

Araştırma/Research

Anadolu Tarım Bilim. Derg./Anadolu J Agr Sci, 33 (2018)
ISSN: 1308-8750 (Print) 1308-8769 (Online)
doi: 10.7161/omuanajas.300755



Batı Karadeniz Bölgesindeki entomopatojen nematodların (Steinernematidae ve Heterorhabditidae) tür çeşitliliği ve dağılımı

Bariş Gülcü

Düzce Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
Sorumlu yazar/corresponding author: barisgulcu@duzce.edu.tr

Geliş/Received 27.03.2017 Kabul/Accepted 19.01.2018

ÖZET

2013-2015 yılları arasında yürütülen arazi çalışmaları ile Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarından entomopatojen nematodların Batı Karadeniz Bölgesinin Düzce, Bolu, Karabük ve Zonguldak illerindeki tür çeşitliliği ve dağılımı araştırılmıştır. Alınan 183 toprak örneğinin % 6'nda entomopatojen nematod izolata rastlanmıştır. Bu izolatların altı tanesinin moleküler analizler sonucunda, Steinernema carpocapsae, S. feltiae, S. weiseri, türlerine ait olduğu tespit edilmiştir. Moleküler olarak tanımlanamayan diğer izolatların morfolojik gözlemlere göre üç tanesinin Steinernema, ikisinin ise Heterorhabditis izolatu olduğu görülmüştür. Nematod bulunan toprak örneklerinin tınlı, killi-tınlı ve kumlu-tınlı yapıda olduğu, toprak pH'sının 4.68 ile 7.41 arasında değiştiği görülmüştür. Steinernema türlerinin hepsi fındık, ceviz, kavak, mısır, domates, fasulye bulunan tarım alanlarından, Heterorhabditler ise orman zemininden izole edilmiştir. Çalışmada yalnızca Düzce ve Bolu illerinden entomopatojen nematod elde edilebilmiştir. Şimdiye kadar İç Anadolu ve Ege bölgelerinden bulunmuş olan S. weiseri'ye ilk defa Karadeniz bölgesinde de rastlanmıştır.

Anahtar Sözcükler:
Böcek patojeni
Nematod
Biyolojik mücadele

Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in the Western Black Sea Region of Turkey

ABSTRACT

Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes in the families Steinernematidae and Heterorhabditidae were investigated throughout the surveys conducted in Düzce, Bolu, Karabuk and Zonguldak provinces in the Western Black Sea Region of Turkey between 2013 and 2015. Of the 183 soil samples collected, 6 % were positive for entomopathogenic nematodes. According to molecular analyses of the six isolates, the species were identified as Steinernema carpocapsae, S. feltiae, S. weiseri. The rest of the isolates which could not be identified with molecular identification methods were characterized as morphologically, and three of them were classified as belonging to Steinernema while two classified as Heterorhabditis. The soils of positive sites were classified as loam, sandy-loam and clay-loam, and their pH ranged from 4.68 to 7.41. The Steinernematids were isolated from agricultural fields including hazelnut, walnut, poplar, corn, tomato, bean, and Heterorhabdits were from forest. Entomopathogenic nematodes were obtained only from Duzce and Bolu provinces. S.weiseri, which has previously been determined only in the Aegean and Central Anatolian regions, was isolated for the first time in the Black Sea Region.

Keywords:
Insect pathogen
Nematode
Biological control

© OMU ANAJAS 2018

1. Giriş

Entomopatojen nematodlar toprakta yaşayan zorunlu böcek patojeni canlılardır. Laboratuvar koşullarında çok geniş bir böcek grubunu enfekte edebilen bu organizmalar, doğada yalnızca toprakta bulunan böcek gruplarını ve yalnızca birkaç omurgasız canlıyı enfekte edebilmektedirler. Günümüzde Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyaları içerisinde

sınıflandırılmaktadırlar (Kaya ve Gaugler, 1993; Adams ve ark., 2006). Ticari bir ürün haline getirilebilen entomopatojen nematodlar biyolojik mücadele ajanı olarak turuncgil bahçeleri, çilek, yaban mersini tarlaları, mantar yetiştirme alanları ve çim sahalardaki hedef tarım zararlılarına karşı başarılı bir şekilde kullanılmaktadırlar (Grewal ve ark., 2005; Campos-Herrera, 2015).

