

**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**2018-DR-003**

**ENTOMOPATOJEN NEMATODLAR VE**  
**YAĞMACI UZAKLAŞTIRICI FAKTÖR ÜZERİNE**  
**ARAŞTIRMALAR**

**Derya ULUĞ**

**Tez Danışmanı:**  
**Prof. Dr. Selçuk HAZIR**

**AYDIN**



**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**  
**AYDIN**

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Derya ULUĞ tarafından hazırlanan Entomopatojen Nematodlar ve Yağmacı Uzaklaştırıcı Faktör Üzerine Araştırmalar başlıklı tez, 18.06.2018 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan :	Prof. Dr. Selçuk HAZIR	ADÜ	
Üye :	Prof. Dr. Fatih M. ŞİMŞEK	ADÜ	
Üye :	Prof. Dr. Mehmet KARAGÖZ	ADÜ	
Üye :	Prof. Dr. İsmail DEMİR	KTÜ	
Üye :	Dr. Öğr. Üyesi Barış GÜLCÜ	Düzce Üniversitesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun .....Sayılı kararıyla .....(tarih) tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Aydın ÜNAY  
Enstitü Müdürü



**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**  
**AYDIN**

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

18 /06./2018

Derya ULUĞ



## ÖZET

### ENTOMOPATOJEN NEMATODLAR VE YAĞMACI UZAKLAŞTIRICI FAKTÖR ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Derya ULUĞ

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı  
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Selçuk HAZIR  
2018, 115

Bu tez çalışması, entomopatojen nematodların simbiyotik bakterileri *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* türleri arasında SDF üretimi ve etkinliği açısından farklılık olup olmadığının ve bu maddenin yapısının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Yürütülen deneyler sonucunda, test edilen yağmacıların (*Tapinoma madeirense*, *Gryllus bimaculatus*, *Blatta lateralis*, *Squalius pursakensis*) farklı *Xenorhabdus* türleriyle enfekte edilmiş kadavralara farklı tepkiler verdikleri belirlenmiştir. Yağmacılar SDF aktivitesi göstermeyen *Xenorhabdus ehlersii*, *Xenorhabdus beddingii*, *Xenorhabdus ishibashii*, *Xenorhabdus doucetiae* ile enfekte kadavralar ile beslenmiş, test edilen diğer *Xenorhabdus* türleri ile ise beslenmemiştir. Yağmacılar, *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii*, *Photorhabdus luminescens* subsp. *kayaii*, *Photorhabdus temperata* subsp. *thracensis*, *Photorhabdus asymbiotica* subsp. *australis* türleri ile enfekte kadavraların hiçbirini tüketmemişlerdir. Deneyler sonucunda *Xenorhabdus* türlerinde SDF aktivitesi gösteren maddenin Hfq gen bölgesi bağımlı ve yüksek sıcaklıkta bozunmayan Pyrrolizixenamide maddesi olduğu belirlenmiştir. *Photorhabdus* türlerinde ise SDF aktivitesi gösteren maddenin farklı bir madde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *Xenorhabdus szentirmaii* ve *Photorhabdus luminescens* subsp. *kayaii* türlerine ait supernatantların *Aedes aegypti* ergin dişilerine karşı uzaklaştırıcı etkisi olduğu belirlenmiştir. *Xenorhabdus cabanillasii* bakteriyel supernatantlarının *Ae. aegypti* yumurtalarının açılmasını büyük oranda engellediği ve larvalarına karşı da önemli ölçüde toksik etki gösterdiği bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Scavenger deterrent factor, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*, *Aedes aegypti*.





## ABSTRACT

### INVESTIGATIONS ON ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES AND SCAVENGER DETERRENT FACTOR

Derya ULUĞ

PhD Thesis, Biology Department  
Supervisor: Prof. Dr. Selçuk HAZIR  
2018, 115

This study has been conducted to determine the structure, production and activity of SDF in different *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species. Different scavengers (*Tapinoma madeirense*, *Gryllus bimaculatus*, *Blatta lateralis*, *Squalius pursakensis*) showed different reactions to tested bacterial supernatants or bacteria-infected cadavers. As a result *Xenorhabdus ehlersii*, *Xenorhabdus beddingii*, *Xenorhabdus ishibashii* and *Xenorhabdus doucetiae* showed no SDF activity but all of the other tested *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species had significant deterrent activity. Also, *Xenorhabdus szentirmaii* and *Photorhabdus luminescens* subsp. *kayaii* had a significant deterrent effect against the females of *Aedes aegypti*. Bacterial supernatants of *Xenorhabdus cabanillasi* was found to be highly toxic against *Ae. aegypti* larvae and had an ovicidal effect against the eggs. It was shown that SDF is an Hfq dependent, thermostable product. It was found that all of the *Xenorhabdus* species (except *Xenorhabdus nematophila*) that show SDF activity produce pyrrolizidine alkaloids. Results showed that the compound shows SDF activity is pyrrolizidine alkaloids in *Xenorhabdus* species. It was also revealed that *Photorhabdus* species produce a different compound responsible for SDF activity.

**Key Words:** Scavenger deterrent factor, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*, *Aedes aegypti*



## ÖNSÖZ

Eğitim hayatım boyunca her konuda benimle bilgi ve tecrübelerini paylaşan ve tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Selçuk HAZIR'a,

Tezim süresince çalışmalarımnda bana destek olan sevgili arkadaşım Öğr. Gör. Harun ÇİMEN'e,

Aramızdaki mesafelere rağmen deneylerim esnasında bana her türlü destek ve yardımı sağlayan, tüm bilgilerini benimle paylaşan çok sevgili dostum Dr. Öğr. Üyesi Barış GÜLCÜ'ye,

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri ile ilgili olarak bana yardımcı olan değerli hocam Prof. Dr. İbrahim ÇAKMAK'a,

Sivrisinekler ile ilgili yaptığım deneylerde bana laboratuvarını açan sayın hocam Prof. Dr. Fatih M. ŞİMŞEK'e,

Tez çalışmasında kullandığım karınca türünün teşhisini yapan sayın Prof. Dr. Yılmaz ÇAMLITEPE'ye,

Manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen, tez çalışmam boyunca bana güç verip benimle birlikte bu süreci yaşayan sevgili annem Hatice AŞICI, babam Mustafa AŞICI ve eşim Yüksel ULUĞ'a,

Tez çalışmamı FEF-14006 no'lu proje ile destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi'ne ve 116Z074 no'lu proje ile destekleyen TÜBİTAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Derya ULUĞ



## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI .....	v
ÖZET .....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ .....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xxiii
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Biyolojik Mücadele.....	2
1.2. Biyolojik Mücadelede Kullanılan Organizmalar .....	3
1.2.1. Virüsler.....	3
1.2.2. Bakteriler.....	3
1.2.3. Funguslar.....	4
1.2.4. Protozoa.....	4
1.2.5. Nematodlar .....	4
1.2.5.1. Entomopatojen nematodların hayat döngüsü .....	7
1.2.5.2. Entomopatojen nematodların bakteriyel simbiyontları: <i>Xenorhabdus</i> ve <i>Photorhabdus</i> .....	8
1.2.5.3. <i>Xenorhabdus</i> ve <i>Photorhabdus</i> bakterilerinde sekonder metabolit mekanizması .....	10
1.2.5.4. <i>Xenorhabdus</i> ve <i>Photorhabdus</i> bakterilerinden elde edilen bazı önemli sekonder metabolitler.....	14
1.2.5.5. Hayatta kalma mekanizması: “Yağmacı Uzaklaştırıcı Faktör” (Scavenger Deterrent Factor - SDF) .....	16
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	19

3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	23
3.1. <i>Galleria mellonella</i> Larvalarının Üretilmesi .....	23
3.2. Bakteri Stok Kültürlerinin Hazırlanması.....	23
3.3. Bakteri Kültürleri ve Enfekte Kadavraların Hazırlanması .....	25
3.4. Farklı <i>Photorhabdus</i> ve <i>Xenorhabdus</i> Türleri Arasında SDF Üretimi ve Etkinliği Açısından Farklılık Olup Olmadığının Belirlenmesi .....	26
3.4.1. Karınca Deneyleri.....	26
3.4.2. Çekirge Deneyleri.....	27
3.4.3. Hamamböceği Deneyleri.....	29
3.4.4. Balık Deneyleri.....	30
3.5. <i>Xenorhabdus</i> ve <i>Photorhabdus</i> Bakteri Supernatantlarının Önemli Bir Vektör olan <i>Aedes aegypti</i> 'ye Karşı Etkilerinin Belirlenmesi .....	31
3.5.1. Bakteri Supernatantlarının Elde Edilmesi .....	32
3.5.2. Sivrisineklerin Üretilmesi.....	32
3.5.3. Bakteri Supernatantlarının <i>Aedes aegypti</i> Erginlerine Karşı Uzaklaştırıcı Etkisinin Araştırılması .....	33
3.5.4. Bakteri Supernatantlarının <i>Aedes aegypti</i> Yumurtalarına Karşı Ovisidal Etkisinin Araştırılması .....	35
3.5.5. Bakteri Supernatantlarının <i>Aedes aegypti</i> Larvalarına Karşı Larvisidal Etkinliklerinin Araştırılması.....	37
3.6. SDF Maddesinin Yapısını Belirlemeye Yönelik Çalışmalar .....	38
3.6.1. SDF'nin Protein Yapıda Olup Olmadığını Belirlemeye Yönelik Deneyler	38
3.6.2. SDF'nin Bakterilerde Hangi Gen Bölgesine Bağımlı Olarak Üretildiğinin Belirlenmesi .....	39
3.6.3. SDF Etkisi Gösteren Maddenin Ne Olduğunun Belirlenmesi.....	40
3.6.4. Doğada Böcek Kadavraları İçerisinde Bulunan Entomopatojen Nematodların Hayatta Kalmasında ve Üremesinde SDF'nin Rolünün Belirlenmesi .....	41

3.6.5. İstatistiksel Analizler.....	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. Farklı <i>Photorhabdus</i> ve <i>Xenorhabdus</i> Türleri Arasında SDF Üretimi ve Etkinliği Açısından Farklılık Olup Olmadığının Belirlenmesi .....	43
4.1.1. Karınca Deneyleri .....	43
4.1.2. Çekirge Deneyleri .....	46
4.1.3. Hamamböceği Deneyleri.....	47
4.1.4. Balık Deneyleri .....	48
4.2. <i>Xenorhabdus</i> ve <i>Photorhabdus</i> Bakteri Supernatantlarının Önemli Bir Vektör olan <i>Aedes aegypti</i> 'ye Karşı Etkilerinin Belirlenmesi .....	49
4.2.1. Bakteri Supernatantlarının <i>Aedes aegypti</i> Erginlerine Karşı Uzaklaştırıcı Etkisinin Araştırılması .....	49
4.2.2. Bakteri Supernatantlarının <i>Aedes aegypti</i> Yumurtalarına Karşı Ovisidal Etkisinin Araştırılması .....	53
4.2.3. Bakteri Supernatantlarının <i>Aedes aegypti</i> Larvalarına Karşı Larvisidal Etkinliklerinin Araştırılması .....	55
4.3. SDF Maddesinin Yapısını Belirlemeye Yönelik Çalışmalar.....	57
4.3.1. SDF'nin Protein Yapıda Olup Olmadığını Belirlemeye Yönelik Deneyler .....	57
4.3.2. SDF'nin Bakterilerde Hangi Gen Bölgesine Bağımlı Olarak Üretildiğini Belirlemeye Yönelik Deneyler .....	58
4.3.3. SDF Etkisi Gösteren Maddenin Ne Olduğunun Belirlenmesi.....	60
4.3.4. Doğada Böcek Kadavraları İçerisinde Bulunan Entomopatojen Nematodların Hayatta Kalmasında ve Üremesinde SDF'nin Rolünün Belirlenmesi .....	63
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	64
KAYNAKLAR .....	71
ÖZGEÇMİŞ .....	89





## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- °C : Santigrad Derece
- µl : mikrolitre
- ADF : Ant Deterrent Factor
- Bti : *Bacillus thuringiensis israelensis*
- cm : santimetre
- EPN : Entomopatojen Nematod
- IJ : İnfektif Juvenil
- J3 : 3. Juvenil Evre
- ml : mililitre
- PA : Pyrrolizidine alkaloid
- PXA : Pyrrolizixenamid
- Rpm : rotate per minute
- SDF : Scavenger Deterrent Factor



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Entomopatojen nematodların hayat döngüsü .....	8
Şekil 1.2. <i>Photorhabdus</i> ve <i>Xenorhabdus</i> bakterilerinin sırasıyla <i>Heterorhabditis</i> ve <i>Steinernema</i> cinslerine ait nematodların infektif juvenillerinde kolonize oldukları bölgeler.....	9
Şekil 1.3. Hfq-RNA kompleks oluşumu ve Hfq bağlanma yüzleri. (A) Hfq, sRNA'ları ve mRNA'ları benzer afinite ile bağlar. Hfq üçlü kompleksi oluşturmadan önce mRNA veya sRNA'yı önce bağlayabilir. (B) Hfq-AU <sub>5</sub> G (PDB ID: 1KQ1) ve Hfq-polyA (PDB ID: 1HK9) kristal yapıları üst üste bindirilmiştir. AU <sub>5</sub> G proksimal yüzü bağlar ve polyA, homoheksamerin distalini bağlar.....	12
Şekil 1.4. Bir PPTase ile post-translasyonel fosfopantatenilazasyonun genel reaksiyon şeması. PPTase burada, tipik bir NRPS modülü tarafından sergilenen <i>holo</i> -taşıyıcı proteini (CP) üretmek için, PPant parçasını Coenzim A'dan <i>apo</i> -CP üzerindeki korunmuş serine aktarır.C, yoğunlaşma; A, adenilasyon; CP, taşıyıcı protein domainleri; 3', 5'-PAP, 3',5'- fosfoadonezin fosfat.....	14
Şekil 3.1. Yapay besi ortamında üretilen <i>Galleria mellonella</i> larvaları.....	23
Şekil 3.2. <i>Galleria mellonella</i> larvasına bakteri süspansiyonunun enjekte edilmesi. ....	25
Şekil 3.3. Karınca deneyleri için hazırlanan düzenek. ....	27
Şekil 3.4. Çekirgeler ile kurulan deney düzeneği.....	28
Şekil 3.5. Hamamböcekleri ile kurulan deney düzenekleri.....	30
Şekil 3.6. <i>Squalius pursakensis</i> türüne ait balıklar ve hazırlanan deney düzeneklerinden bir bölüm. ....	31
Şekil 3.7. Sivrisineklerin üretilmesinde kullanılan düzenek. ....	33
Şekil 3.8. Bakteri supernatantlarının <i>Aedes aegypti</i> erginlerine karşı uzaklaştırıcı etkisinin test edilmesinde kullanılan deney düzeneği. ....	34
Şekil 3.9. Sağlıklı <i>Aedes aegypti</i> yumurtalarının mikroskop altında seçilerek deney yapılacak kaplara aktarılması.....	36

Şekil 3.10. Bakteri supernatantlarının <i>Aedes aegypti</i> yumurtalarının açılmasına etkisini test etmek amacıyla hazırlanan deney düzeneği .....	36
Şekil 3.11. Bakteri supernatantlarının 3. dönem <i>Aedes aegypti</i> larvalarına karşı öldürücü etkisini test etmek amacıyla kullanılan 24 gözenekli deney düzeneği.....	37
Şekil 3.12. SDF maddesinin protein yapıda olup olmadığını belirlemek amacıyla kurulan deney düzeneği.....	39
Şekil 3.13. Karton üzerine iğnelenmiş <i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> 'ye ait yabancı tip (WT) ve mutant bakteriler ile enfekte edilmiş <i>Galleria mellonella</i> larvaları.....	40
Şekil 3.14. SDF aktivitesi gösteren ve göstermeyen simbiyotik bakterileri taşıyan entomopatojen nematodlar ( <i>Steinernema rarum</i> ve <i>Steinernema longicaudum</i> ) ile kurulan deney düzeneği.....	42
Şekil 4.1. Farklı <i>Xenorhabdus</i> türleri ile enfekte edilmiş <i>Galleria mellonella</i> larvalarının <i>Tapinoma madeirense</i> türüne ait karıncalar tarafından tüketilmesi. ....	44
Şekil 4.2. Farklı <i>Xenorhabdus</i> türleriyle enfekte <i>Galleria mellonella</i> larvalarının <i>Tapinoma madeirense</i> türüne ait karıncalar tarafından tüketim oranı (%).....	44
Şekil 4.3. Farklı <i>Photorhabdus</i> türleri ile enfekte edilmiş <i>Galleria mellonella</i> larvalarının <i>Tapinoma madeirense</i> türüne ait karıncalar tarafından tüketilmesi. ....	45
Şekil 4.4. Farklı <i>Photorhabdus</i> türleriyle 3 günlük enfekte <i>Galleria mellonella</i> larvalarının <i>Tapinoma madeirense</i> türüne ait karıncalar tarafından tüketim oranı.....	46
Şekil 4.5. <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> supernatantı (sol) ve TSB (sağ) püskürtülmüş kan emme düzeneklerine gelen <i>Aedes aegypti</i> dişileri.....	50
Şekil 4.6. <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> supernatantı ve steril TSB püskürtülmüş düzeneklere 10 dakika boyunca gelen ortalama dişi sivrisinek sayıları ...	50
Şekil 4.7. <i>Photorhabdus luminescens</i> supernatantı ve steril TSB püskürtülmüş düzeneklere 10 dakika boyunca gelen ortalama dişi sivrisinek sayıları ..	51

- Şekil 4.8. *Xenorhabdus cabanillasii* supernatantı ve steril TSB püskürtülmüş düzeneklere 10 dakika boyunca gelen ortalama dişi sivrisinek sayıları ....51
- Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlardaki *Xenorhabdus cabanillasii* supernatantlarının *Aedes aegypti* yumurtalarının açılmasına etkisi. ....53
- Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonlardaki *Xenorhabdus szentirmaii* supernatantlarının *Aedes aegypti* yumurtalarının açılmasına etkisi. ....54
- Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlardaki *Photorhabdus luminescens* supernatantlarının *Aedes aegypti* yumurtalarının açılmasına etkisi. ....55
- Şekil 4.12. *Xenorhabdus cabanillasii* supernatantının test edilen konsantrasyonlarda *Aedes aegypti* larvalarına karşı etkinliği.....56
- Şekil 4.13. *Xenorhabdus szentirmaii* supernatantının test edilen konsantrasyonlarda *Aedes aegypti* larvalarına karşı etkinliği.....56
- Şekil 4.14. *Photorhabdus luminescens* supernatantının test edilen konsantrasyonlarda *Aedes aegypti* larvalarına karşı etkinliği.....57
- Şekil 4.15. Otoklavlanmış ve otoklavlanmamış enfekte kadavraların deney sonunda tüketilme durumları. ....58
- Şekil 4.16. *Xenorhabdus szentirmaii* bakterisinin yabancı tip ve mutant suşları ile enfekte edilmiş *Galleria mellonella* larvalarının çekirgeler tarafından tüketilmesi. ....59
- Şekil 4.17. Çekirgelerin *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* TT01 suşuna ait farklı mutantlar ve yabancı tipe enfekte kadavralara verdikleri tepkiler. ....59
- Şekil 4.18. Bir pyrrolizidin alkaloid molekülünün genel kimyasal yapısı. ....61
- Şekil 4.19. Pyrrolizixenamid üretimi promotör bölge değişimi ile kontrol altına alınmış *Xenorhabdus szentirmaii* KS22 mutantının arabinoz ile indüklenmiş (+Ara) ve indüklenmemiş supernatantlarına çekirgelerin verdiği tepki.....62
- Şekil 4.20. *Xenorhabdus* bakterilerinde tanımlanan Pyrrolizixenamid (PXA) molekülünün kimyasal yapısı. ....63

