etkinliğini azaltabilir, dolayısıyla uygulama sürecinde dikkatli olunmalıdır. İlaçlama prosedürleri, EPN'lerin en yüksek etkinliği sağlayabileceği şekilde optimize edilmelidir.

Sonuç olarak, EPN'lerin pestisitlerle birlikte kullanımının tarımsal zararlılarla mücadelede etkili bir strateji olabileceği ve EPN'lerin yaşamsal faaliyetlerini ve etkinliklerini koruyabildiği önemli bir bulgu olarak ortaya çıkmaktadır. Ancak, daha fazla çalışma ve saha deneyimi gereklidir. Bu çalışma, ilaçlama süreçlerinin iyileştirilmesi ve EPN'lerin en iyi şekilde kullanılabilmesi için bir temel oluşturabilir.

KAYNAKLAR

Adams, B. J., & Nguyen, K. B. (2002). Taxonomy and systematics. *Entomopathogenic nematology* (pp. 1–33). CABI Publishing. https://doi.org/10.1079/9780851995670.0001

Adams, B. J., Fodor, A., Koppenhöfer, H. S., Stackebrandt, E., Patricia Stock, S., & Klein, M. G. (2006). Reprint of "Biodiversity and systematics of nematode–bacterium entomopathogens" [Biol. Control 37 (2006) 32–49]. *Biological Control*, 38(1), 32–49. https://doi.org/10.1016/S1049-9644(06)00126-5

Akhurts, R. J. (1980). Morphological and Functional Dimorphism in *Xenorhabdus* spp., Bacteria Symbiotically Associated with the Insect Pathogenic Nematodes Neoaplectana and *Heterorhabditis*. *Microbiology*, 121(2), 303–309. https://doi.org/10.1099/00221287-121-2-303

Alumai, A., & Grewal, P. S. (2004). Tank-mix compatibility of the entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*, with selected chemical pesticides used in turfgrass. *Biocontrol Science and Technology*, 14(7), 725–730. https://doi.org/10.1080/09583150410001724334

Anes, K.M., & Ganguly, S. (2016). Pesticide Compatibility with Entomopathogenic Nematode, Steinernema thermophilum (Nematoda: Rhabditida). Indian Journal of Nematology, 46(1), 20-26.

Atwa, A. A., M. M. Shamseldean & F. A. Yonis 2013. The effect of different pesticides on reproduction of entomopathogenic nematodes. Türkiye Entomoloji Dergisi, 37 (4): 493-502.

Birişik, N., Özdem, A., Karahan, A., Sezgen, M., Ertürk, S., Alkan, M., Çakır, E., Elibüyük, E. A., Koca, E., Aksu, P., Doğan, F., Aydar, A., Sabahoğlu, Y., Yılmaz, A., Kodan, M., Güler, Y., Erdurmuş, G., Yigit, N., Bozkurt, V., … Bayram, Y. (2018). *Teoriden Pratiğe Kimyasal Mücadele*. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 281–288.

Boemare, N. E., Akhurst, R. J., & Mourant, R. G. (1993). DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43(2), 249–255. https://doi.org/10.1099/00207713-43-2-249/CITE/REFWORKS

Chavan, S. N. Somasekhar, N. & Katti, G., (2018). Compatibility of entomopathogenic nematode *Heterorhabditis indica* (Nematoda: Heterorhabditidae) with agrochemicals used in the rice ecosystem. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(4), 527–532.

Cuthbertson, A. G. S., Mathers, J. J., Northing, P., Prickett, A. J., & Walters, K. F. A. (2008). The integrated use of chemical insecticides and the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae), for the control of sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (hemiptera: aleyrodidae). *Insect Science*, 15(5), 447–453. https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00232.x

Çakır, Ş. H. (2022). Entomopatojen nematod *Heterorhabditis bacteriophora* HBH hibrit ırkının *in vivo* ve *in vitro* üretim sonrası toprakta kalıcılık ve depolanma süresi farklılıklarının araştırılması. Yayınlanmamış yüksek lisans tezi. *Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.*

De Bach, P. (1964). Biological control of insect pests and weeds. University of California Press.