Bu nematodlardan Steinernematidae familyası

içerisindeki türler *Xenorhabdus* spp. Thomas and Poinar, Heterorhabditidae familyasındaki türler ise *Photorhabdus* spp. Boemare bakterileri ile mutualistik ilişkilidir (Boemare ve Akhursts, 2006). Tüm entomopatojen nematod/bakteri birlikteliği benzer bir hayat döngüsüne sahiptir. Nematodların beslenmeyen ve dış ortamda hayatta kalabilen tek evre üçüncü juvenil veya diğer bir adıyla infektif juvenil (IJ) evredir. *Steinernema* cinsine ait IJ'ler mutualistik bakterilerini özofagus'un arka tarafında bulunan bir kese içerisinde taşıırken, *Heterorhabditis* cinsine ait olanlarda bakteriler bağırsak içerisinde dağılmış olarak bulunur. Ancak bağırsağın ilk 1/3'lük kısmında daha yoğunlurlar (Hazir ve ark., 2003a). Kendilerine uygun bir konukçu buldukları zaman böceğin doğal açıklıklarını (ağız, anüs, spirakıl vb.) kullanarak böcek hemosölüne geçen IJ'ler simbiyont bakterilerini hemolenf içerisine salarlar. Burada hızla üremeye başlayan bakteriler ürettikleri güçlü toksinler sayesinde konukçularını 48-72 saat içerisinde septisemi nedeniyle öldürürler (Kaya ve Gaugler, 1993). Entomopatojen nematodlar kadavra içerisinde üreyen simbiyont bakterileri ve onların parçalayarak uygun hale getirdikleri böcek dokuları üzerinden beslenip gelişirler. Steinernematidae familyasındaki türler bir tür (*S. hermaphroditum*) hariç ayrı eşeylidirler. Yani konukçu içerisine giren IJ'lerin en az bir erkek ve bir dişi olması gerekmektedir. Heterorhabditidae familyasında ise ilk jenerasyondaki bireyler hermafroditir. Bunu takip eden jenerasyonlarda ise hem hermafrodit hem de ayrı eşeylere rastlanır (Lewis ve Clarke, 2012). Konukçu içerisinde 1-3 jenerasyon geçiren entomopatojen nematodlar besinin azalması sonucu J3 evresine geçer ve yeni konukçu böcek bulmak için kadavrayı terk ederler (Shapiro-Ilan ve ark., 2016).

Günümüzde entomopatojen nematodlar ile toprak kökenli ve kapalı habitatlarda bulunan zararlı böceklerle karşı etkili bir biyolojik mücadele yapılabilir (Georgis ve Manweiler, 1994; Koppenhöfer, 2000). Ancak EPN türlerinin etkinlikleri konukçu böcek türlerine göre değiştiğinden, en doğru nematod-böcek eşleşmesinin yapılması başarı için mutlaka gereklidir. Yapılan çalışmalar farklı nematod türlerinin yanı sıra aynı türe ait farklı izolatlar arasında dahi etkinlik açısından önemli farklılıklar olabildiğini göstermiştir (Hazir ve ark., 2001; Stuart ve ark., 2015). Bu yüzden Dünya'nın farklı iklimsel özelliklerine sahip bölgelerine adapte olmuş ve o alanlarda bulunan zararlılara karşı biyolojik mücadele potansiyeline sahip türlerin izole edilmesine yönelik yoğun bir ilgi vardır. Bununla beraber pek çok ülkede egzotik türlerin bölgedeki hedef dışı organizmalara yapabileceği olumsuz etkilerden dolayı kaygı duyulmaktadır (Bathon, 1996). Bu nedenle dünyanın pek çok bölgesinde nematodların dağılımlarını ve tür çeşitliliklerini ortaya koyan çalışmalar yapılmaktadır.

Şimdiye kadar yapılan faunistik çalışmalar sonucu Dünya genelinde Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarına ait 90'dan fazla tür tanımlanmıştır (Cimen

ve ark., 2016). Bugüne kadar ülkemizde yapılan çalışmalar sonucunda ise bir tanesi yeni tür olmak üzere toplam 11 entomopatojen nematod türünün yayılış gösterdiği tespit edilmiştir (Susurluk ve ark., 2001; Hazir ve ark., 2003b; Gözel ve ark., 2007; Unlu ve ark., 2007; Yılmaz ve ark., 2009; Gökçe ve ark., 2013; Canhilal ve ark., 2014). Bu türler sırasıyla *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. indica*, *H. megidis*, *Steinernema anatoliense* n. sp. (Hazir ve ark., 2003c), *S. affine*, *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. kraussei*, *S. littorale*, *S. websteri* ve *S. weiseri*'dir. Daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında ülkemiz topraklarındaki entomopatojen nematodların tür çeşitliliği fazla olmasına rağmen, bulunma yüzdelerinin düşük olduğu görülmüştür. Hazir ve ark. (2003b) bu oranı % 2, Ozer ve ark. (1995) % 4.7, Gözel ve ark. (2007) % 5.8, Aydın (2007) Aydın ili ve çevresinde bu oranın % 12, Güneş ve Gözel (2011) Marmara bölgesinde % 6, Arı (2014) İzmir'in Tire ilçesi ve çevresinde % 0.48, Canhilal ve ark. (2014) Adana ve Kahramanmaraş çevresinde % 9, Ertürk ve ark. (2014) Ordu ili ve çevresinde % 5.1 olarak bildirmişlerdir. Bu yönde sürdürülecek yeni çalışmalar ülkemiz koşullarına adapte olmuş yeni tür ve izolatların elde edilmesi ve bunların gelecekte yürütülecek biyolojik mücadele çalışmaları kullanılması açısından önemlidir.