Şekil 4.21. Çekirgelerin SDF üretmeyen *Steinernema longicaudum* ile enfekte  
ve kontrol gurubundaki larvalar ile beslenmesi..... 63



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Deneyleerde kullanılan bakteri türleri. ....	24
Çizelge 3.2. Karınca deneyleerinde kullanılan <i>Xenorhabdus</i> ve <i>Photorhabdus</i> bakterileri .....	26
Çizelge 3.3. Çekirge deneyleerinde kullanılan bakteri türleri.....	29
Çizelge 3.4. <i>Blatta lateralis</i> türü hamamböceklerine karşı SDF aktivitesi test edilen bakteri türleri. ....	29
Çizelge 3.5. Balık deneyleerinde test edilen bakteri türleri. ....	31
Çizelge 3.6. Deneyleerde kullanılan <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> türüne ait indüklenebilir promotor eklenmiş mutant suşlar. ....	41
Çizelge 4.1. Farklı bakteri türleri ile enfekte <i>Galleria mellonella</i> larvalarının <i>Gryllus bimaculatus</i> türüne ait çekirgeler tarafından tüketim durumu.....	47
Çizelge 4.2. Farklı bakteri türleri ile enfekte <i>Galleria mellonella</i> larvalarının <i>Blatta lateralis</i> türüne ait hamamböcekleri tarafından tüketim durumu. ..	48
Çizelge 4.3. Balık deneyleerinde elde edilen sonuçlar .....	49
Çizelge 4.4. Bakteri supernatantı püskürtülmüş düzeneklere gelen sinek sayılarının G testi ile değerlendirilmesi.....	52
Çizelge 4.5. <i>Gryllus bimaculatus</i> , <i>Blatta lateralis</i> ve <i>Squalius pursakensis</i> yağmacılarının farklı <i>Xenorhabdus</i> ve <i>Photorhabdus</i> türleri tarafından enfekte edilen <i>Galleria mellonella</i> kadavralarına verdikleri tepkiler.....	61
Çizelge 4.6. <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> türüne ait farklı gen bölgelerinde indüklenebilir promotor değişikliği yapılmış mutantlarla üretimi kontrol edilen maddeler ve çekirgelerin bunlara verdiği tepkiler.....	62





## 1. GİRİŞ

Günümüzde gelişen bilim ve teknoloji insanların yaşam standartlarını artırırken, geçmiş dönemlerde büyük salgınlara neden olan pek çok hastalığı da etkisiz hale getirmiş veya büyük ölçüde kontrol altına alınmasını sağlamıştır. Ancak insan nüfusunun hızla artması, birçok ülkede açlık ve yetersiz beslenme sebebiyle daha fazla tarım ürünü eldesine yönelik uygulamalar yapılmasına sebep olmuştur. Bununla birlikte, tarımsal üretimi olumsuz yönde etkileyen pek çok zararlı organizma mevcuttur ve iyi bir üretim yapabilmek için bunlarla mücadele etme zorunluluğu vardır. Dünyada her yıl ortalama 2 milyon ton pestisit kullanılmaktadır. Kullanılan pestisitlerin %47,5'ini herbisitler, %29,5'ini insektisitler, %17,5'ini fungusitler, %5,5'ini ise diğer pestisitler oluşturmaktadır (De vd., 2014). Kimyasal insektisitler kolay uygulanabilir olmaları, etkilerini çabuk göstermeleri ve zararlıların sebep oldukları ürün kaybını önemli ölçüde azaltmaları sebebiyle tarımsal üretimde uzun yıllardır sıklıkla kullanılmaktadır. Tarımın yanı sıra insektisitler paraziter ve mikrobiyal hastalıklara vektörlük yapan böceklerle mücadelede de kullanılmaktadırlar. Ancak yaygın olarak kullanılan bu insektisitler, su ve toprakta kalıntı birikimine, hedef olmayan organizmaların yok olmasına, besin zincirinin bozulmasına, zamanla dirençli böceklerin ortaya çıkmasına ve bunların bir sonucu olarak da birçok bulaşıcı hastalık etkeninin insan ve hayvanlar arasında yayılmasına sebep olmaktadır (Wojciech ve Korsten, 2002). Kimyasal mücadelenin en önemli alternatifi biyolojik mücadeledir. Biyolojik mücadele, en basit haliyle zararlı organizmaların popülasyonlarının baskılanması için kimyasal pestisitler yerine doğal düşmanların kullanılmasıdır. Biyolojik mücadelede hedef kimyasal mücadelede olduğu gibi zararlıları tümüyle yok etmek değil, zararlı yoğunluğunu ekonomik zarar eşiğinin altında tutmak, böylece söz konusu zararlıların doğal düşmanlarının doğada sürekliliğini sağlamaktır. Biyolojik mücadelenin en önemli avantajı çevre ve insan sağlığına olumsuz etkilerinin olmaması ve kimyasal insektisitlerin kullanılmasıyla zararlı böceklerde ortaya çıkan direnç gelişiminin doğal düşman kullanımında söz konusu olmamasıdır. (Bartlett, 1964; Johnson ve Tabashnick, 1999). Her ne kadar günümüzde kimyasal pestisitler hala yaygın bir şekilde kullanılmaya devam etse de, son zamanlarda bakteri, fungus, nematod, virüs, feromon ve bitki ekstraktı gibi pek çok farklı organizma ve madde kullanılarak üretilen pek çok biyolojik ve

biyoteknik ürün tarım ve ormancılık gibi alanlarda sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Ramírez-Lepe ve Ramírez-Suero 2012).

### 1.1. Biyolojik Mücadele

Biyolojik mücadele; predatör, patojen, parazit, rekabetçi bir organizma veya bir mikroorganizma tarafından üretilen bir toksinin kullanılmasıyla hedef organizma popülasyonunun azaltılması yöntemidir (Hemingway, 2005). Biyolojik mücadele klasik, koruma ve çoğaltma adı verilen üç farklı şekilde gerçekleştirilebilir (Lacey, 2017). Klasik biyolojik mücadelede istilacı bir zararlıya karşı bu zararlının predatör, parazitoid veya patojenlerinin başka bir bölgeden toplanarak getirilmesi ve ortama salınması ile bu zararlının uzun dönem kontrolünün sağlanmasıdır. Koruma odaklı biyolojik mücadelede amaç zararlının doğal düşmanlarının hayatta kalmalarını sağlayacak çevre koşullarını sağlamaktır. Çoğaltma odaklı biyolojik mücadelede ise esas hedef ortamda var olan doğal düşmanların prevalansını artırarak zararlılarla mücadeleyi sağlamaktır (Lacey, 2017).

Biyolojik mücadelede en fazla kullanılan ajanlar (mikrobiyal kontrol ajanları) bakteriler, virüsler, funguslar, protozoa ve nematodlar gibi organizmalardır. Biyoteknik mücadelede ise feromonlar, bitki ekstraktları ve toksinler gibi bileşikler sıklıkla kullanılır. Geniş spektrumlu kimyasal inseksititlerin aksine, biyolojik mücadelede kullanılan ajanların hedef zararlıya yüksek özgünlük göstermesinden dolayı, hedef olmayan organizmalar üzerinde olumsuz etkileri yok denecek kadar azdır.

Modern biyolojik mücadele çalışmaları 1889 yılında California'da turuncgilleri etkileyen bir zararlının predatörünün kullanılmasıyla başlamış, 1900'lü yılların başında ise pek çok ülkede sivrisinek larvalarıyla mücadelede *Gambusia affinis* adı verilen predatör bir balık türünün kullanılmasıyla popüler hale gelmiştir (Hemingway, 2005). Biyolojik mücadele ajanlarının ilk kez ticari preparat haline getirilmesi ise Fransa'da 1938 yılında *Bacillus thuringiensis*'den elde edilen Sporeine adı verilen madde ile başlamıştır (Stenhaus, 1949; Davidson, 2012).

Günümüzde giderek yaygınlaşan biyolojik mücadele çalışmaları daha çok tarımsal zararlı organizmaların kontrol altına alınması için kullanılmaktadır. Omurgalı canlılara pek çok hastalık etmeni organizmayı bulaştıran artropod vektörlerin

kontrolünde kullanımları ise tarımsal zararlılara karşı kullanımın gerisinde kalmıştır. Birçok hastalık etmeni organizmaya vektörlük eden en önemli artropodlardan birisi sivrisineklerdir. Sivrisineklerle biyolojik mücadelede en yaygın olarak kullanılan organizma 1975 yılında tanımlanan *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) dir. Tarımsal zararlılara karşı kullanılan diğer *Bacillus* türlerinden farklı olarak, *Bti* toksinleri karasinek ve sivrisinek larvalarını da öldürmektedir. *Bti*, 1981 yılından beri ticari preparat halinde karasinek ve sivrisineklerin biyolojik mücadelesinde kullanılmak üzere satılmaktadır. Sivrisineklere karşı toksik etki gösteren *Bacillus sphaericus* da *Bti* gibi ticari olarak satılmaktadır (Hemingway, 2005).

## **1.2. Biyolojik Mücadelede Kullanılan Organizmalar**

### **1.2.1. Virüsler**

Yapılan araştırmalarda, en az 16 familyaya ait çok sayıda virüs türünün böcekler ve diğer artropodlarla ilişkili olduğu bulunmuştur (Miller, 1997; Miller ve Ball, 1998; Possee ve King, 2014). Bu virüsler içerisinde mikrobiyal mücadelede kullanılmaları için üzerinde en fazla araştırma yapılanlar 600'ün üzerinde türünün konukçu olarak böcekleri kullandığı belirlenen bakülovirüslerdir (Miller, 1997; Szewczyk vd., 2006; Cory ve Evans, 2007). Baculoviridae ailesi içinde yer alan 4 cins içerisinde en fazla kullanılanlar Alphabaculovirus [nucleopolyhedrovirus (NPV)] ve Betabaculovirus [granulovirus (GV)] lerdir (Cory ve Evans, 2007; Eberle vd., 2012). NPV'ler daha çok lepidopterleri, bunun yanı sıra dipter, hymenopter ve crustaceaeleri enfekte ederken; GV'ler ise yalnızca lepidopterleri enfekte ederler (Miller, 1997; Eberle vd., 2012).

### **1.2.2. Bakteriler**

Ticari olarak üretilip satılan mikrobiyal mücadele ajanları içerisinde en fazla pazar payına sahip olan organizmalar bakterilerdir. Ancak pazar payına oranla satılan bakteri tür sayısı oldukça azdır. Günümüzde ticari preparasyonu yapıp satılan bakteri türleri: *Bacillus thuringiensis* subsp., *Bacillus sphaericus*, *Serratia entomophila* ve *Chromobacterium subtsugae*'dir. Bu türler dünyada en fazla kullanılan mikrobiyal pestisitlerdir ve tüm satışların %50'sini oluşturmaktadırlar (Glare vd., 2012; Lacey vd., 2015). *Bacillus thuringiensis* uygulamalarının çoğu

tarım ürünlerindeki lepidopter zararlılarına karşı yapılmaktadır. Bunu orman zararlıları, karasinek ve sivrsineklere yapılan uygulamalar takip etmektedir. *B. thuringiensis* ve *B. sphaericus* bakterileri parasporal inklüzyonlar içinde protein yapılı toksinler ürettikleri için sindirim yolu ile alındıklarında larvisidal etki göstermektedirler (Lacey, 2017).

### 1.2.3. Funguslar

Yaklaşık 700-1000 arası fungus türünün artropodlarda hastalık yaptığı bilinmektedir (Goettel vd., 2010; Vega vd., 2012). Böceklerin ve akarların biyolojik mücadelesinde kullanılan fungusların çoğu Hypocreales ve Entomophthorales takımları içerisinde yer almaktadır. Funguslar, böcekler ve akarlar içerisinde geniş bir konukçu dağılımına sahip olmalarının yanı sıra hemipterlere karşı tek etkili biyolojik mücadele ajanı olma özelliğine sahiptirler. Ticari preparasyonu yapılan funguslar Hypocreales takımı içerisinde yer alır. Bu türlerden bazıları; *Beauveria bassiana*, *Metarhizium* spp., *Isaria fumosorosea* ve *Lecanicillium* spp.'dir. Bu türler çeşitli tarım ürünlerinde kayıplara sebep olan pek çok zararlıya karşı kullanılmaktadır.

### 1.2.4. Protozoa

Mastigophora, Sarcodina ve Ciliophora gruplarında yer alan bazı protozoon türlerinin böcekleri enfekte ettiği bilinmektedir (Pramer ve Al-Rabiai, 1973). Bu organizmaların sadece küçük bir bölümü potansiyel biyolojik mücadele ajanı olarak dikkat çekmiştir. Böceklerle en fazla ilişkili olan protozoon türleri Sporozoa grubu içerisinde yer almaktadır. Böcekleri parazitleyen Sporozoa türleri Coccidia, Haplosporidia, Gregarina ve Microsporidia içerisinde yer alır. Bunların içinden biyolojik mücadelede kullanılma potansiyeli en yüksek olan türler Microsporidia içerisinde yer almaktadır. Microsporidia türlerinin ekonomik olarak önemli 200'ün üzerinde böcek türünü enfekte ettiği bilinmektedir (Pramer ve Al-Rabiai, 1973).

### 1.2.5. Nematodlar

Nematodlar doğada ya serbest olarak ya da bitki ve hayvanlarda parazitler olarak yaşarlar. Pek çok nematod türü böceklerle foretik, parazitik veya patojenik ilişki içerisinde yer almaktadır (Koppenhöfer, 2000). Bugüne kadar böceklerle parazitik ilişki içerisinde olan 33 nematod familyası tanımlanmıştır. Bu familyaların 7 tanesi

böceklerle karşı potansiyel biyolojik mücadele ajanı olan türleri içerir. Bunlar: Mermithidae ve Tetradenematidae (Ordo: Stichosomida); Allantonematidae, Phaenopsitylenchidae ve Sphaerularidae (Ordo: Tylenchida); Heterorhabditidae ve Steinernematidae (Ordo: Rhabditida) familyalarıdır (Koppenhöfer, 2000). Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarına ait nematodlar, toprakta yaşayan zorunlu böcek patojeni organizmalardır ve bu nedenle entomopatojen nematodlar (EPN) olarak adlandırılırlar (Georgis vd., 2006). Toprakta yaşayan bu nematodlar bugüne dek Antarktika hariç dünyanın bütün kıtalarından izole edilmişlerdir. (Campos-Herrera vd., 2015). Heterorhabditidae familyası üyelerinin serbest yaşayan ve bakteriyelle beslenen bir atadan geldiği düşünülmektedir (Lewis ve Clarke, 2012). Yapılan moleküler çalışmalar Heterorhabditidae familyasının, omurgalı parazitlerini içeren Strongylida takımındaki nematodlarla yakın ilişkili olduğunu göstermiştir. Steinernematidae familyasındaki nematodların ise serbest yaşayan veya böceklerle ilişkili olan Panagrolaimidae ve omurgalı parazitlerini içeren Strongyloididae familyası ile yakın akraba oldukları düşünülmektedir (Blaxter vd., 1998). Steinernematidae familyasında *Steinernema* ve *Neosteinernema* olmak üzere iki cins bulunmaktadır. Heterorhabditidae familyası ise sadece *Heterorhabditis* cinsiyle temsil edilmektedir (Hazir vd., 2003; Kaya vd., 2006). *Steinernema* ve *Heterorhabditis* cinslerine ait nematodların konvergent olarak evrimleşerek benzer morfoloji ve yaşam özellikleri kazandıkları düşünülmektedir (Poinar, 1990). Zorunlu böcek patojeni olan EPN'ler, böcek konukçularını 24-48 saat içerisinde öldürmeleri, hedef olmayan organizmalar ve çevre için güvenli olmaları sebebiyle zararlı böcek kontrolünde popüler hale gelmiş organizmalardır (Gaugler ve Kaya, 2000). Dünyanın birçok farklı bölgesinde EPN'lerin izolasyonu ve tür çeşitliliğinin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Şimdiye kadar *Steinernema* cinsine ait 100; *Heterorhabditis* cinsine ait ise 17 farklı nematod türü tanımlanmıştır (Gülcü vd., 2017). Bu iki cinse ait nematodlar klasik, koruma ve çoğaltma odaklı biyolojik mücadele çalışmalarında uzun yıllardır kullanılmaktadır (Kaya ve Gaugler, 1993; Grewal vd., 2005; Lacey ve Georgis, 2012).

Entomopatojen nematodlar laboratuvar koşullarında *in vivo* ve *in vitro* olarak üretilmektedir. Laboratuvar ve küçük çaplı alan denemeleri için genellikle *in vivo* üretim tercih edilmektedir (Ehlers ve Shapiro-Ilan, 2005). Entomopatojen nematod'ların *in vivo* olarak üretilmesinde genellikle Lepidoptera, Coleoptera ve

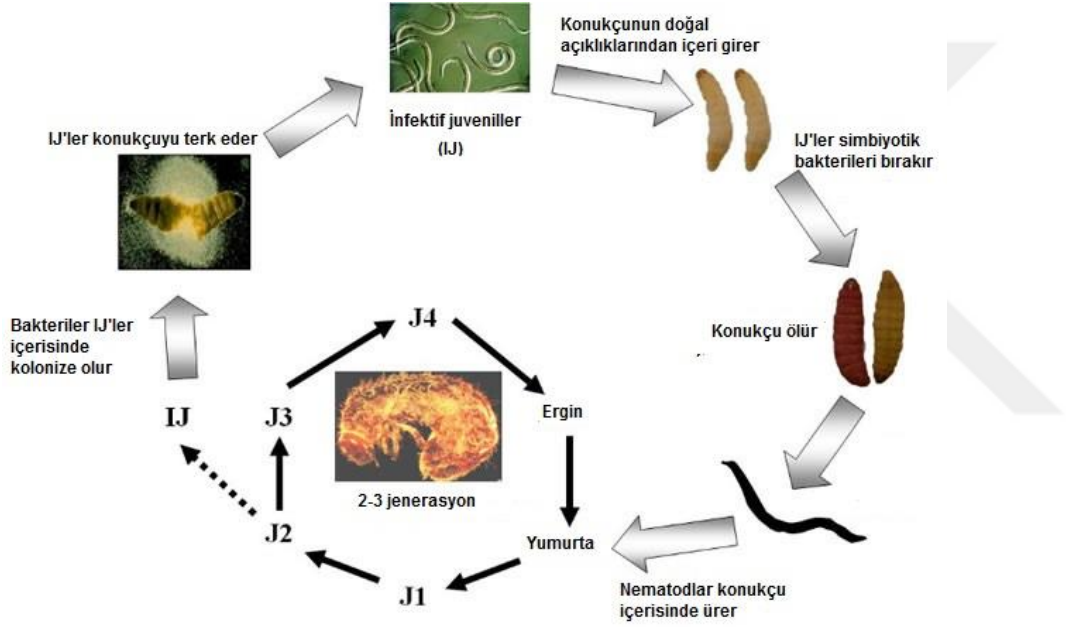
Diptera takımlarında yer alan böceklerin ergin öncesi dönemleri kullanılmaktadır. Ticari amaçlı kitle üretim için ise *in vitro* üretim tercih edilmektedir. Entomopatojen nematodlar pek çok farklı besiyeri (sıvı ya da katı) kullanılarak *in vitro* olarak üretilmektedir (McMullen ve Stock, 2014). Bu nematodların kitlesele üretimi yapıldıktan sonra saklama, taşıma ve uygulama yapılabilmesi için uygun şekilde formüle edilmesi gerekmektedir. Ticari olarak ilk kez EPN üretme girişimi, 1983 yılında BioSys firması tarafından geliştirilen ancak daha sonra üretimi durdurulan bir *in vitro* üretim yöntemi ile olmuştur (Friedman, 1990; Gaugler vd., 2002). Günümüzde pek çok EPN türü, kitle halinde üretildikten sonra farklı şekillerde formüle edilerek ekonomik açıdan önemli pek çok zararlıya karşı ticari olarak satılmaktadır. Genellikle bu formülasyonlar aktif içerik, taşıyıcı ve katkı maddelerinden oluşmaktadır (Cruz-Martinez vd., 2017). Formülasyonlardaki aktif içerik EPN'lerdir. Taşıyıcı maddeler ise genel olarak katı, sıvı ya da jel maddeler veya kadavralardır. Katkı maddeleri ise surfaktanlar, adsorbanlar, absorbanlar, emulsifiye ediciler, antimikrobiyal maddeler ve UV koruyucular gibi maddelerdir (Grewal, 2002). Katkı maddelerinin kullanılmasındaki esas amaç EPN'lerin hayatta kalma oranlarını artırmak ve infektivitelerini korumalarını sağlamaktır (Cruz-Martinez vd., 2017). Ticari olarak satılan EPN'ler çoğunlukla sünger, vermikulit, sulu süspansiyon, aljinat jel ve suda çözünabilir granüller şeklinde formüle edilmektedir (Georgis, 1990; Grewal, 2002). Yapılan çalışmalar EPN'ler ile enfekte edilmiş böcek kadavralarının da zararlılarla mücadelede başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir (Shapiro ve Glazer, 1996; Shapiro-Ilan vd., 2001). Hatta yapılan pek çok çalışma, enfekte kadavralardan çıkan EPN'lerin infektivitesinin ve topraktaki kalıcılığının oldukça yüksek olduğunu ve bu formülasyon yönteminin sulu süspansiyon uygulamalarına göre daha başarılı olduğunu göstermiştir (Shapiro-Ilan ve Lewis, 1999; Perez vd., 2003; Shapiro-Ilan vd., 2003). Ticari olarak üretilen EPN'ler çim alan, tarla ve seralarda ürün kaybına sebep olan Lepidoptera (örn; *Agrotis ipsilon*, *Cydia pomonella*, *Helicoverpa zea*) Coleoptera (örn; *Otiorynchus sulcatus*, *Diaprepes abbreviatus*, Fam: Scarabaeidae) Diptera (örn; Fam: Sciaridae, Fam: Tipulidae) ve Orthoptera (örn: *Scapteriscus* spp.) takımlarında yer alan pek çok zararlı böcek türü ile mücadelede başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Gülcü vd., 2017).