Duchaud, E., Rusniok, C., Frangeul, L., Buchrieser, C., Givaudan, A., Taourit, S., Bocs, S., Boursaux-Eude, C., Chandler, M., Charles, J. F., Dassa, E., Derose, R., Derzelle, S.,

Freyssinet, G., Gaudriault, S., Médigue, C., Lanois, A., Powell, K., Siguier, P., … Kunst, F. (2003). The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nature Biotechnology*, 21(11), 1307–1313. https://doi.org/10.1038/nbt886

Düzenli, E. Ö. (2021). Entomopatojen nematod *Heterorhabditis bacteriophora* HBH hibrit ırkının *in vivo* ve *in vitro* üretim sonrası yüksek sıcaklığa ve kuraklığa tolerans farklılıklarının araştırılması. Yayınlanmamış yüksek lisans tezi. *Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.*

Ehlers, R. U. (1996). Current and Future Use of Nematodes in Biocontrol: Practice and Commercial Aspects with Regard to Regulatory Policy Issues. *Biocontrol Science and Technology*, 6(3), 303–316. https://doi.org/10.1080/09583159631299

Ehlers, R.-U., Wyss, U., & Stackebrandt, E. (1988). 16S rRNA Cataloguing and the Phylogenetic Position of the Genus *Xenorhabdus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 10(2), 121–125. https://doi.org/10.1016/S0723-2020(88)80025-0

Endo, B. Y., & Nickle, W. R. (1994). Ultrastructure of the Buccal Cavity Region and Oesophagus of the Insect Parasitic Nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*. *Nematologica*, 40(1–4), 379–398. https://doi.org/10.1163/003525994X00274

Forst, S., Dowds, B., Boemare, N., & Stackebrandt, E. (1997). *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annual Review of Microbiology*, 51, 47–72. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.47

Garcia-del-Pino, F. & A. Morton 2010. Synergistic effect of the herbicides Glyphosate and MCPA on survival of entomopathogenic nematodes. Biocontrol Science and Technology 20(5): 483-488.

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

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

Gutierrez, C., R. Campos-herrera & J. Jimenez 2008. Comparative study of the effect of selected agrochemical products on Steinernema feltiae (Rhabditida:Steinernematidae). Biocontrol Science and Technology, 18(1): 101-108.

Kadıoğlu, İ. (2012). Türkiye Tarımında Bitki Koruma ve Bazı Güncel Yaklaşımların Değerlendirilmesi. *Ziraat Mühendisliği*, 359, 18-25.

Kary, N. E., Sanatipour, Z., Mohammadi, D., & Dillon, A. B. (2021). Combination effects of entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema feltiae*, with Abamectin on developmental stages of *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera, Gelechiidae). *Crop Protection*, 143. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105543

Kaya, H. K. (2002). Natural enemies and other antagonists. *Entomopathogenic nematology* (pp. 189–203). CABI Publishing. https://doi.org/10.1079/9780851995670.0189

Kaya, H. K., & Gaugler, R. (1993). Entomopathogenic Nematodes. *Annual Review of Entomology*, 38(1), 181–206. https://doi.org/10.1146/annurev.en.38.010193.001145

Kaya, H. K., & Patricia Stock, S. (1997). Techniques in insect nematology. In Manual of Techniques, *Insect Pathology* (pp. 281–324). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-012432555-5/50016-6

Kaya, H. K., & S. P. Stock. (1997). Manual of Techniques in Insect Pathology (Lawrence Lacey, Ed.). *Academic Press*.

Koppenhöfer, A. M. (2000). Nematodes. In Field Manual of Techniques. *Invertebrate Pathology* (pp. 283–301). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1547-8_11

Koppenhöfer, A. M. (2007). Nematodes. In Field Manual of Techniques, *Invertebrate Pathology* (pp. 249–264). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5933-9_11

Koppenhöfer, A. M., Cowles, R. S., Cowles, E. A., Fuzy, E. M., & Kaya, H. K. (2003). Effect of neonicotinoid synergists on entomopathogenic nematode fitness. *Experimentalis et Applicata* (Vol. 106).

Kulkarni, N., Paunikar, S., Kumar, V., Mishra, V. K., & Daksh, S. (2013). Toplerance of Entomopathogenic Nematode *Steinernema carpocapsae* to Some Modern Insecticides and Biopesticides. Ann. *Entomol*, 31(1), 129–134. https://www.researchgate.net/publication/259361942

Kwizera, V. (2017). Acetamiprid, ımidacloprid ve spinosad etken maddeli insektisitlerin bazı entomopatojen nematodlar üzerine etkilerinin araştırılması. Yayınlanmamış yüksek lisans tezi. Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Laznik, Ž., & Trdan, S. (2014). The influence of insecticides on the viability of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) under laboratory conditions. *Pest Management Science*, 70(5), 784–789. https://doi.org/10.1002/ps.3614

Lunau, S., Ehlers, R.-U., Stoessel, S., & Schmidt-Peisker, A. J. (1993). Establishment of Monoxenic Inocula for Scaling Up in Vitro Cultures of the Entomopathogenic Nematodes *Steinernema* Spp. and *Heterorhabditis* Spp. *Nematologica*, 39(1–4), 385–399. https://doi.org/10.1163/187529293X00330

Nalıncı, E. (2018) Farklı grup insektisitlerle kontamine olmuş böcek dokularının entomopatojen nematodlar üzerindeki etkilerinin belirlenmesi. Yayınlanmamış yüksek lisans tezi. *Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.*