Bu çalışmayla Batı Karadeniz Bölgesindeki Düzce, Bolu, Karabük ve Zonguldak illerinde biyolojik mücadele etmeni entomopatojen nematodların yayılışları ve tür çeşitlilikleri morfometrik ve moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Çalışma alanı ve toprak örneklerinin alınması

Batı Karadeniz Bölgesinin Düzce, Bolu, Karabük ve Zonguldak illerini kapsayan toplam 18289 km²lik kısmında 2013-2015 yılları arasında arazi çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalarda tarım alanları, meralar ve ormanlık bölgelerin rastgele belirlenmiş noktalarından toprak alma aletiyle örnekler alınmıştır. Belirlenen bir alanın yaklaşık 100 m²'lik kısmından, 8-10 farklı noktadan ve toprak yüzeyinden itibaren ilk 20 cm'lik derinlikten yaklaşık 1 kg toprak örneği alınmıştır. Alınan noktayla ilgili gerekli veriler (yer bilgileri, örnekleme tarihi, bölgenin vejetasyonu, GPS koordinatları, toprak sıcaklığı vb.) kaydedilmiştir (Hazir ve ark., 2003b; Hatting ve ark., 2009). Toplanan örnekler plastik buzluklar içerisinde serin bir şekilde muhafaza edilerek laboratuvara ulaştırılmıştır (Kaya ve Stock, 1997; Hatting ve ark., 2009). Her örneklemeden önce ve sonra toprak alma aletinin ucu kontaminasyonu önlemek için % 70'lik etil alkol ile steril edilmiştir (Stock ve ark., 1999).

2.2. Nematodların izolasyonu

Araziden getirilen toprak örnekleri nematod varlığı kontrol edilene kadar 15°C'de muhafaza edilmiştir. Plastik poşet içerisinde iyice karıştırılan her bir örnek 350 ml'lik plastik kavanozlara aktararak numaralandırılmıştır. Plastik kavanozlara aktarılan toprak örneklerinin içerisine 5'er adet son dönem *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) ve *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvası eklenmiştir (Kaya ve Stock, 1997). Oda sıcaklığında (23°C±2) ve karanlık bir ortamda bekletilen kavanozlardaki larvalar her üç günde bir kontrol edilmiştir. Bulunan ölü larvaların yüzeylerindeki toprak partikülleri distile su ile uzaklaştırıldıktan sonra White Trap (White, 1927) sistemine alınmıştır. White Trap'e alınan kadavralardan nematod çıkışı takip edilmiştir. White-trap'ten toplanan nematodların entomopatojen olup olmadıklarını test etmek için 9 cm çaplı petri kapları içerisine 2 adet kurutma kağıdı yerleştirilmiş ve üzerine elde edilen nematodlar 0.5 ml su ile birlikte verilmiştir. Daha sonra ortama 5 adet son dönem *G. mellonella* larvası ilave edilerek petriker oda sıcaklığında inkübasyona kaldırılmıştır (Koch's

postulation). Entomopatojen nematod olduğu anlaşılan izolatlar morfolojik ve moleküler tanımlamaları yapılabildiği kadar tetrapak kutular içerisinde, 10-15°C'de muhafaza edilmiştir (Gulcu ve Hazir, 2012).

2.2.1. Morfolojik tanımlama

Morfometrik tanımlama çalışmalarından önce ölçüm yapılacak bireyler 60°C'lik Ringer's solusyonu ile öldürülmüştür. Daha sonra ölü nematodlar triethanolamin-formalin (TAF) fiksatifinde muhafaza edilmiş ve ardından saf gliserin içerisine gömülerek preparat haline getirilmişlerdir (Kaya ve Stock, 1997). Morfolojik gözlemlerde hem bu hazırlanmış olan bireyler hem de canlı bireyler kullanılmıştır. Morfometrik ölçümler için bilgisayar bağlantılı Olympus CX31 model mikroskop ve Olympus DP26 model kamera kullanılmıştır. Boy ölçümleri Olympus cellSens standart 1.11 programı ile yapılmıştır. Ölçümler için *G. mellonella* larvasından çıkış yapmış 20'şer adet infektif juvenil ve ilk jenerasyona ait erkek bireyler kullanılmıştır (Kaya ve Stock, 1997). Tüm izolatların morfolojik ölçümleri yapılmıştır.

Çizelge 1. Çalışma sonunda elde edilen entomopatojen nematod izolatları.

İzolat Kodu	Nematod Türü	Bölge	Alanın toprak sıcaklığı (°C) ve Yüksekliği (metre)	Toprak tipi	PH	Alanın vejetasyon tipi	Örnekleme tarihi
Duz-14	<i>S. carpocapsae</i>	Düzce/Gölyaka	19.4°C, 215m	Tınlı	6.30	Fındık bahçesi	16/05/2013
Duz-6-2015	<i>S. carpocapsae</i>	Düzce/Yukarı Yahyalar Köyü	19.6°C, 120 m	Killi-tınlı	6.15	Fındık bahçesi	10/05/2015
Goncek-1	<i>S. feltiae</i>	Bolu/Mudurnu/Göncek köyü	20°C, 1126 m	Kumlu-tınlı	7.35	Fasulye tarlası	23/06/2013
Nal-1A	<i>S. feltiae</i>	Bolu/Mudurnu-Ankara/Nallıhan arası	28.8°C, 1035m	Kumlu-tınlı	7.41	Mısır tarlası	23/06/2013
Seben-1	<i>S. feltiae</i>	Bolu/Seben	26°C, 724m	Kumlu-tınlı	7.32	Domates, Mısır, Kavak	24/06/2013
Duz-27-2015	<i>S. weiseri</i>	Düzce/Yığılca Yedigöller yolu	19.6°C, 798m	Kumlu-tınlı	6.00	Fındık, Ceviz karışık	11/05/2015
Cuma-12	<i>Steinernema</i> sp.	Düzce/Akçakoca, Karatavuk Köyü	26.7°C, 451m	Killi-tınlı	4.44	Fındık bahçesi	17/05/2013
Akçakoca-3A	<i>Steinernema</i> sp.	Düzce/Akçakoca, Beyören Köyü	15°C, 200m	Killi-tınlı	4.55	Fındık bahçesi	20/04/2013
Duz-34-2015	<i>Steinernema</i> sp.	Düzce/Gölyaka-Yanık Köyü	16.7°C, 1026m	Tınlı	6.32	Boş tarla	11/05/2015
Kampüs-3	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Düzce Üniversitesi Kampüsü	19.6°C, 288m	Killi-tınlı	4.68	Orman (Yaprak döken türler)	01/05/2015
Kampüs-7	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Düzce Üniversitesi Kampüsü	19.6°C, 290m	Killi-tınlı	4.64	Orman (Yaprak döken türler)	01/05/2015