### 1.2.5.1. Entomopatojen nematodların hayat döngüsü

Entomopatojen nematodlar hayat döngülerinde yumurta, 4 adet larva evresi ve ergin evre olmak üzere toplam 6 evreye sahiptirler. Nematodların toprakta serbest olarak yaşayan tek evresi olan dauer juvenil (J3) evresi “infektif juvenil” (IJ) evre olarak da adlandırılır. Bu evre, ticari olarak satılan biyolojik mücadele preparatlarında kullanılan evredir (Lewis ve Clarke, 2012). Infektif juvenil evresi, toprak içerisinde dağılımda ve konukçunun bulunmasında aktif rol oynayan kilit evredir. Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyasına ait nematodların IJ’leri sırasıyla *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* cinsine ait bakteriler ile simbiyotik ilişki içerisinde (Boemare, 2002). Infektif juveniller, toprakta bulunduğu böcek konukçusunun ağız, anüs, spirakl gibi doğal açıklıklarını kullanarak veya bazı durumlarda doğrudan doğruya kütikulasını delerek konukçu içerisine girer (Kaya ve Gaugler, 1993). *Heterorhabditis* IJ’leri proksimal dişlerini kullanarak böceğin kütikulasını delebilmektedir. *Steinernema* IJ’lerinin dişlerinin olmamasından dolayı uzun bir süre boyunca sadece *Heterorhabditis* IJ’lerinin bu şekilde böcek hemosölü içine girebileceği düşünülmüştür. Ancak *Steinernema feltiae*’nin konukçuya deriden girişi bu bakış açısıyla çelişmektedir (Dowds ve Peters, 2002).

Konukçu hemosölü içerisine girdikten sonra, steinernematid IJ’leri taşıdıkları simbiyotik bakterilerini anüsten, heterorhabditid IJ’leri ise ağızdan hemosöl içerisine bırakırlar (Ciche ve Ensign, 2003; Ciche vd., 2006). Simbiyotik bakteriler konukçu içerisine salındıktan sonra, ürettikleri hücre dışı toksin ve enzimler sayesinde, nematodların konukçularını 24-48 saat içerisinde öldürmesine yardımcı olurlar (Adams ve Nguyen, 2002). Infektif juveniller konukçu içinde gelişip gömlek değiştirerek J4 evresine geçerler. Bu evrede nematodlar, konukçunun parçalanmış dokuları ve üremekte olan simbiyotik bakteriler ile beslenerek ergin bireylere gelişirler. Bu aşamada heterorhabditidler hermafroditler ve ikinci jenerasyonu üretirler. İkinci jenerasyonda ise hem hermafroditler, hem de dişiler ve erkekler bulunur (Adams and Nguyen, 2002). *Steinernema* türleri ise *Steinernema hermaphroditum* türü haricinde tüm jenerasyonlarda ayrı eşeylidirler (Stock vd., 2004). Erkek bireyler çiftleşmeden kısa süre sonra ölürlür. Konukçu böceğin büyüklüğüne bağlı olarak nematodlar, konukçu içerisinde iki ya da daha fazla jenerasyon geçirirler. Ancak küçük konukçularda bu yalnızca tek bir jenerasyon ile sınırlı kalabilir (Shapiro-Ilan vd., 2017). Konukçu içerisinde besin miktarının azalması ile birlikte, simbiyotik bakterileri taşıyan binlerce IJ

konukçuyu terk ederek toprağa geçer ve kendilerine yeni konukçu aramaya başlar (Adams ve Nguyen 2002; Stock 2015) (Şekil 1.1). Enfeksiyonun başlamasından IJ'lerin konukçuyu terk etmesine kadar geçen süre nematod ve konukçu türü, konukçu büyüklüğü ve sıcaklığa bağlı olarak 10-30 gün arasında sürer (Lewis ve Clarke, 2012).



Şekil 1.1. Entomopatojen nematodların hayat döngüsü (Ffrench-Constant vd., 2003'ten uyarlanmıştır).

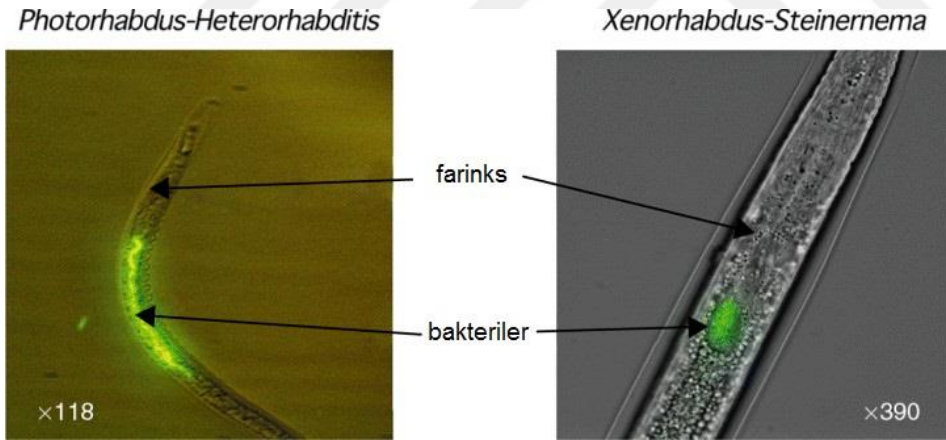
### 1.2.5.2. Entomopatojen nematodların bakteriyel simbiyonları: *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus*

*Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* cinslerine ait bakteriler, içerisinde *Escherichia coli*, *Salmonella* ve *Yersinia* spp. gibi pek çok önemli memeli patojenini barındıran Enterobacteriaceae familyasında yer alır (Tailliez vd., 2010). Bu bakteriler fakültatif anaerobik, spor oluşturmeyen, çubuk şeklinde, hareketli ve gram negatif bakterilerdir (Forst vd., 1997). *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterileri birbirine benzeyen pek çok özellik taşımanın yanı sıra birbirlerinden oldukça farklıdır. *Photorhabdus* türleri biyoluminesens yapabilme özelliğine sahipken *Xenorhabdus* türlerinde böyle bir özellik görülmez (Poinar vd., 1980). Enterobacteriaceae



familyası için sıra dışı bir durum olarak *Xenorhabdus* spp. katalaz negatif özellik göstermektedir (Forst vd., 1997).

Dutky, 1937 yılında yaptığı çalışmada ilk kez bazı bakterilerin EPN'lerle mutualistik ilişki içerisinde olduğunu belirlemiştir. *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterileri IJ'lerin bağırsak sisteminde bulunurlar. *Xenorhabdus* türleri *Steinernema* IJ'lerinin bağırsağının anterior kısmında bulunan özel bir kesede taşınır (Martens ve Goodrich-Blair, 2005). *Heterorhabditis* IJ'lerinde ise böylesine özelleşmiş bir kese yoktur ve bakteriler IJ'lerde farinksin hemen altında lokalize olmuş preintestinal valf hücrelerine tutunurlar ve daha sonra bağırsak lümenine göç ederek burada çoğalırlar (Ciche vd., 2008) (Şekil 1.2). Her bir IJ ortalama 100-300 cfu (koloni oluşturan birim) kadar bakteri taşır (Ciche ve Ensign, 2003; Martens vd., 2003).



Şekil 1.2. *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* bakterilerinin sırasıyla *Heterorhabditis* ve *Steinernema* cinslerine ait nematodların infektif juvenillerinde kolonize oldukları bölgeler (Goodrich-Blair ve Clarke, 2007).

Bir EPN türü yalnızca tek bir bakteri türüyle mutualistik ilişkili olabilirken, bir bakteri türü birden fazla nematod türü ile ilişki içerisinde bulunabilir (Poinar, 1990; Lewis ve Clarke, 2012).

Entomopatojen nematodlar ve bakterileri arasındaki ilişki tamamen mutualistiktir. Çünkü EPN'ler, (1) konukçunun hızlı bir biçimde öldürülebilmesi, (2) rekabetçi mikroorganizmaları ortadan kaldıran antibiyotiklerin üretilmesi ve EPN'lerin

gelişmesi için uygun ortam oluşturulması, (3) konukçu dokularının parçalanarak EPN'ler için uygun besin haline dönüştürülmesi ve (4) bakterilerin kendisinin de EPN'ler için bir besin kaynağı olması nedeniyle bakterilere bağımlı durumdadırlar. Bakteriler ise (1) yeni konukçular bulabilmek, (2) dış çevre koşullarından korunmak, (3) konukçunun hemosölu içerisine girebilmek ve (4) konukçunun antibakteriyel proteinlerini inhibe edebilmek için EPN'lere bağımlıdır (Akhurst ve Boemare, 1990; Forst ve Clarke, 2002; Hazir vd., 2003; Stock ve Goodrich-Blair, 2008).

*Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* cinsine ait bakteriler böcek içerisine salındıktan sonra bakteriyosinler, kolisin E3-tip proteinler, böcek toksini kompleksleri ve çok çeşitli sekonder metabolitler üretirler (Thaler vd., 1995; Piel, 2004; ffrench-Constant ve Waterfield, 2006; Singh ve Banerjee, 2008; Bode, 2009; Cai vd., 2017).

### **1.2.5.3. *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterilerinde sekonder metabolit mekanizması**

Metabolitler; yakıt, yapı, sinyal verme, enzimlerde uyarıcı ve inhibe edici etkiler, kendi katalitik aktiviteleri, savunma ve diğer organizmalarla olan etkileşimler de dahil olmak üzere çeşitli işlevlere sahip metabolizma ara ürünleridir. Primer metabolitler normal büyüme, gelişme ve üreme ile doğrudan ilintilidir. Sekonder metabolitler ise doğrudan bu süreçlerde yer almaz, ancak genellikle önemli bir ekolojik fonksiyona sahiptirler. Bakterilerde sekonder metabolizma, bakterilerin üremeleri esnasındaki durgunluk fazında enerji ve karbon akışındaki değişikliklerle beraber küçük ve biyoaktif moleküllerin (sekonder metabolitler) üretilmesiyle ortaya çıkar (Joyce vd., 2011). Mikrobiyal sekonder metabolitler, onları üreten organizmaların büyüme ve gelişmesine doğrudan katkı sağlamaz ancak uygun olmayan çevresel koşullar altında hayatta kalmalarına yardımcı olurlar (Demain ve Fang, 2000; Gokulan vd., 2014). Bu maddeler antibiyotikler, pigmentler, toksinler, ekolojik rekabet ve simbiyoz efektörleri, feromonlar, enzim inhibitörleri, immün modülatör ajanlar, reseptör antagonistleri, böcek öldürücüler, antitümör ajanları gibi biyoaktivitelere sahip bileşiklerdir. Bu bileşikler dolaylı olarak insan sağlığı, beslenme ve toplumsal ekonomi üzerine faydalı veya zararlı etkilere sahiptirler (Gokulan vd., 2014).

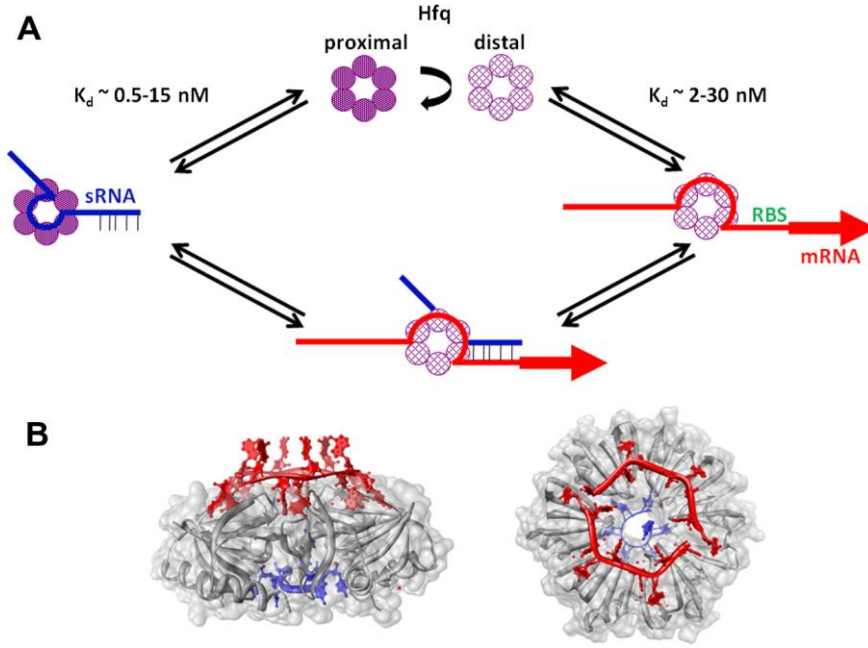
Entomopatojen bakteriler yeni doğal ürünlerin keşfedilmesi için umut vadeden bir kaynak olarak kabul edilmektedir (Bode, 2009). *Xenorhabdus/Photorhabdus*-EPN ortaklığı birlikte böcekleri enfekte eder ve öldürür. Bu mutualistik ilişkiyi devam ettirebilmek için, bakteriler nematodların üreme ve gelişmesine yardımcı bir seri sekonder metabolit üretirler.

*Xenorhabdus* ve *Photorhabdus*'ların antimikrobiyal özellikte pek çok bileşik ürettiği bilinmektedir (Reimer vd., 2009; Gualtieri vd., 2009; Houard vd., 2013; Fuchs vd., 2014). Son 30 yılda *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* cinsi bakterilerden 15'ten fazla bileşik sınıfı izole edilmiştir. Bu bileşikler Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere karşı etkili antibiyotikler, antifungal ve antiparazitik maddelerdir. Bu geniş spektrumlu antimikrobiyal madde üretimi *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus*'ların hayat döngüsünde olmazsa olmaz bir yere sahiptir. Konukçu böcek öldürüldükten sonra, geriye diğer organizmalar için besin kaynağı oluşturan lipid ve aminoasitler bakımından zengin kadavra kalır. Geniş spektrumlu antimikrobiyal maddeler böcek kadavrası içerisinde simbiyotik bakterilerle rekabete girecek mikroorganizmaları ortadan kaldırarak özellikle nematodların (ve bakterilerin) hayatta kalmasına yardımcı olur.

Bugüne kadar farklı *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* türlerinden insektisidal, antifungal, antibakteriyel, nematisidal ve sitotoksik aktivite gösteren pek çok sekonder metabolit elde edilmiştir. Bu sekonder metabolitlerin çoğu ribozomal olmayan peptid sentetaz (NRPS) ve yağ asidi sentaz (FAS) ilişkili poliketid sentetaz (PKS) adı verilen enzimler veya her ikisinin hibritleri tarafından üretilmektedir (Reimer, 2013). Pek çok *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* türünün genomlarının sekanslanması, yeni bileşik sınıflarının araştırılmasını kolaylaştırmıştır. Detaylı genom çalışmaları çok sayıda biyosentez gen bölgesinin sekonder metabolit üretiminden sorumlu olduğunu ortaya çıkarmıştır. Örneğin *Xenorhabdus nematophila* ATCC 19061 suşunda genomun protein kodlayan bölgesinin %7,5'inin sekonder metabolizmada rol oynadığı belirlenmiştir (Reimer, 2013). Sekonder metabolitlerin üretilmesinden sorumlu düzenleyici mekanizmalar çoğunlukla bilinmemektedir.

Bakteriler, gen ifadesini kontrol etmek için düzenleyici küçük RNA (sRNA)'lar kullanmaktadırlar. sRNA'lar virulans faktörlerin ifade edilmesinin yanı sıra bakterilerin olumsuz koşullarda hayatta kalması için de önemlidirler. sRNA'lar,

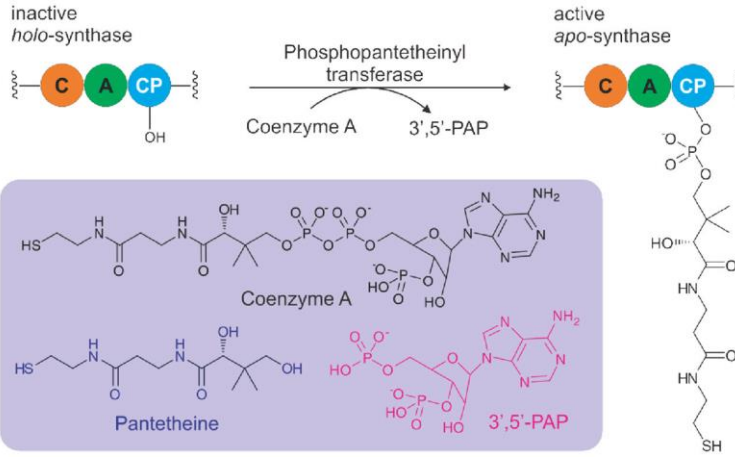
sıklıkla hedef mRNA'ların ribozoma bağlanma bölgelerini serbest bırakarak veya bloke ederek translasyonu kontrol ederler. Hfq proteini, hfq geni tarafından kodlanan, sRNA'ların hedef mRNA'lara bağlanmasını sağlayan ve tüm bakterilerde yaygın olarak bulunan posttranskripsiyonel düzenleyici bir proteindir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Hfq-RNA kompleks oluşumu ve Hfq bağlanma yüzleri. (A) Hfq, sRNA'ları ve mRNA'ları benzer afinite ile bağlar. Hfq üçlü kompleksi oluşturmadan önce mRNA veya sRNA'yı önce bağlayabilir. (B) Hfq-AU<sub>5</sub>G (PDB ID: 1KQ1) ve Hfq-polyA (PDB ID: 1HK9) kristal yapıları üst üste bindirilmiştir. AU<sub>5</sub>G proksimal yüzü bağlar ve polyA, homoheksamerin distalini bağlar (Faner ve Feig, 2013).