Özbudak, G. (2021). Entomopatojen nematod Heterorhabditis bacteriophora HBH hibrit ırkının in vivo ve in vitro üretim sonrası üreme potansiyeli ve etkinlik farklılıklarının araştırılması. Yayınlanmamış yüksek lisans tezi. *Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.*

Özdemir, E., İnak, E., Evlice, E., & Laznik, Z. (2020). Compatibility of entomopathogenic nematodes with pesticides registered in vegetable crops under laboratory conditions. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 127(4), 529–535. https://doi.org/10.1007/s41348-020-00337-7

Peshin, R., & Zhang, W. (2014). Integrated Pest Management and Pesticide Use. *Integrated Pest Management* (pp. 1–46). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7796-5_1

Poinar, G. O. (1975). Description and Biology of a New Insect Parasitic Rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* N. Gen., N. Sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae N. Fam.). *Nematologica,* 21(4), 463–470. https://doi.org/10.1163/187529275X00239

Poinar, G.O. (1979). Nematodes for biological control of insects. Boca Raton, FI. USA:
CC. Press, 143.

Poinar, G. O. (2018). Nematodes for Biological Control of Insects. CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781351074957

Popiel, I., Grove, D. L., & Friedman, M. J. (1989). Infective juvenile formation in the insect parasitic nematode *Steinernema feltiae*. *Parasitology,* 99(1), 77–81. https://doi.org/10.1017/S0031182000061047

Sadıç, B. (2017). Entomopatojen patojen nematod heterorhabditis bacteriophora'nın hibrit ırkı ve ebeveyni üzerine formülasyon çalışmaları. Yayınlanmamış yüksek lisans tezi. *Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.*

Sarwar, M. (2015). The Killer Chemicals as Controller of Agriculture Insect Pests: The Conventional Insecticides. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science* (Vol. 1, Issue 3). http://www.aiscience.org/journal/ijcbshttp://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/

Shapiro-Ilan, D., & Gaugler, R. (2002). Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28(3), 137–146. https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000230

Simões, N., & Rosa, J. S. (1996). Pathogenicity and Host Specificity of Entomopathogenic Nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 6(3), 403–412. https://doi.org/10.1080/09583159631370

Smith, H. S. (1919). On Some Phases of Insect Control by the Biological Method1. *Journal of Economic Entomology*, 12(4), 288–292. https://doi.org/10.1093/jee/12.4.288

Strandberg, M., & Scott-Fordsmand, J. J. (2004). Effects of pendimethalin at lower trophic levels-A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57(2), 190–201. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.07.010

Susurluk, İ. A., Dix, I., Stackebrandt, E., Strauch, O., Wyss, U., & Ehlers, R.-U. (2001). Identification and ecological characterisation of three entomopathogenic nematode-bacterium complexes from Turkey. *Nematology*, 3(8), 833–841. https://doi.org/https://doi.org/10.1163/156854101753625326

Susurluk, İ. A., Ünlü, I. O., & Kepenekci, I. (2003). Host finding behavior of two different Turkish isolates of entomopathogenic nematode species, *Heterorhabditis bacteriophora*, Poinar 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae). Turkish Journal of Biology. https://journals.tubitak.gov.tr/biology

Tangüler, H., & Erten, H. (2004). Maya ekstraktı üretimi. 29(6), 421–425.

Tiryaki, O., Canhilal, R., Horuz, S., Seyrani, E. (2010). Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* (Vol. 26, Issue 2).

Ulu, T. C., Sadıç, B., & Susurluk, İ. A. (2016). Effects of some pesticides on the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* TUR-S3. *Turkish Journal of Biological Control*, 7(1), 55–64.

Ulu, T. C. (2018). *Heterorhabditis bacteriophora* HBH hibrit ırkının *ın vıtro* katı kültürde üretiminin optimizasyonu. Yayınlanmamış doktora tezi. *Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.*

Ulu, T. C., & Susurluk, İ. A. (2021). Optimization of in vitro solid culture *of Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae) HBH hybrid strain. *Turkish Journal of Entomology*, 45(4), 441–449. https://doi.org/10.16970/entoted.1004749

Uygun, N., Rifat Ulusoy, M., & Satar, S. (2010). Biyolojik Mücadele. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 2010, 1 (1): 1-14

van den Bosch, R., Messenger, P. S., & Gutierrez, A. P. (1982). An Introduction to Biological Control. *Springer US*. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9162-4

Woodring, J. L., & Kaya, H. K. (1988). Steinernematid and heterorhabditid nematodes: a handbook of biology and techniques. *Arkansas Agricultural Experiment Station*.

Yüksel, E., Canhilal, R., & İmren, M. (2019). Effects of Azadirachtin and Spinosad on the Survival and Virulence of Some Local Entomopathogenic Nematodes Isolates. Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi, 5(2), 280–285. https://doi.org/10.24180/ijaws.591287