Morfometrik ölçümlerde kullanılan ortak kriterler şunlardır;

Toplam vücut uzunluğu (TU), maksimum vücut genişliği (MG), baştan boşaltım deliğine olan uzaklık (EP), baştan sinir halkası sonuna olan uzaklık (NR), baştan özofagus kaidesine olan uzaklık (ES), kuyruk uzunluğu (TL), anüs genişliği (AG), Bunlara ilaveten erkek nematodlar için spikül uzunluğu (SU), gubernaculum uzunluğu (Gub.U) (Hazir ve ark., 2003b; Cimen ve ark., 2016).

2.2.2. Moleküler tanımlama

Morfolojik ölçümlerin yanında elde edilen tüm örneklerin moleküler analizleri de yapılmıştır. Nükleik asit amplifikasyonu için DNA, infektif juvenil evre nematodlardan izolasyon kiti kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri PCR (Polymerase

Chain Reaction) işlemi yapılarına kadar -20°C'de muhafaza edilmişlerdir.

Elde edilen nematod izolatlarının teşhisinde, Steinernematidler için rDNA gen bölgesinin büyük alt ünitesindeki (LSU) gen bölgesi, Heterorhabditler için ITS (internal transcribed spacer) gen bölgesi kullanılmıştır (Stock ve ark. 2001). Elde edilen PCR ürünleri, sekans analizine gönderilmeden önce DNA pürifikasyon kiti kullanılarak temizlenmiş ve sekans analizi için BM Laboratuvar Sistemleri firmasına gönderilmiştir. Sekans sonuçları Bioedit (Hall, 1999) ve MEGA 6.0 (Tamura ve ark., 2013) yazılımları kullanılarak düzeltilmiştir ve sonuçlar National Center for Biotechnology Information (NCBI)'ın gen bankasına girilerek analiz edilmiştir. Moleküler analizleri yapılabilen izolat ve gen bankasında eşleşme gösterdiği türler Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. Moleküler yöntemle teşhisi yapılan izolatların Gen Bankasında kayıtlı diğer türlerle benzerlik oranları

İzolat	Benzerlik Gösteren Nematod Türleri	Gen Bankası Kodu	Eşleşen Baz Sayısı	Benzerlik Oranı (%)
Duz-6-2015	<i>S. carpocapsae</i> (izolat Az-20)	GQ421607.1	977/979	%99
	<i>S. carpocapsae</i> (izolat Bcn14)	GQ421606.1	976/979	%99
	<i>S. carpocapsae</i> (izolat Breton)	GQ421604.1	974/979	%99
Duz-14	<i>S. carpocapsae</i> (izolat Az-20)	GQ421607.1	926/940	%99
	<i>S. carpocapsae</i> (izolat Bcn14)	GQ421606.1	925/940	%98
	<i>S. carpocapsae</i> (izolat Breton)	GQ421604.1	923/940	%98
Goncek-1	<i>S. feltiae</i>	AF121050.2	974/974	%100
	<i>S. feltiae</i> (izolat T92)	AY230185.1	973/974	%99
	<i>S. feltiae</i> (izolat Pumping Station)	AY170336.1	974/975	%99
Seben-1	<i>S. feltiae</i>	AF121050.2	971/973	%99
	<i>S. feltiae</i> (izolat T92)	AY230185.1	970/973	%99
	<i>S. feltiae</i> (izolat Pumping Station)	AY170336.1	971/974	%99
Nal-1A	<i>S. feltiae</i>	AF121050.2	975/975	%100
	<i>S. feltiae</i> (izolat T92)	AY230185.1	974/975	%99
	<i>S. feltiae</i> (izolat Pumping Station)	AY170336.1	975/976	%99
Duz-27-2015	<i>S. weiseri</i> (5-APR-2003)	AY230167.1	983/983	%100
	<i>S. litorale</i>	AB243441.1	951/985	%97
	<i>Steinernema</i> sp. KenC25	GU395624.1	934/964	%97