Hfq mutasyonu yapılmış bakteri suşlarında ( $\Delta$ hfq) sRNA'lar çevresel etkilere karşı transkribe edilseler bile sRNA'ların düzenleyici etkileri meydana gelemez. Bu mutantların fenotipik olarak genellikle büyüme oranı yavaşlamış, hücre boyutu büyümüş ve stres koşullarına duyarlılığı artmıştır. Hfq'nun aynı zamanda *Vibrio cholerae* ve *Salmonella typhimurium* gibi bakterilerde virulans faktörü olduğu belirlenmiştir (Sittka vd., 2007).

Bakteriyel sekonder metabolitlerin birçoğu özel enzimler aracılığıyla sentezlenirler. Örneğin *Photorhabdus*'lar tarafından üretilen anthraquinon'lar poliketid sentetaz (PKS), *Xenorhabdus*'lar tarafından üretilen xenematid'ler ribozomal olmayan peptid sentetaz (NRPS) ve xenocoumacin'ler ise her iki enzim (PKS/NRPS) aracılığıyla sentezlenirler (Brachmann, 2009). Bu enzimatik reaksiyonların gerçekleşmesi için bazı taşıyıcı proteinler gerekmektedir. Bunlardan peptidyl carrier protein (PCP), PKS enzimatik reaksiyonunda yer alırken, -acyl carrier protein (ACP), NRPS enzimatik reaksiyonunda yer almaktadır. Bu proteinlerin enzimatik reaksiyonda yer almaları için inaktif apo-formdan enzimatik olarak aktif holo-forma dönüşmeleri gerekmektedir. Bu aktivasyon basamağı phosphopantetheinyl transferase (PPTase) tarafından katalize edilmektedir (Şekil 1.4). PPTase'ler; ngrA geni tarafından kodlanan; bakteriler, arkeler ve ökaryotların tümünde hücre canlılığı için gerekli olan enzimlerdir. PKS ve NRPS gibi proaktif bir biçimde hareket eden modüler ve tekrarlayan sentazları post-translasyonel olarak değiştirir (Brachmann, 2009). *Photorhabdus luminescens* bakterilerinin ngrA mutant suşlarında hem antibiyotik aktivitenin ortadan kalktığı, hem de bu mutant bakterilerin nematodlarla sağlıklı bir simbiyotik ilişki kuramadıkları bildirilmiştir (Cicche vd., 2001). Bu bulgu ngrA bağımlı moleküllerin nematodların gelişimi için sinyal rolü oynadıklarına işaret etmektedir.



Şekil 1.4. Bir PPTase ile post-translasyonel fosfopantatenilazasyonun genel reaksiyon şeması. PPTase burada, tipik bir NRPS modülü tarafından sergilenen *holo*-taşıyıcı proteini (CP) üretmek için, PPant parçasını Coenzim A'dan *apo*-CP üzerindeki korunmuş serine aktarır. C, yoğunlaşma; A, adenilasyon; CP, taşıyıcı protein domainleri; 3', 5'-PAP, 3',5'- fosfoadonezin fosfat (Beld vd., 2014).

#### 1.2.5.4. *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterilerinden elde edilen bazı önemli sekonder metabolitler

*Xenorhabdus nematophila* ve *X. bovienii* türlerinden izole edilen indol türevleri, RNA sentezini inhibe etmek suretiyle birçok Gram negatif ve Gram pozitif bakteriye karşı antibakteriyel etki göstermektedir. Bazıları da medikal ve tarımsal açıdan önem taşıyan funguslara karşı antifungal etkinlik göstermektedir (Brachmann, 2009; Reimer, 2013).

Nematophin, bakteri ve funguslara karşı etkinlik göstermesinin yanı sıra *Staphylococcus aureus*'un antibiyotik dirençli suşlarına karşı da yüksek etkinlik göstermektedir (Li vd., 1997; Kennedy vd., 2000).

*Xenorhabdus doucetiae* ve *X.nematophila*'dan izole edilen Phenethylamide'ler insan kanser hücre hatlarına karşı önemli oranda sitotoksik etki göstermektedir (Paik vd., 2001).

*X. nematophila*'dan izole edilen xenorhabdin'ler ve *X. bovienii*'dan izole edilen xenortide'lerin de antibakteriyel, antifungal ve insektisidal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Li vd., 1998).

Xenocoumacin'ler Gram-pozitif bakterilere karşı antibyotik etki göstermenin yanı sıra antiülser ve antifungal aktiviteye de sahiptir. Xenocoumacin'ler iki form halinde bulunurlar: Xcn1, antibakteriyel ve antifungal etkiler gösteren daha aktif form, Xcn2'ler ise Xcn1'lerin dönüşümüyle ortaya çıkan ve antifungal etki göstermeyen daha az aktif olan formudur (Singh vd., 2015).

Xenematide'ler, xenortide'ler ile birlikte *X.nematophila*'dan izole edilen ilk peptidlerdir. Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyel etki göstermelerinin yanı sıra orta dereceli insektisidal aktiviteye de sahiptirler (Reimer, 2013).

*Xenorhabdus szentirmaii*'den elde edilen xenofuranon'lar *Aspergillus terreus* tarafından üretilen fungal furanon'lara benzerlik göstermekle birlikte zayıf bir sitotoksik aktiviteye sahiptir (Bode, 2009). Bu maddenin biyolojik fonksiyonunun tam olarak ne olduğu bilinmemektedir. Szentiamide'lerin ise sıtma etkeni olan *Plasmodium falciparum*'a karşı etkili olduğu bulunmuştur (Brachmann vd., 2006).

*X. nematophila* ve *Photorhabdus temperata*'dan izole edilen Benzylidenacetone'ler (BZA) bitki patojeni Gram-pozitif bazı bakterilere karşı antibakteriyel etki göstermektedir. BZA'lar aynı zamanda fosfolipaz A2 (PLA2) inhibitörü olarak etki ederek böceklerdeki bağışıklık sistemini baskılamakta ve nematod-bakteri kompleksinde anahtar bir rol oynamaktadır (Ji vd., 2004).

*Photorhabdus luminescens* ve *X. nematophila*'dan izole edilen Rhabduscin'ler böcek immün sisteminde melanizasyon metabolik yolunda rol oynayan fenoloksidaz enzimini inhibe etmektedirler (Crawford vd., 2010; Crawford vd., 2012).

Antrakinon'lar normalde doğada bitkiler tarafından yaygın olarak üretilirler. Bu sınıftaki maddelerin karınca ve kuş uzaklaştırıcı etkisi olduğu bilinmektedir (Fenton vd. 2011). *Photorhabdus luminescens* tarafından da sentezlenen bu maddenin bakterilerdeki işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte yağmacıları uzaklaştırmada görev alabileceği düşünülmektedir (Reimer, 2013).

Stilbenler de bitkiler tarafından üretildiği bilinen metabolitlerdir. Bu metabolitler aynı zamanda tüm *Photorhabdus* türlerinden de izole edilmiştir. İzopropilstilben ve etilstilbenler antimikrobiyal aktivite göstermenin yanı sıra bakteri-nematod mutualizminde de besin sinyali olarak görev almaktadır. Epoksistolbenler de antibakteriyel aktivite gösterir ve aynı zamanda insan kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik etkiye sahiptirler (Hu vd., 2006).

#### **1.2.5.5. Hayatta kalma mekanizması: “Yağmacı Uzaklaştırıcı Faktör” (Scavenger Deterrent Factor - SDF)**

Entomopatojen nematodlar konukçularının içine girdikleri zaman sadece onları öldürmekle kalmaz aynı zamanda konukçu içerisinde çoğalırlar. Bu nedenle yeni nesil IJ'lerin oluşması için genelde 7-15 günlük bir süreye ihtiyaç vardır. Bu süre içerisinde toprağın içinde veya üzerinde bulunan nematodla enfekte kadavra, patojen ve yağmacı organizmaların saldırısına açık durumdadır. Her ne kadar öyle görünsün de, EPN'ler konukçu içerisindeyken dışarıdan gelen tehditlere karşı tamamen savunmasız değildirler. İlk defa Baur vd. (1998) tarafından yapılan gözlemler sonucunda EPN ile enfekte kadvraların karıncalar tarafından yenmediği belirlenmiştir. Daha sonra EPN'lerle mutualistik ilişkili olan *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterilerinin karıncaları enfekte kadvralardan uzak tutan bir maddeyi (veya maddeleri) ürettikleri tespit edilmiştir (Zhou vd., 2002). Ne olduğu bilinmeyen bu maddeye “Karınca Uzaklaştırıcı Faktör” (Ant Deterrent Factor-ADF) adı verilmiştir (Zhou vd., 2002). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda bu madde(ler)nin sadece karıncalar değil aynı zamanda çekirgeler, hamamböcekleri, kollembolalar, yaban arıları (wasp'lar) (Gülcü vd., 2012; Uluğ vd., 2014) ve predatör böceklere karşı (Foltan ve Puza, 2009; Jones vd., 2016) da uzaklaştırıcı etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, omurgalı organizmalardan böcekçil bir kuş türü olan kızılgerdan (*Erithacus rubecula*)'nın *Heterorhabditis bacteriophora* ile enfekte olmuş böcek kadvralarını tüketmediği ve buna *Photorhabdus* bakterileri tarafından üretilen kırmızı renk ile kadvranın aldığı kötü tadın sebep olduğu ileri sürülmüştür (Fenton vd., 2011). Daha önce ADF olarak adlandırılan bu maddenin karıncalar dışında diğer birçok yağmacıyı da uzaklaştırdığı belirlenince ADF yerine daha genel bir deyimle “Yağmacı Uzaklaştırıcı Faktör” (Scavenger Deterrent Factor-SDF) olarak isimlendirilmesi uygun görülmüştür (Gülcü vd., 2012).



Jones vd. tarafından 2016 yılında yayınlanan çalışmada, *H. bacteriophora* ile enfekte olmuş böceklerden çıkan uyarıcı bir kokunun, EPN'leri nokturnal bir böcek türü olan *Pterostichus madidus*'un predasyonuna karşı korumada rol oynadığı belirlenmiştir. Enfeksiyon gün sayısı arttıkça böceklerin *H. bacteriophora* ile enfekte edilmiş larvalar ile beslenme oranının düştüğü gözlemlenmiştir. Bu uyarıcı sinyal "Parazitler indüklenen aposematizm" olarak adlandırılmıştır.

En son 2017 yılında Cyprinidae familyasından 3 omnivor balık türünün (*Devario aequipinnatus*, *Alburnoides bipunctatus* ve *Squalius pursakensis*) EPN'lerle enfekte *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarını ve nematod olmadan sadece *Xenorhabdus* veya *Photorhabdus* bakterileriyle enfekte edilmiş kadavraları yemedikleri belirlenmiştir (Raja vd., 2017).

Bakteriler tarafından üretilen bu maddenin enfekte böcek kadavrası içinde üremekte ve gelişmekte olan EPN'leri predasyona karşı koruduğu açıktır ancak hangi madde ya da maddelerin bu uzaklaştırıcı etkiyi gösterdiği henüz tam olarak bilinmemektedir. *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* bakterileri farklı kökenlere sahiptirler (Boemare, 2002). Bu nedenle birbirinden uzak gruplara ait olan ve konvergent olarak evrimleşen bu bakteriler tarafından üretilen ve yağmacıları uzaklaştırıcı etki gösteren SDF'nin de muhtemelen farklı maddeler olduğu tahmin edilmektedir.

SDF ile enfekte böcek kadavralarını yağmalayan canlılar arasındaki ilişkinin detaylarının anlaşılması, kadavra içerisinde gelişmekte olan nematodların korunması ve bu maddenin doğadaki devamlılığı ile ilgili temel bilgilere ulaşmamızı sağlayacaktır. Bunlara ek olarak, SDF tıbbi ve tarımsal açıdan zararlı böceklerin kontrolünde yeni nesil bir biyorepellent ve/veya biyotoksin olabilme potansiyeli de taşıyor olabilir.

Ancak, bu konuları aydınlatılabilmek için:

- (1) Farklı *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* türleri arasında SDF üretimi ve etkinliği açısından farklılık olup olmadığının belirlenmesi,
- (2) *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* bakterilerinde bu maddeyi kodlayan gen bölgesinin (ya da bölgelerinin) belirlenmesi,

- (3) SDF etkisi gösteren madde veya maddelerin ne olduğunun belirlenmesi,
- (4) Doğada böcek kadvraları içerisinde bulunan EPN'lerin hayatta kalmasında ve üremesinde SDF'nin rolünün belirlenmesi,
- (5) SDF'nin sivrisinekler gibi hastalık taşıyan önemli bir vektöre karşı repellent etki gösterip göstermeyeceğinin belirlenmesi,
- (6) Farklı bakteri türlerine ait sekonder metabolitlerin bulunduğu supernatantların sivrisinek larva ve yumurtalarına karşı toksik etkiye sahip olup olmadıklarının belirlenmesi gerekmektedir.

Bu doktora tez çalışması kapsamında yukarıda sıralanan konularda bilimsel araştırmalar yapılarak SDF maddesiyle ilgili detaylı bilgilere ulaşılmaya çalışılmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Baur vd. (1998) yaptıkları çalışmada Arjantin karıncası *Linepithema humile* (Mayr) toprağın 2 cm altına gömülmüş olan entomopatojen nematodla enfekte kadavraları tüketip tüketmediklerini test etmişlerdir. İşçi karıncalar steinernematid ile enfekte kadavraların %60-85'ini, heterorhabditid ile enfekte olmuş kadavraları ise yalnızca %10-20'sini oranında tüketmişlerdir. Karıncalar 4 günlük enfekte larvaları, 10 günlük enfekte larvalara oranla daha fazla tüketmişlerdir. *Veromessor andrei*, *Pheidole vistanana*, *Formica pacifica* ve *Monomorium ergatogyna* türlerine ait karıncalar da steinernematidlerle enfekte kadavraları %45 oranında tüketmişlerdir. Bu sonuçlar, yağmacı böceklerin özellikle *Steinernema* türleri ile enfekte kadavralar kullanılarak yapılacak biyolojik mücadele çalışmalarını olumsuz olarak etkileyebileceğini göstermiştir.

Zhou vd., 2002 yılında yaptıkları çalışmada *Xenorhabdus nematophila* ve *Photorhabdus luminescens* bakterileri tarafından üretilen karınca uzaklaştırıcı faktörün (ADF) etkilerini araştırmıştır. Yapılan çalışmada ADF aktivitesinin hem kadavra içerisinde, hem de *in vitro* olarak üretilen bakteri kültürlerinden elde edilen supernatantlarda mevcut olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu maddenin yüksek sıcaklığa dayanıklı, filtrelenebilir, asit duyarlı ve 10-kDa-por çaplı membrandan geçebilen bir madde olduğu bildirilmiştir. Bunun sonucunda da bu maddenin küçük, hücre dışı ve muhtemelen protein yapıda olmayan bir madde olduğu belirtilmiştir. Maddenin karınca uzaklaştırıcı etkisinin ise test edilen karıncanın ve bakterinin türüne, bakteri kültürünün yaşına göre değişiklik gösterdiği bulunmuştur.

Fenton vd., 2011 yılında yaptıkları çalışmada *Heterorhabditis bacteriophora* ile enfekte olan böcek larvalarının kızılgerdan (*Erithacus rubecula*) türüne ait kuşlar tarafından tüketilmediğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar bunun sebebinin *H. bacteriophora* ile enfekte olan larvaların kırmızı renge dönüşmesinin görsel bir uyarıcı veya uzaklaştırıcı sinyal olarak algılanmasıyla ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir.

Gülcü vd. (2012), entomopatojen nematodların simbiyotik bakterileri tarafından üretilen bir maddenin, karınca (*Lepisiota frauenfeldi*), çekirge (*Gryllus bimaculatus*), vasp (*Vespa orientalis* ve *Paravespula* sp.) ve leş sineği

(*Chrysomya albiceps*) gibi pek çok yağmacı böceğe karşı uzaklaştırıcı bir etkisi olduğunu belirlemişler ve bu maddeye “Yağmacı Uzaklaştırıcı Faktör” (Scavenger Deterrent Factor –SDF) adını vermişlerdir.

Uluğ vd. (2014), bazı hamamböceği (*Periplaneta americana*), karınca (*Tetramorium chefteti* ve *Pheidole pallidula*) ve dermapter (*Labidura riparia*) türlerinin entomopatojen nematodlar ile enfekte kadavraları tükettiklerini, çekirge (*Gryllus bimaculatus*) ve kollembola (*Sinella curviseta* ve *Folsomia candida*) türlerinin ise enfekte kadavralar ile beslenmediklerini belirlemişlerdir.

Jones vd. (2016), entomopatojen nematodlarla enfekte kadavralardan salgılanan bir kokunun nokturnal predatörlere karşı uzaklaştırıcı etki göstereceğini ileri sürmüş ve bu hipotezlerini nokturnal bir tür olan *Pterostichus madidus*'u kullanarak test etmişlerdir. Yapılan deneylerde enfeksiyonun erken evrelerinde dahi enfekte kadavralardan salınan kokunun bu türe karşı uzaklaştırıcı bir etkisi olduğu ve enfeksiyon ilerledikçe *Pterostichus madidus*'un enfekte kadavralarla beslenme oranının azaldığını bildirmişlerdir.

Raja vd. 2017 yılında yayınladıkları çalışmada *Devario aequipinnatus*, *Alburnoides bipunctatus* ve *Squalius pursakensis* türlerine ait 3 farklı omnivor balığın *Steinernema siamkayai*, *Steinernema feltiae*, *Heterorhabditis indica* ve *Heterorhabditis bacteriophora* türlerine ait EPN'ler ile 2 veya 4 günlük enfekte kadavralar ile beslenmediklerini belirlemişlerdir. Çalışmada aynı zamanda sadece *Xenorhabdus stockiae* ve *Photorhabdus luminescens* bakterileri ile enfekte edilen larvaların da balıklar tarafından tüketilmediği gözlemlenmiştir. Bu çalışma sonucunda SDF maddesinin ilk kez balıklara karşı da uzaklaştırıcı etki gösterdiği belirlenmiştir.

Kasap vd. (2003) sivrisinek kolonilerini beslemek amacıyla 4 farklı cam aparat ve membran olarak da kurutulmuş dana bağırsağı, lateks veya parafilm kullanmışlardır. Deneyler sonucunda cam aparat ve hayvan bağırsağı ile oluşturulan yapay besleme düzeneğinde %44-%50 oranında bir beslenme oranı elde etmişlerdir.

Govindarajan ve Karuppanan (2011), *Ervatamia coronaria* ve *Caesalpinia pulcherrima* bitki yapraklarından elde edilen benzen ve etil asetat ekstraktlarının

*Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* ve *Culex quinquefasciatus* türlerine karşı larvisidal, ovisidal ve repellent etkilerini test etmişlerdir. En yüksek larvisidal ve ovisidal etki *E. coronaria*'nın benzen ekstraktlarından elde edilmiştir.