3. Bulgular ve Tartışma

Çalışma sonunda alınan 183 toprak örneğinden 11 tanesinde (% 6) entomopatojen nematoda rastlanmıştır. İzolatların dokuz tanesinin *Steinernema*, iki tanesinin ise *Heterorhabditis* cinsine ait olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan moleküler analizler sonucu *Steinernema* izolatları içerisinde dört farklı tür bulunduğu bunlardan iki izolatın *S. carpocapsae*, üç izolatın *S. feltiae*, bir tanesinin de *S. weiseri* türüne ait olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 1 ve Çizelge 2). Beş izolatın ise moleküler olarak teşhisleri yapılamamış ve ilerleyen süreçte

izolatlara ait nematod kültürleri kaybedilmiştir. Bununla beraber enfekte ettikleri böcek larvalarında meydana getirdiği renk değişiminden dolayı 3 tanesinin *Steinernema*, diğer ikisinin *Heterorhabditis* olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu izolatların morfolometrik

ölçüleri incelendiğinde *Steinernema* izolatlarının *S. affine* ile *Heterorhabditis* izolatlarının ise *H. bacteriophora* türleriyle uyumluluk gösterdiği görülmüştür (Çizelge 3 ve Çizelge 4).

Çizelge 3. *Steinernema* sp. Cuma-12 izolatının infektif juvenil (A) ve ilk jenerasyon erkek bireylerin (B) morfolometrik ölçüm sonuçları (Uzunluk birimi mikrometre (μm))

(A) İnfektif Juveniller (N=20)	TU	MG	ES	EP	NR	TL	AG		
Min	607.4	28.1	116	52.5	87.9	65.2	16.7		
Maks	879.3	33.9	132.9	70.1	103.9	74.8	19.8		
Ort	695	31.3	127.3	63.2	94.6	66.9	17		

(B) İlk Jenerasyon erkekler (N=20)	TU	MG	ES	EP	NR	TL	AG	SU	Gub.U
Min	1720.4	95.3	135.9	83.1	88.9	46.3	54.1	67.4	38.3
Maks	1905.4	143.5	175.2	114.2	116.9	56.2	73.3	86.8	55.9
Ort	1802.1	118.6	152.7	95.1	107	51	60.8	70.2	45.8

Tu= Toplam vücut uzunluğu, MG= Maksimum vücut genişliği, ES= Özofagus uzunluğu, EP= Eksküratör ile anterior uç arası mesafe uzunluğu, NR= Sinir halkasıyla anterior uç arası mesafe, TL= Kuyruk uzunluğu; AG= Anal vücut genişliği, SU= Spikül uzunluğu, GU= Gubernakulum uzunluğu

Çizelge 4. *Heterorhabditis* sp. Kampüs-3 izolatının infektif juvenil (A) ve ilk jenerasyon erkek bireylerin (B) morfolometrik ölçüm sonuçları (Uzunluk birimi mikrometre (μm))

(A) İnfektif Juvenil (n=20)	TU	MG	ES	EP	NR	TL	AG		
Min	521.2	22.3	114.7	124.1	104.4	61.4	10.0		
Maks	618.9	31.2	130.1	140.9	122.9	83.1	14.2		
Ort	577.7	24.8	124.2	132.4	113.2	68.6	11.7		

(B) İlk Jenerasyon erkek (n=20)	TU	MG	ES	EP	NR	TL	AG	SU	Gub.U
Min	797.3	39.6	104.7	113.8	91.2	22.6	17.1	40.6	17.6
Maks	1024.0	53.9	111.2	147.5	103.3	88.2	21.7	50.8	26.7
Ort	896.0	46.0	108.1	129.5	95.9	30.9	18.4	44.9	22.4

Tu= Toplam vücut uzunluğu, MG= Maksimum vücut genişliği, ES= Özofagus uzunluğu, EP= Eksküratör ile anterior uç arası mesafe uzunluğu, NR= Sinir halkasıyla anterior uç arası mesafe, TL= Kuyruk uzunluğu; AG= Anal vücut genişliği, SU= Spikül uzunluğu, GU= Gubernakulum uzunluğu

Elde edilen entomopatojen nematodların hepsi Düzce ve Bolu il sınırları içerisindeki topraklardan izole edilmiştir. Nematod bulunan noktaların büyük bir kısmı tarım alanı (% 81.8, n=9), geri kalanı ise ormandır (% 18.1, n=2). Tarım alanlarında ağırlıklı olarak fındık (% 55.5, n=5), geri kalanında ceviz, kavak, mısır, domates, fasulye gibi tarım ürünleri (% 44.4, n=4) bulunmaktadır. *Steinernema* türleri yalnızca tarım alanlarından elde edilmiştir. *H. bacteriophora* izolatları ise orman zemininden izole edilmiştir. Toprak örneklerinin

alındığı dönemdeki toprak sıcaklıkları 15-28°C arasında ölçülmüştür. Nematod izole edilen alanların deniz seviyesinden yükseklikleri incelendiğinde 120 ile 1126 metreler arasında değişiklik göstermektedir (Çizelge 1). Entomopatojen nematodların topraktaki varlıklarını belirleyen en önemli belirteçlerden biri toprak tipidir. Genellikle nematod izole edilen toprakların yüksek kum, düşük kil içerdikleri bilinmektedir. Kendi çalışmamızdaki nematod bulunan toprak örneklerinin

tnlı, killi-tnlı ve kumlu-tnlı yapıda oldukları görülmüştür (Çizelge 1).

Ülkemizde daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında en yaygın türler *S. feltiae*, *S. carpocapsae* ve *H. bacteriophora*'dır. Bu üç tür Dünya'da da çok geniş bir yayılım göstermektedir (Hominick, 2002). Yayılış alanları incelendiğinde *S. feltiae*'nin tropik iklimlerden de izole edilmesine rağmen Avrupa'nın ılıman ve soğuk bölgelerinde de bolca bulunduğu görülmektedir. Bu nedenle *S. feltiae*'nin daha çok soğuğa adapte bir tür olduğu bildirilmiştir (Hazır ve ark., 2001; Ali ve Wharton, 2013). Karadeniz kuşağının iklim özellikleri de bu türün bölgedeki varlığını desteklemektedir. Moleküler tanımlaması yapılamayan 5 izolatin morfolometrik ölçümlere göre *H. bacteriophora* ve *S. affine* türleri olduğu düşünülmektedir. *H. bacteriophora* türünün yayılışına bakıldığında ise Dünya'da tropiklerden (Constant ve ark., 1998) ılıman kuşağa (Hominick ve ark., 1996) kadar pek çok farklı habitatdan izole edilmiştir. Ancak *H. bacteriophora*'nın en iyi gelişim gösterdiği sıcaklıklara bakıldığında tropik ve subtropik iklime adapte olduğu görülmüştür (Grewal ve ark., 1994). *S. affine* türü Avrupa kıtasına özgü bir tür olarak bilinmesine rağmen ülkemizin benzer iklim özellikleri gösteren Kuzey Anadolu kısmından daha önce bulunmuştu (Hazır ve ark., 2003a,b; Güneş ve Gözel, 2011; Gürel ve ark., 2015). Dolayısıyla bu çalışmadaki veriler Avrupa ile benzer iklim ve habitat özellikleri gösteren Karadeniz kuşağından yeni *S. affine* izolatlarının elde edilebileceğini akla getirmektedir.

Çalışmamızda bulduğumuz türlerden *S. weiseri* ilk defa Avrupa kıtasında Çek Cumhuriyetindeki elma bahçesinden bulunmuştur (Mracek ve ark., 2003). Ülkemizdeki varlığı ise Unlu ve ark. (2007) tarafından Ankara, Beytepe'den bildirilmiştir. Daha sonra aynı türün farklı bir izolatu Aydın'dan elde etmiştir (Aydın, 2007). *S. weiseri* türü yaptığımız çalışma sonucunda ilk defa bu kadar kuzeyden elde edilmiştir. Aynı zamanda *S. weiseri*'nin önceki izolatları ülkemizde şimdiye kadar çam ormanından izole edilmişken, Düzce izolatu fındık ve ceviz bulunan farklı bir vejetasyondan elde edilmiştir. Çalışmada bulduğumuz *S. weiseri* izolatının habitat özellikleri Avrupa izolatu ile uyum göstermektedir.

Hazır ve ark. (2003b) Türkiye'nin tamamını kapsayan araştırmaları sonucunda 1167 toprak örneğinde 24 entomopatojen nematod izolatu elde etmişlerdir. Buna göre Türkiye topraklarında nematod bulunma oranını % 2 olarak bildirmişlerdir. Sonraki yıllarda ülkemizde bölgesel düzeyde yapılan faunistik araştırmalarda Aydın (2007) Aydın ilinden aldıkları 82 toprak örneğinin % 12'sinde entomopatojen nematoda rastlamıştır. Marmara Bölgesini kapsayan bir çalışmada ise Güneş ve Gözel (2011) 362 toprak örneğinin 22'sinden entomopatojen nematod izole etmişler ve bölgede nematod bulunma oranını % 6 olarak bildirmişlerdir. Ertürk ve ark. (2014), Ordu ilinde yürüttükleri çalışmada aldıkları örneklerin % 5'inde entomopatojen nematoda rastlamışlardır.

Bu çalışma ülkemizde Batı Karadeniz Bölgesindeki entomopatojen nematod faunasının varlığına yönelik yürütülmüş ilk kapsamlı araştırma niteliğindedir. Çalışma sonunda yalnızca Düzce ve Bolu illerinden entomopatojen nematod elde edilebilmiştir. Düzce'den yukarıda belirtilen tüm türlere ait izolatlar bulunmasına rağmen, Bolu ilinden yalnızca *S. feltiae* türünün üç izolatu elde edilebilmiştir. Projenin araştırma sahası içerisinde bulunan Zonguldak ve Karabük illerinde ise yalnızca entomopatojen fungus izolatlarına rastlanmıştır. Ancak bu il sınırları içerisindeki topraklardan entomopatojen nematod bulunamamasının arazi çalışmaları sırasında yaşanan yoğun sağanak yağmurlar nedeniyle uygun toprak örneklerinin alınamamasında kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durumla ilgili olarak Kung ve ark. (1990) organik maddece zengin ve suyla doymuş topraklardaki düşük oksijen oranının nematod varlığını sınırlayıcı bir faktör olabileceği belirtmiştir.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalara bakıldığında ülkemizin Karadeniz kuşağında entomopatojen nematod tür çeşitliliği oldukça yüksektir. Bölgenin Avrupa ile benzer iklim ve vejetasyona sahip olması nematod tür çeşitliliğinde de benzer sonuçlar ortaya koymaktadır. Bölge genelinde şimdiye kadar yapılan çalışmalarda *H. bacteriophora*, *H. megidis*, *S. affine*, *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. kraussei*, *Steinernema websteri* olmak üzere yedi farklı entomopatojen nematodun türünün varlığı tespit edilmiştir (Susurluk ve ark., 2001; Hazır ve ark., 2003b; Yılmaz ve ark., 2009; Gökçe ve ark., 2013; Ertürk ve ark., 2014).