Ahn vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada *Photorhabdus* türlerinden izole edilen 1,3-dimethoxy-8-hydroxy-9,10-anthraquinone ve 3-methoxychrysazine bileşiklerinin *Culex pipiens pallens* türü sivrisineklerin larvalarına karşı yüksek oranda öldürücü etki gösterdiğini belirlemişler ve bu bileşiklerin sivrisineklere karşı yapılacak biyolojik mücadelede biyopestisit olarak kullanılabilceğini belirtmişlerdir.

da Silva vd., 2013 yılında yaptıkları çalışmada, *Photorhabdus luminescens* ve *Xenorhabdus nematophila* türlerine ait bakterilerin oral yolla alındığında 3. ve 4. dönem *Aedes aegypti* larvalarına karşı en yüksek %83, en düşük %42 oranında mortaliteye sebep olduğunu belirlemişlerdir.

Yoon vd. 2015 yılında yaptıkları çalışmada idris otu ve rezene yağının sivrisinekler üzerindeki uzaklaştırıcı etkisini test etmişlerdir. İdris otunun uzaklaştırıcı etkisi 0-2. saatler arasında %97'den %57'ye; rezene yağının uzaklaştırıcı etkisi ise %88'den %47'ye düşmüştür. Kontrol olarak kullanılan DEET ise 6 saat boyunca %90 oranında uzaklaştırıcı etki göstermiştir.

Wangrawa vd. 2016 yılında yaptıkları çalışmada Burkino Faso'da yetişen 4 farklı yerel bitkiden elde edilen ekstraktların *Anopheles gambiae* türüne karşı larvisidal ve yumurtlama engelleyici etkilerini test etmişlerdir. Çalışmada *Lantana camara* türünden elde edilen hekzan ekstraktları *An. gambiae* larvalarına karşı en etkili madde olmuştur. Aynı türün aseton ekstraktları da yumurtlama oranlarını yüksek oranda azaltmıştır.

Park, Jung ve Kim (2016) yaptıkları çalışmada entomopatojen nematodlardan izole edilen *X. nematophila*, *X. hominickii* ve *P. temperata temperata* bakterileri tarafından üretilen sekonder metabolitlerin, sivrisineklerle biyolojik mücadelede sıkça kullanılan bir bakteri olan *Bacillus thuringiensis israelensis*'in *Aedes albopictus* ve *Culex pipiens pallens*'e karşı olan etkinliğini artırdığını bulmuşlardır.

da Silva ve arkadaşları 2017 yılında yaptıkları bir çalışmada, 3. dönem sonundaki *Aedes aegypti* larvalarına karşı *Photorhabdus luminescens* ve *Xenorhabdus nematophila* bakterilerine ait taze, kaynatılmış, buzdolabında bekletilmiş ve dondurulmuş supernatantların etkilerini test etmişlerdir. Deney sonucunda her iki bakteri türüne ait supernatantın larvalara karşı oldukça etkili olduğu bulunmuştur. *Xenorhabdus nematophila* supernatantı sivrisinek larvalarında *P. luminescens* supernatantına oranla daha fazla mortaliteye sebep olmuştur. Bunun yanı sıra *X. nematophila*'ya ait supernatantın kaynatılmaya ve dondurulmaya daha dayanıklı olduğu belirlenmiş, bunun sebebinin bu türün protein yapılı toksinler yerine daha çok protein yapıda olmayan sekonder metabolitler üretmesi olduğunu belirtmişlerdir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

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

Büyük balmumu güvesi *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvaları, içerisinde buğday unu (%22), mısır unu (%22), süt tozu (%11), kuru maya (%5,5), balmumu (%17,5), bal (%11) ve gliserin (%11) bulunan yapay besi ortamında üretilmiştir (Şekil 3.1) (Han ve Ehlers, 2000). Larvalar 28°C’de ve tamamen karanlık ortamda tutulmuştur (Mohammad ve Coppel, 1983).



Şekil 3.1. Yapay besi ortamında üretilen *Galleria mellonella* larvaları.

#### 3.2. Bakteri Stok Kültürlerinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan yabancıl ve mutant tip *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterilerinin bir kısmı Almanya Goethe Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Helge B. Bode’den temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan bakteri türlerinin tamamı Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan bakteri türleri.

<i>Xenorhabdus</i> Türleri	<i>Photorhabdus</i> Türleri
<i>X. bovienii</i>	<i>P. luminescens</i> subsp. <i>kayaii</i>
<i>X. poinarii</i>	<i>P. luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i>
<i>X. beddingii</i>	<i>P. luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>
<i>X. cabanillasii</i>	<i>P. temperata</i> subsp. <i>thracensis</i>
<i>X. nematophila</i>	<i>P. asymbiotica</i> subsp. <i>australis</i>
<i>X. szentirmaii</i>	
<i>X. mauelonii</i>	
<i>X. innexi</i>	
<i>X. stockiae</i>	
<i>X. vietnamensis</i>	
<i>X. doucetiae</i>	
<i>X. budapestensis</i>	
<i>X. ehlersii</i>	
<i>X. ishibashii</i>	
<i>X. hominickii</i>	
<i>X. miraniensis</i>	
<i>X. indica</i>	

Bazı bakteriler ise entomopatojen nematodlarla enfekte *G. mellonella* larvaları kullanılarak izole edilmiştir. Bu yöntemde *G. mellonella* larvaları, iki kat kurutma kâğıdı içeren 10 cm'lik cam petriler içerisinde 1000 IJ/ml içeren sulu nematod süspansiyonu ile enfekte edilmiştir. Petriler oda sıcaklığında (23-24°C) ve karanlık bir ortamda 36 saat muhafaza edilmiştir. Ölen larvalar %95'lik etil alkol içerisinde 5 dakika boyunca bekletilerek larvaların yüzeyi sterilize edilmiştir. Larvaların baş kısmı steril bir bistüri ucu ile kesilmiş ve çıkan hemolenf öze yardımıyla NBTA (Nutrient Agar, 0,004% (w/v) triphenyltetrazolium chloride ve 0,025% (w/v) bromothymol blue) besiyerine ekilerek 28°C'de 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Gülcü, 2010).

Deneylerde kullanılacak olan bakteriler Tryptic Soy Broth (TSB) (Becton, Dickinson and Company) besiyeri içerisinde 28°C'de ve 150 rpm'de 48 saat üretilmiştir. Bu sıvı besi ortamında üreyen bakteriler steril distile su ile %50 oranında sulandırılmış steril gliserin solüsyonu ile 1/3 oranında karıştırılarak 2 ml'lik cryo tüpler içerisine aktarılmış ve -80°C'lik derin dondurucuda stok olarak saklanmıştır (Orozco vd., 2013).



### 3.3. Bakteri Kùltürleri ve Enfekte Kadavraların Hazırlanması

Her bir bakteri türü için stok kùltürden alınan 10 µl bakteri kùltürü TSB sıvı besiyeri içerisine ekilerek 28°C ve 150 rpm'de 24 saat boyunca üretilmiştir. Elde edilen bakteri kùltürleri 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendikten sonra üstte kalan sıvı besiyeri uzaklaştırılmış ve yerine %0,9'luk steril serum fizyolojik (SF) eklenmiştir. Bakterilerin optik yoğunlukları spektrofotometrede (Shimadzu UV1280) OD<sub>600</sub>'de 1'e göre ayarlanmıştır (imen, 2013). Yoğunlukları ayarlanan bakterilerden 1 ml'lik enjektör (Beybi) ve 26 G ½" iğne kullanılarak 10'ar µl çekilmiş ve son dönem *G. mellonella* larvalarına 1. veya 2. çift yalancı bacağıın bulunduğu bölgeden enjekte edilmiştir (imen, 2013). Larvalar 24°C'de 3 gün inkübe edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. *Galleria mellonella* larvasına bakteri süspansiyonunun enjekte edilmesi.

### 3.4. Farklı *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* Türleri Arasında SDF Üretimi ve Etkinliği Açısından Farklılık Olup Olmadığının Belirlenmesi

Tez çalışmasının bu bölümünde *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* cinslerine ait farklı bakteri türlerinin SDF aktiviteleri, daha önce SDF'ye tepki verdikleri bilinen yağmacı organizmalardan karıncalar (Baur vd., 1998), çekirgeler (Gülcü vd., 2012), hamamböcekleri (Uluğ vd., 2014) ve balıklar (Raja vd., 2017) üzerinde test edilmiştir.

#### 3.4.1. Karınca Deneyleri

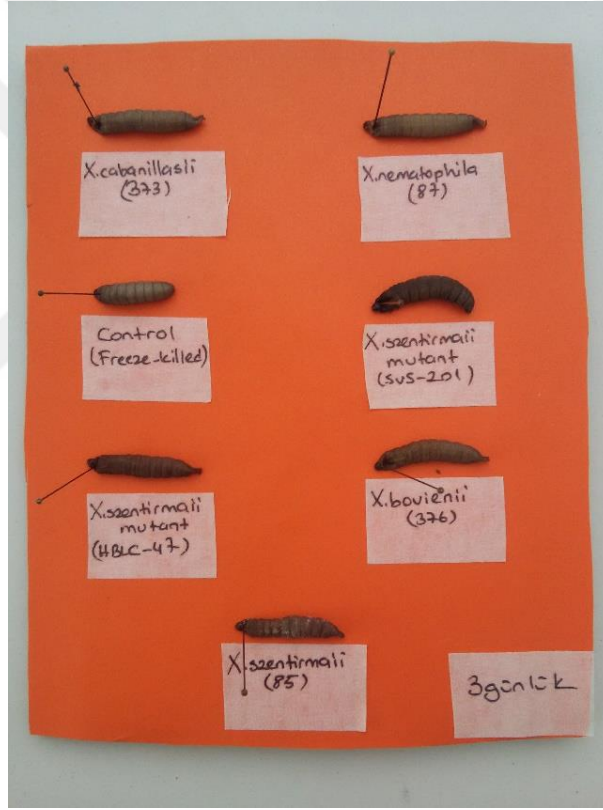
Farklı *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakteri türlerinin SDF aktivitesi *Tapinoma madeirense* (Hymenoptera: Formicidae) türüne ait karıncalar üzerinde test edilmiştir. Çalışmada *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* cinslerine ait 4'er adet yabancı tip ve 2'ser adet mutant bakteri türü kullanılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Karınca deneylerinde kullanılan *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterileri

Bakteri Türü (yabancı tip)	Bakteri Türü (mutant)
<i>Xenorhabdus szentirmaii</i>	<i>Xenorhabdus szentirmaii</i> Δhfq
<i>Xenorhabdus nematophila</i>	<i>Xenorhabdus szentirmaii</i> ΔPPtase
<i>Xenorhabdus bovienii</i>	<i>Photorhabdus luminescens laumondii</i> Δhfq
<i>Xenorhabdus cabanillasii</i>	<i>Photorhabdus luminescens laumondii</i> ΔPPtase
<i>Photorhabdus luminescens laumondii</i>	
<i>Photorhabdus luminescens akhurstii</i>	
<i>Photorhabdus luminescens kayaii</i>	
<i>Photorhabdus thracensis temperata</i>	

Çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Kampüs alanında seçilen *T. madeirense* türüne ait karınca kolonisi ile yapılmıştır. Deneyler 2017 yılının Eylül - Ekim aylarında, 13.00-16.00 saatleri arasında gerçekleştirilmiştir. Deneyler esnasında hava sıcaklığı 25-30°C arasında ölçülmüştür. Bakteri enjekte edilerek enfekte edilmiş *G. mellonella* larvaları deneylerde kullanılmadan önce tartılarak ağırlıkları kaydedilmiştir. Hazırlanan kadvralar karton bir zemin üzerine böcek iğnesi (Austerlitz Insect Pins®) ile iğnelenerek karınca kolonisinin yuva girişine yakın bir yere yerleştirilmiştir (Şekil 3.3). Kontrol grubu olarak -20°C'de 4 saat

süreyle dondurularak öldürülmüş larvalar kullanılmıştır. Karıncaların beslenme davranışları 3 saat boyunca gözlemlenmiştir. Deney sonucunda larvaların ısırılma durumları kontrol edildikten sonra larvalar yeniden tartılmış ve ağırlık kayıplarına bağlı olarak tüketim oranları (%) belirlenmiştir. *Xenorhabdus* türleri ile yapılan deneyler 3 tekerrürlü olarak hazırlanmış ve farklı zamanlarda 3 kez tekrar edilmiş, *Photorhabdus* türleri ile yapılan deneyler ise 2 kez tekrar edilmiştir.



Şekil 3.3. Karınca deneyleri için hazırlanan düzenek.

### 3.4.2. Çekirge Deneyleri

Çalışmada farklı *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* türlerinin SDF aktiviteleri arasında bir fark bulunup bulunmadığı *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera: Gryllidae) türü çekirgeler üzerinde test edilmiştir. Deneylerde kullanılan *G. bimaculatus* türü çekirgeler Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Kampüs alanından toplanmıştır. Toplanan çekirgeler ile oluşturulan laboratuvar kolonileri

kuru köpek maması, dondurulmuş *G. mellonella* larvası, elma ve salatalık kabuğu ile beslenmiş ve koloniler 25°C sıcaklıkta tutulmuştur. Denemeler için 30x20x15 cm ebatlarında kilitli kapaklı 3 adet plastik kap içerisine 10'ar adet çekirge konmuştur. Çekirgeler deneyden önce 2 gün boyunca aç bırakılmıştır. Çizelge 3.3'de verilen bakteri türleriyle enfekte edilerek hazırlanan 3 günlük kadavralar karton zemin üzerine iğnelenmiştir. Her kutu içerisine birer adet enfekte larva ve dondurularak öldürülmüş kontrol grubu yerleştirilerek çekirgelerin beslenme davranışları 3 saat boyunca gözlemlenmiştir (Şekil 3.4). Deney sonunda kısmen de olsa yenen larvalar “tüketildi”, bütünlüğü bozulmayanlar ise “tüketilmedi” olarak kabul edilmiştir. Deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.



Şekil 3.4. Çekirgeler ile kurulan deney düzeneği.

Çizelge 3.3. Çekirge deneylerinde kullanılan bakteri türleri.

<i>Xenorhabdus</i> türleri	<i>Photorhabdus</i> türleri
<i>X. szentirmaii</i>	<i>P. luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i>
<i>X. nematophila</i>	<i>P. luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>
<i>X. ishibashii</i>	<i>P. luminescens</i> subsp. <i>kayaii</i>
<i>X. cabanillasii</i>	<i>P. thracensis</i> subsp. <i>temperata</i>
<i>X. ehlersii</i>	
<i>X. beddingii</i>	
<i>X. indica</i>	
<i>X. miraniensis</i>	
<i>X. doucetiae</i>	
<i>X. ishibashii</i>	

### 3.4.3. Hamamböceği Deneyleri

Çalışmada *Blatta lateralis* (Walker, 1868) türüne ait hamamböcekleri kullanılmıştır. Hamamböcekleri, [www.antalyacekirge.net](http://www.antalyacekirge.net) sitesinden temin edilmiştir. Hamamböcekleri ile oluşturulan koloniler laboratuvarında 30x20x15 ebatlarındaki plastik kutular içerisinde ve karanlık ortamda tutulmuştur. Hamamböceği kolonisi kuru köpek maması ve dondurulmuş *G. mellonella* larvası ile beslenmiştir. Hamamböcekleri deneyden önce 7 gün boyunca aç bırakılmıştır. Bu deneylerde test edilen bakteri türleri Çizelge 3.4’te verilmiştir.

Çizelge 3.4. *Blatta lateralis* türü hamamböceklerine karşı SDF aktivitesi test edilen bakteri türleri.

<i>Xenorhabdus</i> türleri	<i>Photorhabdus</i> türleri
<i>X. innexi</i>	<i>P. luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i>
<i>X. indica</i>	<i>P. luminescens</i> subsp. <i>kayaii</i>
<i>X. poinarii</i>	<i>P. luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>
<i>X. stockiae</i>	<i>P. asymbiotica</i> subsp. <i>australis</i>
<i>X. mauleonii</i>	<i>P. temperata thracensis</i>
<i>X. budapestensis</i>	
<i>X. szentirmaii</i>	
<i>X. cabanillasii</i>	
<i>X. ehlersii</i>	
<i>X. doucetiae</i>	
<i>X. beddingii</i>	
<i>X. bovienii</i>	
<i>X. hominickii</i>	
<i>X. nematophila</i>	
<i>X. ishibashii</i>	

Test edilecek bakteri türü ile hazırlanan 3 günlük enfekte kadavralar strafor veya karton üzerine böcek iğnesi ile iğnelenerek içerisinde birer adet hamamböceğinin bulunduğu şeffaf plastik kutu içerisine konmuştur (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Hamamböcekleri ile kurulan deney düzenekleri.

Deneyden 24 saat sonra kısmen de olsa yenen larvalar “tüketildi”, bütünlüğü bozulmayanlar ise “tüketilmedi” olarak kabul edilmiştir. Kadavraların deney sonundaki tüketim durumları fotoğraflanarak kaydedilmiştir. Her bir bakteri için aynı anda 5'er hamamböceği kullanılmış, denemeler 3 kez tekrarlanmıştır.

#### 3.4.4. Balık Deneyleri

Deneylerde Cyprinidae familyasından omnivor bir balık türü olan *Squalius pursakensis* kullanılmıştır. Balıklar, Düzce'nin Küçük Melen ırmağından elektrikli şoker kullanılarak yakalanmış ve Düzce Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Yrd. Doç. Dr. Barış Gülcü tarafından akvaryumlarda yaşamaya adapte edilmiştir (Şekil 3.6). Deneyler için 50x30x30 ebatlı arındaki her akvaryuma 1 adet balık aktarılmış ve toplamda 10 ayrı akvaryumda testler yürütülmüştür. Çekirge ve hamamböceği deneyleriyle aynı yöntemle hazırlanan *G. mellonella* kadavraları, 2 gün aç bırakılmış balıkların bulunduğu akvaryumlara tek tek atılmış ve balıkların kadavraları yiyip yemedikleri belirlenmiştir. Test edilen bakteri türlerinin listesi Çizelge 3.5.'te verilmiştir.



Şekil 3.6. *Squalius porsakensis* türüne ait balıklar ve hazırlanan deney düzeneklerinden bir bölüm.

Çizelge 3.5. Balık deneylerinde test edilen bakteri türleri.

***Xenorhabdus* türleri**

*X. innexi*  
*X. indica*  
*X. poinarii*  
*X. stockiae*  
*X. mauleonii*  
*X. budapestensis*  
*X. szentirmaii*  
*X. cabanillasii*  
*X. ehlersii*  
*X. doucetiae*  
*X. beddingii*  
*X. bovienii*  
*X. hominickii*  
*X. ishibashii*  
*X. nematophila*  
*X. miraniensis*  
*X. vietnamensis*

***Photorhabdus* türleri**

*P. luminescens* subsp. *laumondii*  
*P. luminescens* subsp. *kayaii*  
*P. luminescens* subsp. *akhurstii*  
*P. asymbiotica* subsp. *australis*  
*P. temperata* subsp. *thracensis*

**3.5. *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* Bakteri Supernatantlarının Önemli Bir Vektör olan *Aedes aegypti*'ye Karşı Etkilerinin Belirlenmesi**

Çalışmanın bu bölümünde, *P. luminescens* subsp. *kayaii*, *X. cabanillasii* ve *X. szentirmaii* türlerine ait bakteri supernatantlarının *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) türüne ait ergin sivrisinekler üzerindeki uzaklaştırıcı, yumurtalar üzerindeki ovisidal ve larvalar üzerindeki larvisidal etkisi araştırılmıştır.