Batı Karadeniz Bölgesiyle ilgili olarak yalnızca Düzce ilini kapsayan bir çalışmada Gürel ve ark. (2015) morfolojik analizlere göre bölgede *S. affine*, *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, ve *H. bacteriophora* türlerinin varlığını bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise bu türlere ilaveten, *S. weiseri*'nin varlığı hem morfolojik hem de moleküler tanımlamalar ile ortaya konmuştur. Gelecekteki çalışmalarda bölgenin iklim ve toprak yapısına uyum sağlamış olan bu izolatların bölgenin tarım zararlılarına karşı biyolojik mücadele çalışmalarında kullanılması önem arz etmektedir.

Teşekkür

Çalışma sırasında nematodların moleküler analizlerindeki yardımlarından dolayı Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünden doktora öğrencisi Harun ÇİMEN'e, laboratuardaki böcek kolonilerinin bakımı ve arazi çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Düzce Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğrencileri Nejat ADLIĞ, Senem YARAMAZ ve Recep ŞÜKÜR'e teşekkür ederim. Bu çalışma, Düzce Üniversitesi BAP-2012.05.01.128 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Adams, B. J., Fodor, A., Koppenhöfer, H.S., Stackebrandt, E., Stock, S.P., Klein, M.G., 2006. Reprint of "Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens" [Biol. Control 37 (2006) 32-49]. Biological Control, 38: 4-21.
- Ali, F., Wharton, D.A., 2013. Cold tolerance abilities of two entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. Cryobiology, 66: 24-29.
- Arı, A., 2014. Entomopatojen Nematodların (Steinernematidae ve Heterorhabditidae) Tire İlçesi (İzmir) Topraklarındaki Tür Çeşitliliği Ve Dağılımlarının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Aydın, M.S., 2007. Entomopatojenik Nematodların (Steinernematidae ve Heterorhabditidae) Aydın İli ve Çevresindeki Topraklarda Tür Çeşitliliği ve Dağılımlarının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Bathon, H., 1996. Impact of entomopathogenic nematodes on non-target hosts. Biocontrol Science Technology., 6: 421-434.
- Boemare, N., Akhurst, R., 2006. The Genera *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass (Editörler: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H. and Stackebrandt, E.) Springer NY., pp: 451-494.
- Campos Herrera R., 2015. Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests: Ecology and Applied Technologies for Sustainable Plant and Crop Protection. Springer, New York.
- Canhilal, R., Imren, M., Toktay, H., Bozbuğa, R., Çetintaş, R., Kütük, H., Özdemir, Y.E., Doğan, S., 2014. Adana ve Kahramanmaraş illerinde entomopatojen nematodların belirlenmesi. V. Bitki Koruma Kongresi, 350, 3-5 Şubat, Antalya.
- Cimen, H., Puza, V., Nermut, J., Hatting, J., Ramakuwela, T., Hazır S., 2016. *Steinernema biddulphi* n. sp., a New Entomopathogenic Nematode (Nematoda: Steinernematidae) from South Africa. Journal of Nematology, 48(3): 148-158.
- Cimen, H., Puza, V., Nermut, J., Hatting, J., Ramakuwela, T., Faktorova, L., Hazır, S., 2016, *Steinernema beitlechemi* n. sp., a new entomopathogenic nematode (Nematoda: Steinernematidae) from South Africa. Nematology, 18: 439-453.
- Constant, P., Marchay, L., Fischer-Le Saux, M., Briand-Panoma, S., Mauleon, H., 1998. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Guadeloupe Islands. Fundamental and Applied Nematology, 21: 667-672.
- Ertürk, Ö., Ustaoglu, F., Akyazı, F., 2014. Occurrence and Distribution of Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Ordu Province, Turkey. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 1(4): 469-480.
- Georgis, R., Manweiler, S.A., 1994. Entomopathogenic nematodes: a developing biological control technology. Agricultural Zoology Reviews, 6: 63-94.
- Gökçe, C., Yılmaz, H., Erbas, Z., Demirbağ, Z., Demir, İ., 2013. First Record of *Steinernema kraussei* (Rhabditida: Steinernematidae) from Turkey and Its Virulence against *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Nematology, 45(4):253-259.
- Gökçe, C., Erbaş, Z., Yılmaz, H., Demirbağ, Z., Demir, İ., 2015. A new entomopathogenic nematode species from Turkey, *Steinernema websteri* (Rhabditida: Steinernematidae), and its virulence. Turkish Journal of Biology, 39: 167-174.
- Gözel, U., Güneş, Ç., Tunaz, H., 2007. Türkiye entomopatojen nematode faunasının belirlenmesi. II. Bitki Koruma Kongresi, 184, 27-29 Ağustos, Isparta.
- Grewal, P. S., Koppenhöfer, A. M. and Choo, H. Y., 2005. Lawn, Turfgrass and Pasture Applications. In: Nematodes as Biocontrol Agents (Editörler: Grewal, P.S., Ehlers, R-U., Shapiro-Ian, D.I.). CABI International Wallingford, UK., pp: 115-146.
- Grewal, P.S., Selvan, S., Gaugler, R., 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment, and reproduction. Journal of Thermal Biology, 19: 245-253.
- Gulcu, B., Hazır, S., 2012. An alternative storage method for Entomopathogenic nematodes. Turk. J. Zool., 36: 562-565.
- Güneş, Ç., Gözel, U., 2011. Marmara Bölgesi'ndeki entomopatojen nematod faunasının belirlenmesi. Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi, 2 (2): 93-102.
- Gürel, S., Gözel, Ç., Gözel U., 2015. Efficacy of entomopathogenic nematodes against the hazelnut weevil *Curculio nucum* L. (Coleoptera: Curculionidae) in laboratory. 5th Entomopathogens and Microbial Control Congress, 9-11 September, Ankara.
- Hall, T.A., 1999. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT". Nucleic Acids Symposium Series., 41: 95-98.
- Hatting, J., Stock, S.P., Hazır, S., 2009. Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae) in South Africa. Journal of Invertebrate Pathology, 102: 120-128.
- Hazır, S., Stock, S.P., Kaya, H.K., Koppenhofer, A.M., Keskin, N., 2001. Developmental temperature effects on five geographic isolates of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae). Journal of Invertebrate Pathology, 77: 243-250.
- Hazır, S., Kaya, H. K., Stock, S. P., Keskin, N. 2003a. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. Turkish Journal of Biology, 27: 181-202.
- Hazır, S., Keskin, N., Stock, S.P., Kaya K.H., Özcan S., 2003b. Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Turkey. Biodiversity and Conservation, 12: 375-386.
- Hazır, S., Stock, S.P., Keskin, N., 2003c. A new entomopathogenic nematode, *Steinernema anatoliense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), from Turkey. Systematic Parasitology, 55: 211-220.
- Hominick, W.M., 2002. Biogeography. Entomopathogenic Nematology (Editör: Gaugler, R.) CABI Publishing, Wallingford, UK., pp:115-143.
- Hominick, W.M., Reid, A.P., Bohan, D.A., Briscoe, B.R., 1996. Entomopathogenic nematodes-biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. Biocontrol Science and Technology, 6: 317-331.

- Kaya, H.K., Stock, S.P., 1997. Techniques in insect (Editor: Lacey L.). Academic Press, San Diego, CA. Pp:281-324.
- Kaya, H.K., Gaugler, R., 1993. Entomopathogenic nematodes. Annual Review of Entomology, 38: 181-206.
- Koppenhöfer, A.M., 2000. Nematodes. Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Editors: Lacey, L.A., Kaya, H.K.) Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp:283-301.
- Kung, S.P., Gaugler, R., Kaya, H.K., 1990. Soil type and entomopathogenic nematode persistence. Journal of Invertebrate Pathology, 55: 401-406.
- Lewis, E.E., Clarke, D.J., 2012. Nematode parasites and entomopathogens. Insect Pathology Second Edition. (Editors: Vega, F., Kaya, H.K.) Academic Press, USA, pp:395-424.
- Mracek, Z., Sturhan, D., Reid, A., 2003. *Steinernema weiseri* sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Europe. Systematic Parasitology, 56:37-47.
- Ozer, N., Keskin, N., Kirbas, Z., 1995. Occurrence of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae: Heterorhabditidae) in Turkey. Nematologica 41: 639-640.
- Stock, S.P., Pryor, B.M., Kaya, H.K., 1999. Distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in natural habitats in California, USA. Biodiversity and Conservation, 8: 535-549.
- nematology. Manual of Techniques in Insect Pathology
- Stuart, R.J., Barbercheck, M.E., Grewal, P.S., 2015. Entomopathogenic Nematodes in the Soil Environment: Distributions, Interactions and the Influence of Biotic and Abiotic Factors. In Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests: Ecology and Applied Technologies for Sustainable Plant and Crop Protection, (Editor: Campos-Herrera R.) Springer International Publishing: Cham, pp:97-137.
- Susurluk, A., Dix, I., Stackebrandt, E., Strauch, W. S., Ehlers, R.U. 2001. Identification and ecological characterisation of three entomopathogenic nematodebacterium complexes from Turkey. Nematology, 3 (8): 833-841.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. Mega 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 . Molecular Biology and Evolution., 30: 2725 – 2729.
- Unlu, I., O., Ehlers, R.U., Susurluk, A., 2007. Additional data and first record of entomopathogenic nematode *Steinernema weiseri* from Turkey. Nematology, 9: 739-741.
- White, G. F., 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from culture. Science, 66: 302-303.
- Yılmaz, H., Waeyenberge, L. , Demir, İ., Moens, M., Demirbağ, Z., 2009. A new entomopathogenic nematode species for Turkey, *Heterorhabditis megidis* Poinar, Jackson & Klein 1987 (Rhabditida: Heterorhabditidae). Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 33: 385-391.