### 3.5.1. Bakteri Supernatantlarının Elde Edilmesi

Bakteriler stok kültürlerden alındıktan sonra, TSB besiyeri içerisine aktarılarak 24 saat boyunca 28°C'de inkübe edilmiştir. Hazırlanan her bir 24 saatlik bakteri kültüründen 100'er µl alınarak 100 ml'lik TSB içeren erlenlere aktarılmıştır. Bakteriler 7 gün boyunca 28°C'de ve 150 rpm'de inkübe edilmiştir. Sıvı besiyeri içerisindeki bakteri kültürleri 20000G'de ve +4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir (Gülcü, 2010). Elde edilen supernatantlar bakteri hücrelerinden tamamen arındırılmak üzere 0,2 µm por çapındaki enjektör ucu membran filtreden (Sartorius Minisart® Syringe Filter) geçirilmiş ve test edilecek supernatantlar elde edilmiştir (Hazır vd., 2018). Elde edilen supernatantlar kullanılana kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.5.2. Sivrisineklerin Üretilmesi

Deneylerde Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Vektör Böcekler Laboratuvarı'nda bulunan *Ae. aegypti* türüne ait sivrisinekler kullanılmıştır. Sivrisinekler yaklaşık 200 bireyden oluşan koloniler halinde, 45x45 cm ebatlarındaki tül kafesler (BugDorm, www.megaview.com.tw) içerisinde üretilmiştir (Şekil 3.7). Ergin sivrisinekler pamuğa emdirilmiş %10'luk şeker çözeltisi ile beslenmiştir (Imam vd., 2014). Dişi sivrisinekler canlı fare *Mus musculus* (Rodentia: Muridae)'tan kan emdirilmek suretiyle haftada bir beslenmiştir. Kan ile beslenen sivrisineklerin yumurtlamaları için buldukları kafese içerisinde kurutma kâğıdı ve su bulunan kaplar yerleştirilmiştir. Açılan yumurtalardan çıkan sivrisinek larvaları toz haline getirilmiş balık yemi ile beslenmiştir. Sivrisinekler 27°C ± 2°C sıcaklık ve %70 ± %5 nem oranında; 14/10 saatlik aydınlık/karanlık periyodunda üretilmiştir (Imam vd., 2014).

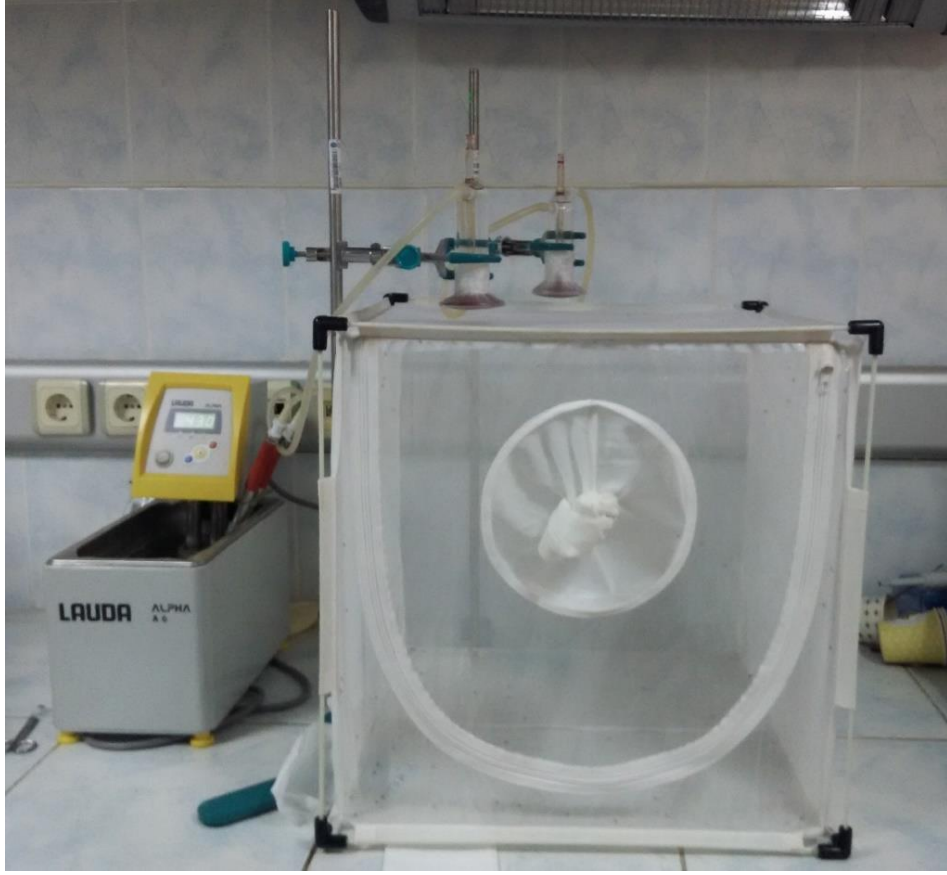




Şekil 3.7. Sivrisineklerin üretilmesinde kullanılan düzenek.

### 3.5.3. Bakteri Supernatantlarının *Aedes aegypti* Erginlerine Karşı Uzaklaştırıcı Etkisinin Araştırılması

Bakteri supernatantlarının sivrisinek erginleri üzerindeki uzaklaştırıcı etkisinin test edilmesi için özel cam sivrisinek besleme aparatları kullanılmıştır (Deng vd., 2014). Cam aparatların alt kısmı parafilm ile sıkıca kaplandıktan sonra her birinin içerisine 15 ml insan kanı eklenmiştir. Deneylede kullanılan kanlar biri kadın, diğeri erkek iki gönüllüden alınmıştır (2017/1113 Protokol nolu Etik Kurul kararı ile). Kan, Adnan Menderes Üniversitesi hastanesinde çalışan uzman kişiler tarafından dirseğin iç tarafındaki toplardamardan alınmıştır. Hazırlanan deney düzeneği sıcak su banyosuna bağlanmış ve 40°C’de çalıştırılarak kanın sıcaklığı yaklaşık 37°C’de sabit tutulmuştur (Kasap vd., 2003). (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Bakteri supernatantlarının *Aedes aegypti* erginlerine karşı uzaklaştırıcı etkisinin test edilmesinde kullanılan deney düzeneği.

Deneyler 45 x 45 cm tül böcek kafesleri içerisinde yürütülmüştür. Her bir kafes içerisine yaklaşık 100 adet 5-9 günlük dişi *Ae. aegypti* aktarılmıştır. Sivrisinek besleme aparatının parafilm ile kaplanan yüzeyine plastik el spreyi ile test edilecek supernatanttan 2 ml püskürtülmüştür. Kontrol grubu olarak kullanılan diğer aparatın yüzeyine ise, aynı miktarda bakteri kültürlerinin üretildiği steril TSB besiyeri uygulanmıştır. Supernatant püskürtülmüş membran aparat, kontrol grubu ile birlikte aynı anda tül kafes üzerine temas edecek şekilde yerleştirildikten sonra, 10 dakika boyunca, her dakika başı düzenekler üzerine konan sinek sayısı sayılarak kaydedilmiştir. Deneyler farklı zamanlarda 3 kez tekrar edilmiştir.

#### 3.5.4. Bakteri Supernatantlarının *Aedes aegypti* Yumurtalarına Karşı Ovisidal Etkisinin Araştırılması

Çalışmanın bu bölümünde *X. szentirmaii*, *X. cabanillasii* ve *P. luminescens* subsp. *kayaii* bakterilerine ait 7 günlük supernatantların, *Ae. aegypti* türüne ait sivrisinek yumurtalarının açılmasına karşı herhangi bir etki gösterip göstermeyeceğini belirlemeye yönelik deneyler yapılmıştır. Çalışmada 4 cm çapında ve 30 ml hacminde, kapaklı şeffaf plastik kaplar kullanılmıştır. Hazırlanacak seyreltme oranları göz önüne alınarak kaplar içerisine önce distile su eklenmiştir. Sağlıklı sivrisinek yumurtaları stereo mikroskop altında seçilerek ince bir fırça yardımıyla toplanmış ve her plastik kap içerisine 20 adet *Ae. aegypti* yumurtası eklenmiştir (Şekil 3.9). Bakteri supernatantları, toplam hacim 20 ml olacak şekilde plastik kaplar içerisine eklenerek istenilen konsantrasyonlar (%5, %10, %20, %30, %40 ve %50) elde edilmiştir. Kontrol grupları deney grupları ile aynı şekilde hazırlanmış, bakteri supernatantı yerine steril TSB besiyeri kullanılmıştır. Yirmi dört ve 48. saatler sonunda açılan ve açılmayan yumurtalar stereo mikroskop altında sayılarak kaydedilmiştir. Test edilen her konsantrasyon için 20'şer yumurta içeren 5 kap (toplam 100 yumurta) kullanılmış, deneyler farklı zamanlarda 3 kez tekrar edilmiştir (Şekil 3.10). Tüm deneyler 28°C'de %70 ± %10 nem oranında yürütülmüştür.



Şekil 3.9. Sağlıklı *Aedes aegypti* yumurtalarının mikroskop altında seçilerek deney yapılacak kaplara aktarılması



Şekil 3.10. Bakteri supernatantlarının *Aedes aegypti* yumurtalarının açılmasına etkisini test etmek amacıyla hazırlanan deney düzeneği

### 3.5.5. Bakteri Supernatantlarının *Aedes aegypti* Larvalarına Karşı Larvisidal Etkinliklerinin Araştırılması

Bakteri supernatantlarının 3. dönem *Ae. aegypti* larvalarına karşı larvisidal bir etkisinin bulunup bulunmadığı 24 gözenekli hücre kültür kapları içerisinde test edilmiştir (Şekil 3.11) (da Silva vd., 2017). *Xenorhabdus szentirmaii*, *X. cabanillasii* ve *P. luminescens* subsp. *kayaii* bakterilerine ait 7 günlük supernatantlar %50, %40, %30, %20, %10 ve %5 oranında olacak şekilde steril distile su ile seyreltilmiştir. Her bir gözeneğe seyreltilen süpernatanttan 1 ml ve bir adet 3. dönem *Ae. aegypti* larvası eklenmiştir. Kontrol grubu olarak aynı oranlarda seyreltilmiş steril TSB besiyeri kullanılmıştır. Deney düzenekleri 28°C'de %70 ( $\pm 10$ ) nem oranında 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Yirmi dört ve 48. saatlerde yapılan kontrollerde, ince bir fırça yardımıyla dokunulduğunda hareket etmeyen larvalar ölü olarak kabul edilmiştir. Her supernatant ve konsantrasyon için 30'ar larva kullanılmış ve deneyler farklı zamanlarda 3 kez tekrar edilmiştir.

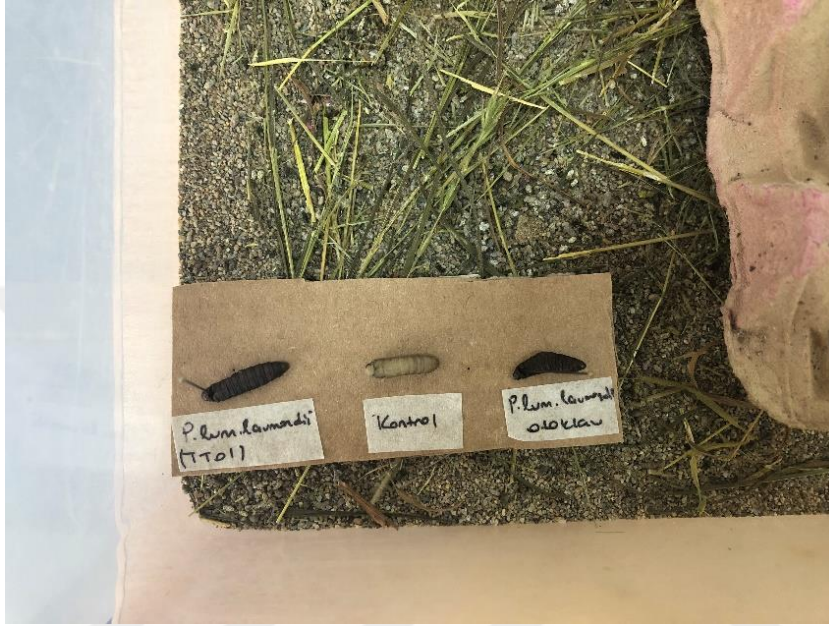


Şekil 3.11. Bakteri supernatantlarının 3. dönem *Aedes aegypti* larvalarına karşı öldürücü etkisini test etmek amacıyla kullanılan 24 gözenekli deney düzeneği.

### 3.6. SDF Maddesinin Yapısını Belirlemeye Yönelik Çalışmalar

#### 3.6.1. SDF'nin Protein Yapıda Olup Olmadığını Belirlemeye Yönelik Deneyler

SDF maddesinin protein yapıda olup olmadığını belirlemek amacıyla SDF aktivitesi gösterdiği bilinen *X. budapestensis*, *X. cabanillasii*, *P. luminescens* subsp. *laumondii* ve *P. temperata* subsp. *thracensis* türlerine ait bakteriler kullanılmıştır. Bu bakteriler ile 3 günlük enfekte *G. mellonella* larvaları hazırlanmıştır. Hazırlanan larvaların yarısı, bakterilerin ürettiği protein yapıdaki bileşikler denatüre etmek amacı ile 121°C'de 20 dakika süreyle otoklavlanmıştır (Zhou vd., 2002). Deneyler çekirgeler, hamamböcekleri ve balıklar ile yürütülmüştür. Çekirgeler ve balıklar deneyden önce 2 gün, hamamböcekleri ise 7 gün boyunca aç bırakılmıştır. Otoklavlanmış, otoklavlanmamış ve dondurularak öldürülmüş larvalar (kontrol) sert karton zemin üzerine böcek iğnesi ile iğnelenerek (Şekil 3.12), içinde 10'ar adet çekirge veya hamamböceğinin bulunduğu inektaryumlar içerisine yerleştirilmiş ve böceklerin beslenme davranışları 3 saat süreyle gözlemlenmiştir. Üzerinde ısırık izleri ve eksilme olan larvalar "tüketildi", ısırık izi ve eksilme gözlenmeyenler ise "tüketilmedi" olarak kabul edilmiştir. Balıklarla yapılan deneylerde ise her birinde bir adet balık bulunan 10 adet akvaryum kullanılmıştır. Kadavralar akvaryumlara tek tek atılmış ve balıkların bunlarla beslenip beslenmediği gözlemlenmiştir. Tüm deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.



Şekil 3.12. SDF maddesinin protein yapıda olup olmadığını belirlemek amacıyla kurulan deney düzeneği

### 3.6.2. SDF'nin Bakterilerde Hangi Gen Bölgesine Bağımlı Olarak Üretildiğinin Belirlenmesi

SDF maddesinin *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterilerinde sekonder metabolit üretiminden sorumlu Hfq veya Pptase gen bölgelerinden hangisine bağımlı olarak üretildiğini belirlemeye yönelik deneyler yürütülmüştür. Bu amaçla *X. szentirmaii* ve *P. luminescens* subsp. *laumondii* TT01 suşlarının ilgili gen bölgeleri susturularak elde edilen  $\Delta hfq$  (SvS-201, SvS-246) ve  $\Delta Pptase$  mutantları (HBLC-47 ve AB-B8) ile yabancıl tiplerinin (Wild-type/WT) SDF aktivitesi çekirgeler üzerinde test edilmiştir. Seçilen bakteri suşları ile 3 günlük enfekte *G. mellonella* larvaları hazırlanmıştır. Aynı bakteri türüne ait yabancıl tip ve mutant suşlarla ( $\Delta hfq$  ve  $\Delta Pptase$ ) enfekte edilmiş larvalar bir arada olacak şekilde sert karton üzerine iğnelenerek (Şekil 3.13) çekirgelerin bulunduğu kaplara yerleştirilmiştir. Deneylerde içerisinde 10'ar adet çekirge bulunan 3 plastik kap kullanılmıştır. Çekirgelerin beslenme davranışları 3 saat boyunca gözlemlenmiştir. Üç saat sonunda, kadavra bütünlüğü bozulacak kadar ısırılmış ve yenmiş ise larva "tüketildi"; kadavra bütünlüğü bozulmayacak şekilde ufak ısırıklar var veya hiç

ısırık izi yok ise “tüketilmedi” olarak kabul edilmiştir. Deneyler farklı zamanlarda 3 kez tekrar edilmiştir.



Şekil 3.13. Karton üzerine iğnelenmiş *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii*'ye ait yabancıl tip (WT) ve mutant bakteriler ile enfekte edilmiş *Galleria mellonella* larvaları.

### 3.6.3. SDF Etkisi Gösteren Maddenin Ne Olduğunun Belirlenmesi

Çalışmanın bu bölümünde *Xenorhabdus* bakterileri tarafından üretilen farklı sekonder metabolitlerden hangisinin SDF aktivitesi gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla deneyler yapılmıştır. Deneylerde SDF aktivitesi güçlü olan *X. szentirmaii* türü kullanılmıştır. Bu bakterinin  $\Delta Hfq$  ve promotor bölgesi değiştirilmiş 12 adet mutant suşu oluşturulmuştur (Bode vd., 2015). İndüklenebilir bir promotor bölgesi eklenmiş olan bu mutant suşlar, içine arabinoz eklenmiş ve eklenmemiş iki farklı TSB ortamında 28°C'de ve 150 rpm'de 3 gün süreyle üretilmiştir. Böylece ilgili sekonder metabolit biyosentez gen bölgeleri aktive edilmiş/edilmemiş; yani bu sekonder metabolitleri üreten ve üretmeyen



bakterilerin supernatantları elde edilmiştir. Dondurularak öldürülüp liyofilize edilmiş *G. mellonella* larvaları bakteri supernatantları içerisinde 30 dakika bekletilmiştir. Hazırlanan bu kadavralar daha sonra sert bir karton üzerine iğne ile sabitlendikten sonra mutant suşların SDF aktivitesi gösterip göstermedikleri siyah çekirgeler *G. bimaculatus* üzerinde test edilmiştir.

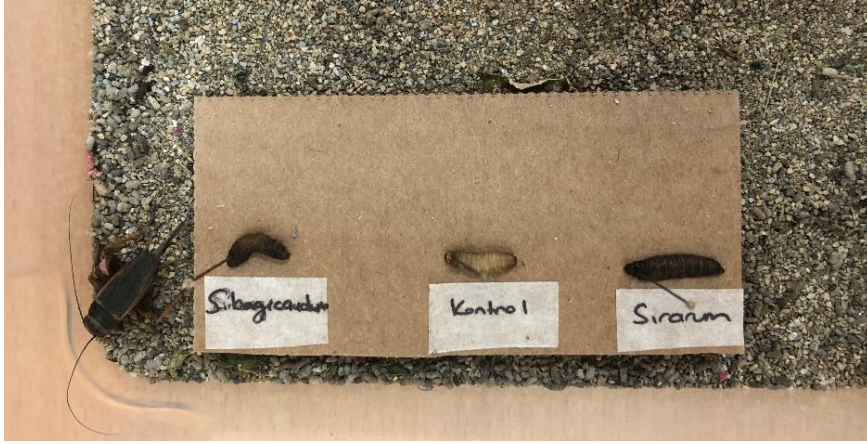
Çizelge 3.6. Deneylerde kullanılan *Xenorhabdus szentirmaii* türüne ait indüklenabilir promotor eklenmiş mutant suşlar.

Promotor bölgesi değiştirilmiş mutant bakterilerde üretimi kontrol altına alınan sekonder metabolitler
<i>Xenorhabdus szentirmaii</i> $\Delta$ hfq mutant (Kontrol)
Dipeptide
Szentiramide
$\Delta$ hfq pCEP-KM-3663
Xenobacteria
$\Delta$ hfq pCEP-KM-0377
Rhabduscin
Rhabdopeptide
Yersinibactin
Xenofuranone
Fabclavine
GameXpeptide
Pyrrrolizixenamid

#### 3.6.4. Doğada Böcek Kadavraları İçerisinde Bulunan Entomopatojen Nematodların Hayatta Kalmasında ve Üremesinde SDF'nin Rolünün Belirlenmesi

Deneylerde, SDF aktivitesi göstermediği belirlenen *X. ehlersii* ve *X. doucetiae* simbiyotik bakterilerini taşıyan *S. longicaudum* ve *S. diaprepesi* türlerine ait EPN'ler kullanılmıştır. İçerisinde iki katlı kurutma kâğıdı bulunan 9 cm'lik cam petrilere içerisine, hazırlanan 1000IJ/ml nematod süspansiyonlarından 1 ml uygulanmıştır. Petrilere 5'er adet son dönem *G. mellonella* larvası eklenmiştir. Larvalar oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 3 gün boyunca inkübe edilmiştir. Simbiyotik bakterisinin SDF ürettiği bilinen *Steinernema rarum* ile enfekte edilmiş larvalar pozitif kontrol olarak; dondurularak öldürülmüş larvalar ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Larvalar karton zemin üzerine böcek iğnesi ile iğnelenerek çekirgelerin ve hamamböceklerinin bulunduğu ortamlara

yerleştirilmiş ve böceklerin beslenme davranışları gözlemlenmiştir. Çekirgeler deneyden önce 2, hamamböcekleri ise 7 gün boyunca aç bırakılmıştır. Böcek deneyleri, içerisinde 10'ar adet çekirge veya hamamböceği bulunan 3'er farklı inektaryumda yürütülmüştür. Balıklarla yapılan deneyler için, içerisinde birer adet balık bulunan 10 ayrı akvaryum kullanılmıştır. Çekirge ve hamamböceği deneyleriyle aynı yöntemle hazırlanan 3 günlük enfekte *G. mellonella* kadvraları, 2 gün aç bırakılmış balıkların bulunduğu akvaryumlara tek tek atılmış ve balıkların kadvraları yeyip yemedikleri belirlenmiştir. Tüm deneyler 3 kez tekrar edilmiştir.



Şekil 3.14. SDF aktivitesi gösteren ve göstermeyen simbiyotik bakterileri taşıyan entomopatojen nematodlar (*Steinernema rarum* ve *Steinernema longicaudum*) ile kurulan deney düzeneği.

### 3.6.5. İstatistiksel Analizler

Farklı bakteri supernatantlarının *Ae. aegypti* sivrisineklerinin yumurtalarına karşı etkinliğinin belirlenmesine yönelik deneylerde ve karınca deneylerinde elde edilen veriler arcsin transformasyonunun ardından Genel Doğrusal Model (GLM) ile analiz edilmiştir. Sivrisinek larvaları ile yapılan deneylerde elde edilen veriler ise hem Abbott (Abbott, 1925) hem de arcsin transformasyonunun ardından GLM ile analiz edilmiştir. Ortalamalar arasındaki farklılıklar Tukey çoklu testine göre değerlendirilmiştir (SPSS, 2013). Supernatantların ergin sivrisineklere karşı repellent etkilerini belirlemede ise veriler G-testi ile analiz edilmiştir (Sokal ve Rholf, 1995). Çekirge, hamamböceği ve balık deneylerinde istatistiksel analiz yapılmamıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Farklı *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* Türleri Arasında SDF Üretimi ve Etkinliği Açısından Farklılık Olup Olmadığının Belirlenmesi

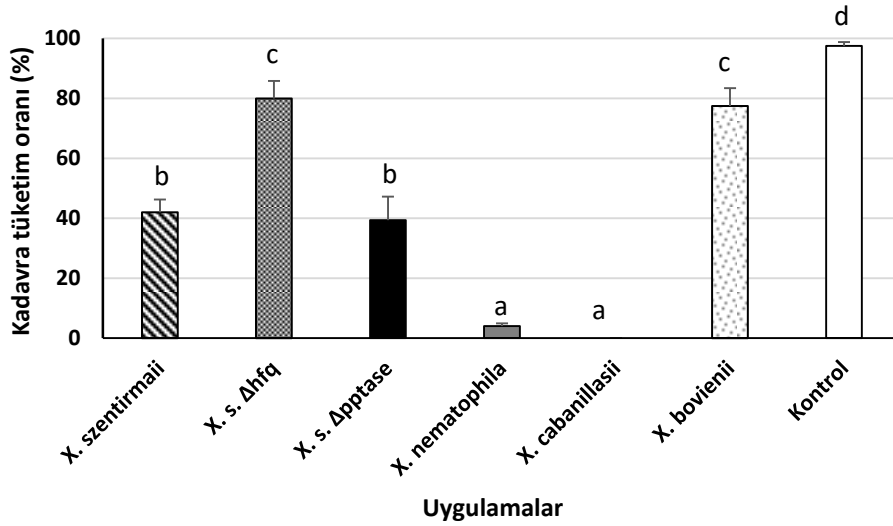
#### 4.1.1. Karınca Deneyleri

Yürütülen çalışmalar sonucunda *Tapinoma madeirense* türüne ait karıncaların, *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterileri tarafından üretilen SDF aktivitesine karşı farklı ölçüde duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir.

Farklı *Xenorhabdus* türlerinin SDF aktivitesini belirlemek amacı ile yapılan deneylerde, karıncalar kontrol grubundan sonra en fazla, *X. szentirmaii*  $\Delta$ hfq mutanlığı ile enfekte larvalarla beslenmişlerdir (%80). Diğer yandan, karıncalar *X. nematophila* ile enfekte edilen larvalardan ufak ısırlıklar aldıktan sonra beslenmeyi bırakmışlardır. Bu gruptaki larvalarda ortalama ağırlık kaybı %4 ile sınırlı kalmıştır. Karıncalar, *X. cabanillasii* ile enfekte edilmiş *G. mellonella* larvalarıyla ise beslenmemişlerdir (Şekil 4.1). Deney sonunda larvalar mikroskop altında incelenmiş ve üzerlerinde herhangi bir ısırlık izine de rastlanmamıştır. Elde edilen veriler Genel Doğrusal Model ile test edilmiş ve larvaların tüketim oranları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $F=41.381$ ;  $df=6$ ;  $P<0.05$ ) (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Farklı *Xenorhabdus* türleri ile enfekte edilmiş *Galleria mellonella* larvalarının *Tapinoma madeirense* türüne ait karıncalar tarafından tüketilmesi.

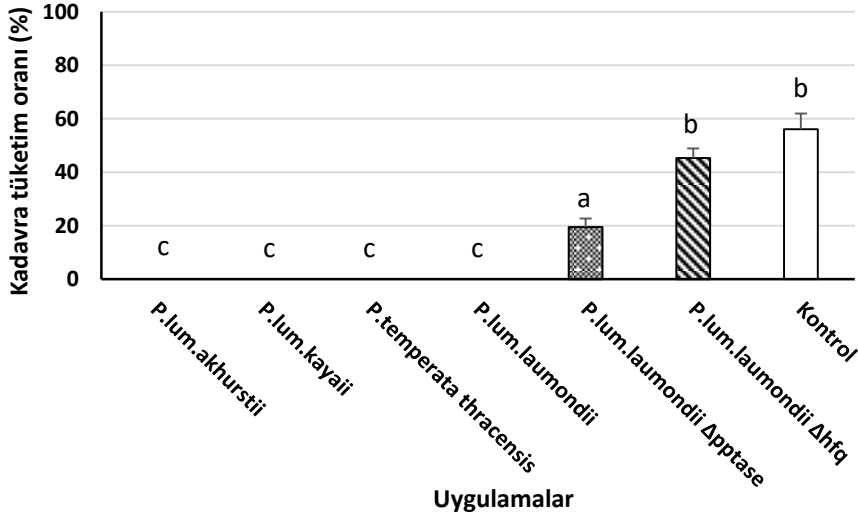


Şekil 4.2. Farklı *Xenorhabdus* türleriyle enfekte *Galleria mellonella* larvalarının *Tapinoma madeirense* türüne ait karıncalar tarafından tüketim oranı (%).

*Photorhabdus* türlerine ait yabancı tip bakterilerin ürettiği metabolitlerin deneyde kullanılan karınca türüne karşı yüksek SDF aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Deney sonunda *P.luminescens* subsp. *laumondii*, *P.luminescens* subsp. *kayarii*, *P.luminescens* subsp. *akhurstii* ve *P. temperata* subsp. *thracensis* ile enfekte larvaların karıncalar tarafından hiç tüketilmediği görülmüştür (Şekil 4.3). Larvalar mikroskop altında incelendiğinde üzerlerinde herhangi bir ısırık izine rastlanmamıştır. Ancak, *P. luminescens* subsp. *laumondii* türünün  $\Delta hfq$  (Svs-246) ve  $\Delta ptase$  (AB-B8) mutantları ise karıncalar tarafından tüketilmeleri sonucunda, sırasıyla %45 ve %19 oranında ağırlık kaybına uğramışlardır. *Photorhabdus* türleriyle enfekte larvaların tüketim oranları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $F=56.654$ ,  $df=6$ ,  $P<0.05$ ) (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. Farklı *Photorhabdus* türleri ile enfekte edilmiş *Galleria mellonella* larvalarının *Tapinoma madeirense* türüne ait karıncalar tarafından tüketilmesi.



Şekil 4.4. Farklı *Photorhabdus* türleriyle 3 günlük enfekte *Galleria mellonella* larvalarının *Tapinoma madeirense* türüne ait karıncalar tarafından tüketim oranı.

#### 4.1.2. Çekirge Deneyleri

*Gryllus bimaculatus* türü çekirgeler farklı bakteri türleri ile enfekte olan kadvralara farklı tepkiler vermiştir. *Photorhabdus* türleri ile enfekte edilmiş kadvraların hiçbirisi çekirgeler tarafından tüketilmemiştir. Kadvralar mikroskop altında incelendiğinde üzerlerinde herhangi bir ısırık izine de rastlanmamıştır. *Xenorhabdus* türleri ile yapılan deneylerde ise türlere göre değişen sonuçlar elde edilmiştir. Çekirgeler *X. cabanillasii*, *X. nematophila*, *X. szentirmaii*, *X. indica* ve *X. miraniensis* türleri ile enfekte kadvraları yememiştir. Ancak, *X. ishibashii*, *X. ehlersii*, *X. doucetiae* ve *X. beddingii* ile enfekte olan larvalar kadavra bütünlükleri bozulacak derecede tüketilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Farklı bakteri türleri ile enfekte *Galleria mellonella* larvalarının *Gryllus bimaculatus* türüne ait çekirgeler tarafından tüketim durumu.

Kullanılan Bakteri	Tüketim Durumu (+): Tüketilen; (-): Tüketilmeyen
<i>Xenorhabdus szentirmaii</i>	-
<i>Xenorhabdus nematophila</i>	-
<i>Xenorhabdus ishibashii</i>	+
<i>Xenorhabdus cabanillasii</i>	-
<i>Xenorhabdus ehlersii</i>	+
<i>Xenorhabdus beddingii</i>	+
<i>Xenorhabdus indica</i>	-
<i>Xenorhabdus miraniensis</i>	-
<i>Xenorhabdus doucetiae</i>	+
<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i>	-
<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	-
<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>kayaii</i>	-
<i>Photorhabdus thracensis</i> subsp. <i>temperata</i>	-

#### 4.1.3. Hamamböceği Deneyleleri

Yapılan deneyler sonucunda, hamamböceklerinin test edilen 3 farklı *Photorhabdus* türü ile enfekte edilmiş larvaların hiçbirisini tüketmediği gözlenmiştir. Bu larvalar mikroskop altında incelendiğinde üzerlerinde herhangi bir ısırık izine de rastlanmamıştır. Hamamböcekleri yalnızca *X. beddingii*, *X. doucetiae*, *X. ishibashii* ve *X. ehlersii* türleri ile enfekte larvaları tüketmiştir. Test edilen diğer bakteri türleri ile enfekte edilmiş larvaları ise tüketmemişlerdir. Bu veriler doğrultusunda, bu dört bakteri türünün *B. lateralis* türüne ait hamamböceklerine karşı SDF aktivitesi göstermediği belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Farklı bakteri türleri ile enfekte *Galleria mellonella* larvalarının *Blatta lateralis* türüne ait hamamböcekleri tarafından tüketim durumu.

Kullanılan Bakteri	Tüketim Durumu (+): Tüketilen; (-): Tüketilmeyen
<i>Xenorhabdus innexi</i>	-
<i>Xenorhabdus indica</i>	-
<i>Xenorhabdus poinarii</i>	-
<i>Xenorhabdus stockiae</i>	-
<i>Xenorhabdus mauleonii</i>	-
<i>Xenorhabdus budapestensis</i>	-
<i>Xenorhabdus szentirmaii</i>	-
<i>Xenorhabdus cabanillasii</i>	-
<i>Xenorhabdus ehlersii</i>	+
<i>Xenorhabdus doucetiae</i>	+
<i>Xenorhabdus beddingii</i>	+
<i>Xenorhabdus bovienii</i>	-
<i>Xenorhabdus hominickii</i>	-
<i>Xenorhabdus nematophila</i>	-
<i>Xenorhabdus ishibashii</i>	+
<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i>	-
<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>kayaii</i>	-
<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	-
<i>Photorhabdus asymbiotica</i> subsp. <i>australis</i>	-
<i>Photorhabdus temperata</i> subsp. <i>thracensis</i>	-

#### 4.1.4. Balık Deneyleri

*Squalius pursakensis* türüne ait balıkların, farklı *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* türlerine ait bakteriler ile enfekte edilmiş larvalara farklı tepkiler verdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Balıklar, *Photorhabdus* bakterileri ile enfekte edilmiş larvaların hiçbirisini tüketmemiştir. *Xenorhabdus* bakteri ile enfekte edilmiş olanlardan ise sadece *X. beddingii*, *X. ehlersii*, *X. ishibashi* ve *X. doucetiae* ile enfekte edilmiş larvalar ile beslenmişlerdir. Balıklar su içerisine atılan larvaları önce ağızlarına almış tadına baktıktan sonra beğenmediklerini geri çıkarmış, beğendiklerini ise tamamen yemiştirlerdir.



Çizelge 4.3. Balık deneylerinde elde edilen sonuçlar

Test Edilen Bakteriler	Tüketim Durumu (+): Tüketilen; (-): Tüketilmeyen
<i>X. innexi</i>	-
<i>X. indica</i>	-
<i>X. poinarii</i>	-
<i>X. stockiae</i>	-
<i>X. mauleonii</i>	-
<i>X. budapestensis</i>	-
<i>X. szentirmaii</i>	-
<i>X. cabanillasii</i>	-
<i>X. ehlersii</i>	+
<i>X. doucetiae</i>	+
<i>X. beddingii</i>	+
<i>X. bovienii</i>	-
<i>X. hominickii</i>	-
<i>X. ishibashii</i>	+
<i>X. nematophila</i>	-
<i>X. miraniensis</i>	-
<i>X. vietnamensis</i>	-
<i>P. luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i>	-
<i>P. luminescens</i> subsp. <i>kayaii</i>	-
<i>P. luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	-
<i>P. asymbiotica</i> subsp. <i>australis</i>	-
<i>P. temperata</i> subsp. <i>thracensis</i>	-

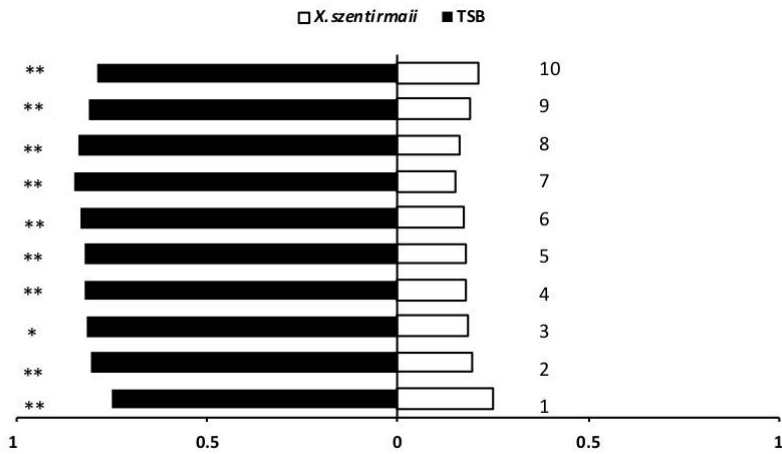
## 4.2. *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* Bakteri Supernatantlarının Önemli Bir Vektör olan *Aedes aegypti*'ye Karşı Etkilerinin Belirlenmesi

### 4.2.1. Bakteri Supernatantlarının *Aedes aegypti* Erginlerine Karşı Uzaklaştırıcı Etkisinin Araştırılması

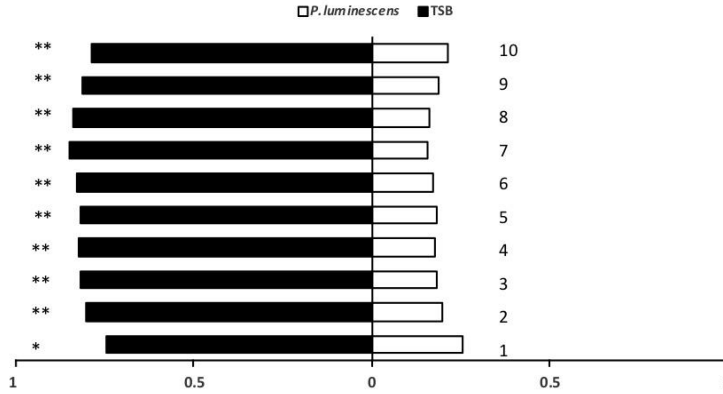
Deneylerden elde edilen veriler doğrultusunda *Xenorhabdus szentirmaii* ve *Photorhabdus luminescens* subsp. *kayaii* bakterilerine ait supernatantlarının test süresince *Ae. aegypti* dişilerine karşı uzaklaştırıcı etki gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.5). Dişi sinekler kan emmek için üzerine TSB besiyeri püskürtülmüş olan membranı tercih etmişlerdir (Şekil 4.6; Şekil 4.7). Veriler replicated goodness-of-fit testi (G-test) ile analiz edilmiş ve bakteri supernatantları ile kontrol grubuna (TSB) yönelim arasındaki farkın sayımların alındığı her dakika için istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.5. *Xenorhabdus szentirmaii* supernatantı (sol) ve TSB (sağ) püskürtülmüş kan emme düzeneklerine gelen *Aedes aegypti* dişileri.

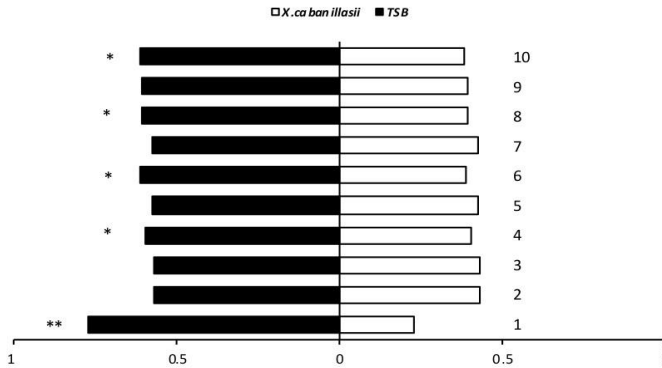


Şekil 4.6. *Xenorhabdus szentirmaii* supernatantı ve steril TSB püskürtülmüş düzeneklere 10 dakika boyunca gelen ortalama dişi sivrisinek sayıları (1'den 10'a kadar numaralar her bir dakikayı ifade etmektedir) ( $P < 0.05 = *$ ,  $P < 0.01 = **$ ).



Şekil 4.7. *Photorhabdus luminescens* supernatantı ve steril TSB püskürtülmüş düzeneklere 10 dakika boyunca gelen ortalama dişi sivrisinek sayıları (1'den 10'a kadar numaralar her bir dakikayı ifade etmektedir) ( $P < 0.05 = *$ ,  $P < 0.01 = **$ ).

*Xenorhabdus cabanillasii* süpernatantı uygulanmış olan membranda sayımların yapıldığı 1, 4, 8 ve 10. dakikalarda istatistiksel olarak daha az sayıda sivrisinek kan emmiştir. Diğer dakikalarda da sayısal olarak daha fazla sinek kontrol grubundan kan emmeyi tercih etmiş ancak aradaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. *Xenorhabdus cabanillasii* süpernatantı ve steril TSB püskürtülmüş düzeneklere 10 dakika boyunca gelen ortalama dişi sivrisinek sayıları (1'den 10'a kadar numaralar her bir dakikayı ifade etmektedir) ( $P < 0.05 = *$ ,  $P < 0.01 = **$ ).

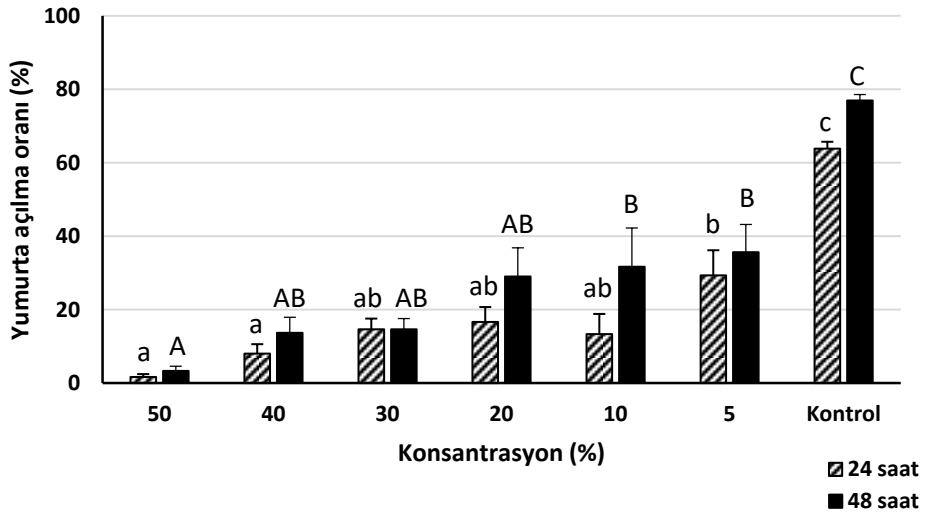
Bakteri süpernatantları uygulanmış membralara kan emmek için gelen sivrisinek sayıları G-testi ile analiz edilerek sonuçlar bir çizelge şeklinde sunulmuştur (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Bakteri süpernatantı püskürtülmüş düzeneklere gelen sinek sayılarının G testi ile değerlendirilmesi

Dakika		<i>X.szentimaii</i>			<i>X.cabanillasii</i>			<i>P.luminescens</i>		
		df	G-statistics	P	df	G-statistics	P	df	G-statistics	P
1	G <sub>H</sub>	2	2,46	0,291	2	1,15	0,562	2	0,60	0,740
	G <sub>P</sub>	1	20,26	0,000	1	16,77	0,000	1	21,17	0,000
	G <sub>T</sub>	3	22,72	0,000	3	17,93	0,000	3	21,77	0,000
2	G <sub>H</sub>	2	0,63	0,729	2	5,83	0,054	2	0,25	0,881
	G <sub>P</sub>	1	14,61	0,000	1	1,64	0,200	1	37,56	0,000
	G <sub>T</sub>	3	15,24	0,002	3	7,47	0,058	3	37,82	0,000
3	G <sub>H</sub>	2	2,82	0,244	2	0,79	0,673	2	0,77	0,679
	G <sub>P</sub>	1	6,30	0,012	1	2,11	0,146	1	40,46	0,000
	G <sub>T</sub>	3	9,12	0,028	3	2,90	0,407	3	41,24	0,000
4	G <sub>H</sub>	2	4,56	0,102	2	0,80	0,671	2	0,51	0,776
	G <sub>P</sub>	1	9,07	0,003	1	4,35	0,037	1	40,53	0,000
	G <sub>T</sub>	3	13,63	0,003	3	5,15	0,161	3	41,03	0,000
5	G <sub>H</sub>	2	3,87	0,144	2	0,32	0,852	2	0,73	0,693
	G <sub>P</sub>	1	7,29	0,007	1	2,24	0,135	1	43,36	0,000
	G <sub>T</sub>	3	11,16	0,011	3	2,56	0,465	3	44,10	0,000
6	G <sub>H</sub>	2	0,10	0,953	2	0,35	0,837	2	0,73	0,695
	G <sub>P</sub>	1	16,51	0,000	1	4,28	0,038	1	46,44	0,000
	G <sub>T</sub>	3	16,60	0,001	3	4,64	0,200	3	47,17	0,000
7	G <sub>H</sub>	2	3,10	0,212	2	0,43	0,808	2	0,81	0,667
	G <sub>P</sub>	1	8,49	0,004	1	2,14	0,144	1	48,02	0,000
	G <sub>T</sub>	3	11,60	0,009	3	2,57	0,463	3	48,82	0,000
8	G <sub>H</sub>	2	0,89	0,640	2	2,77	0,251	2	0,99	0,611
	G <sub>P</sub>	1	7,71	0,005	1	4,18	0,041	1	42,81	0,000
	G <sub>T</sub>	3	8,60	0,035	3	6,95	0,074	3	43,79	0,000
9	G <sub>H</sub>	2	0,13	0,939	2	0,92	0,631	2	0,13	0,938
	G <sub>P</sub>	1	12,20	0,000	1	3,59	0,058	1	37,54	0,000
	G <sub>T</sub>	3	12,32	0,006	3	4,51	0,211	3	37,66	0,000
10	G <sub>H</sub>	2	0,55	0,760	2	0,08	0,960	2	0,13	0,936
	G <sub>P</sub>	1	18,71	0,000	1	4,19	0,041	1	29,16	0,000
	G <sub>T</sub>	3	19,26	0,000	3	4,27	0,233	3	29,29	0,000

#### 4.2.2. Bakteri Supernatantlarının *Aedes aegypti* Yumurtalarına Karşı Ovisidal Etkisinin Araştırılması

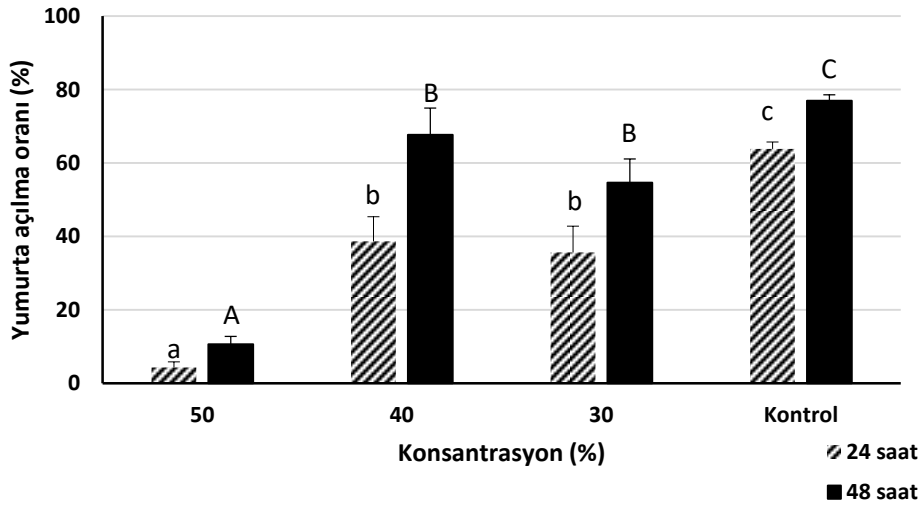
Deneyler sonucunda *X. cabanillasii* supernatantının *Aedes aegypti* yumurtalarının açılmasını büyük oranda engellediği belirlenmiştir. En yüksek ovisidal etki %50'lik seyreltmede elde edilmiştir. Bu seyreltmede 48. saat sonunda yumurta açılma oranı %3 ile sınırlı kalmıştır. Oysa kontrol grubundaki yumurtaların %79'u başarıyla açılmıştır. Deneylerin 48. saati sonunda %40, %30 ve %20'lik konsantrasyonların ovisidal etkisi arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark bulunmamıştır. En yüksek yumurta açılma oranı 48. saat sonunda %35'lik oran ile %5'lik konsantrasyonda gözlemlenmiştir. Uygulanan tüm süpernatant konsantrasyonları ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $F=12.378$ ;  $df=6$ ,  $P<0.05$ ) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlardaki *Xenorhabdus cabanillasii* supernatantlarının *Aedes aegypti* yumurtalarının açılmasına etkisi.

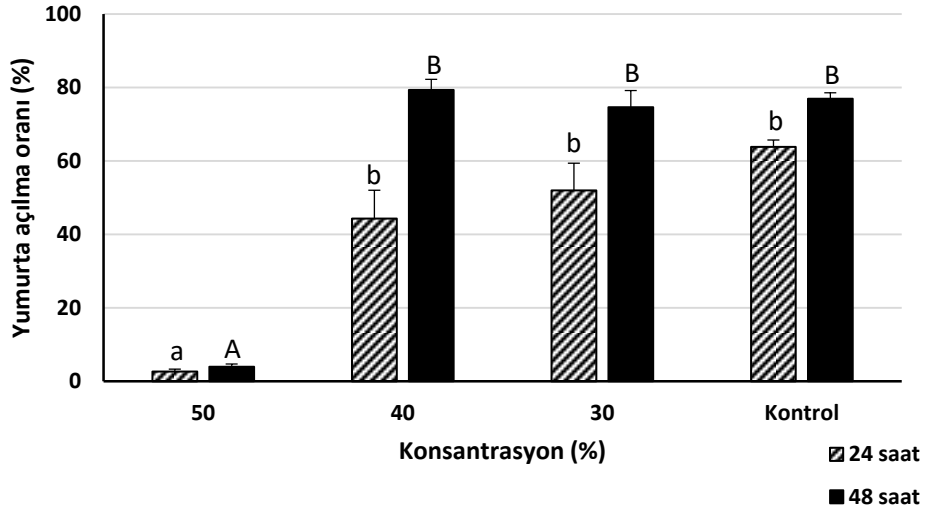
*Xenorhabdus szentirmaii* ve *P. luminescens* türlerine ait supernatantların %30'luk konsantrasyonlarında 48. saat sonunda yumurta açılma oranları %50'nin üzerinde olduğu için bu iki bakteri türü için daha düşük konsantrasyonların etkisi test edilmemiştir.

*Xenorhabdus szentirmaii* ile yapılan deneylerde en yüksek ovisidal etki %50'lik konsantrasyonda elde edilmiştir. Bu konsantrasyonda 24. saat sonunda yumurtaların %4,ü; 48. saat sonunda ise %11'i açılmıştır. Yumurtaların açılması üzerinde %40 ve %30'luk konsantrasyonlar arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Tüm gruplar ile kontrol grubu arasındaki fark ise istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $F=20.890$ ;  $df=3$ ,  $P<0.05$ ) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonlardaki *Xenorhabdus szentirmaii* supernatantlarının *Aedes aegypti* yumurtalarının açılmasına etkisi.

*Photorhabdus luminescens* ile yapılan deneylerde %50'lik konsantrasyonda 48 saat sonunda yumurtaların sadece %4'ü açılmıştır. Bu değerler kontrol grubu (%78'lik açılma oranı) ile kıyaslandığında aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $F=20.277$ ;  $df=3$ ,  $P<0.05$ ). Ancak, %40 ve %30'luk konsantrasyonlarda 48. saat sonunda yumurtaların sırasıyla %79 ve %75'i açılmıştır. Bu iki konsantrasyon grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark bulunmamıştır ( $P>0.05$ ) (Şekil 4.11).

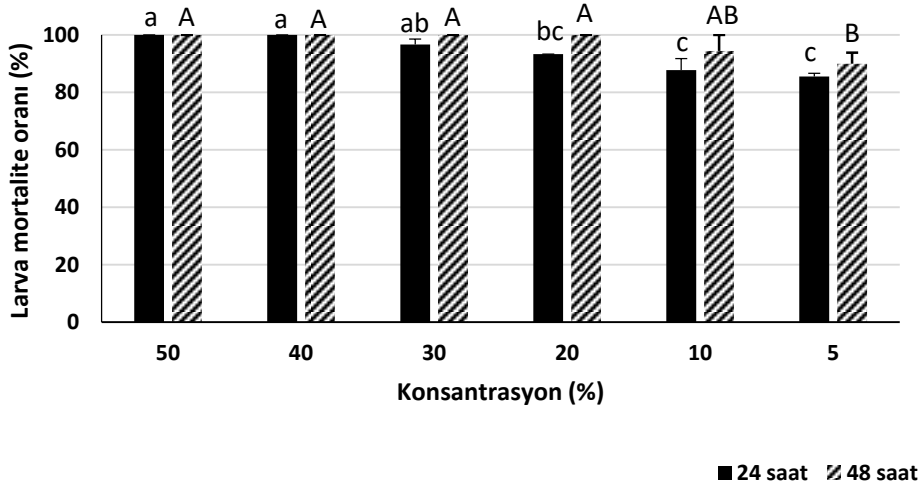


Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlardaki *Photorhabdus luminescens* supernatantlarının *Aedes aegypti* yumurtalarının açılmasına etkisi.

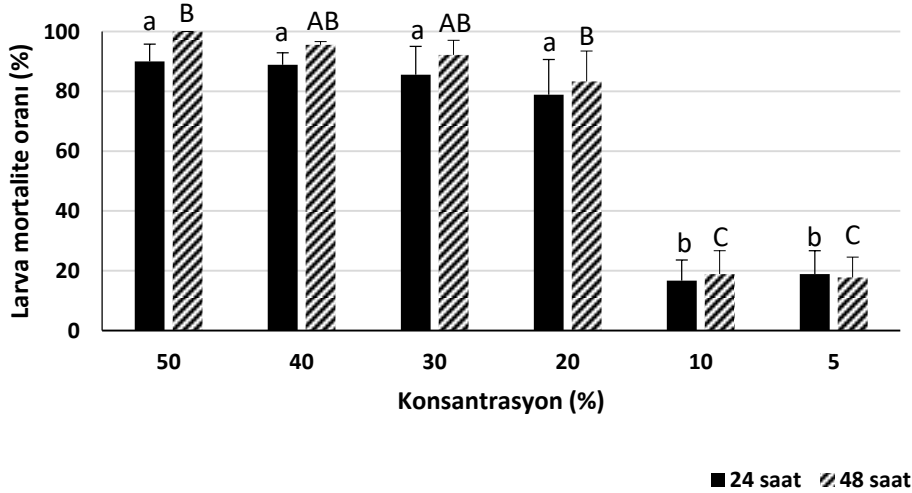
#### 4.2.3. Bakteri Supernatantlarının *Aedes aegypti* Larvalarına Karşı Larvisidal Etkinliklerinin Araştırılması

Yapılan deneyler sonucunda *Ae. aegypti* larvalarına karşı en etkili bakteri türü *Xenorhabdus cabanillasii* olarak bulunmuştur. *X. cabanillasii* %50, %40, %30 ve %20'lik konsantrasyonlarda 48 saat sonunda %100 oranında larval mortaliteye sebep olmuştur (Şekil 4.12). *Xenorhabdus szentirmaii*'nin %50 oranında seyreltilmiş supernatantları ise 24 ve 48. saatler sonunda sırasıyla %90 ve %100 oranında ölüm meydana getirmiştir (Şekil 4.13). *Photorhabdus luminescens* bakterisinin %50 oranında seyreltilmiş supernatantının uygulandığı larvalarda ise mortalite 24. saat sonunda %10, 48. saat sonunda ise %17'de kalmıştır. *Xenorhabdus szentirmaii* %40, %30 ve %20'lik konsantrasyonlarda 48 saat sonunda sırasıyla %95, %92 ve %83 oranında larval mortalite meydana getirmiştir. *Photorhabdus luminescens* %40 ve %30'luk konsantrasyonlarda 48 saat sonunda sadece %3 oranında ölüme sebep olmuştur. Bu oran %20'lik süpernatant konsantrasyonu bulunan kaplarda %2'ye düşmüş; %10 ve %5'lik konsantrasyonlarda ise *P. luminescens* herhangi bir mortaliteye sebep olmamıştır (Şekil 4.14). *Xenorhabdus szentirmaii* %10'luk ve %5'lik konsantrasyonlarda 48

saat sonunda sırasıyla %18 ve %17 oranında mortaliteye sebep olurken; *X. cabanillasii* ise %94 ve %90 oranlarında mortalite göstermiştir.

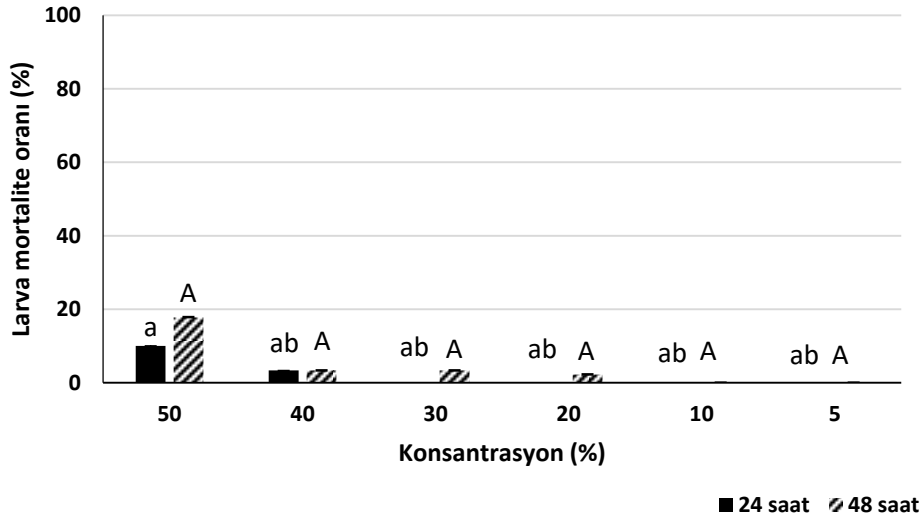


Şekil 4.12. *Xenorhabdus cabanillasii* supernatantının test edilen konsantrasyonlarda *Aedes aegypti* larvalarına karşı etkinliği.



Şekil 4.13. *Xenorhabdus szentirmaii* supernatantının test edilen konsantrasyonlarda *Aedes aegypti* larvalarına karşı etkinliği.





Şekil 4.14. *Photorhabdus luminescens* supernatantının test edilen konsantrasyonlarda *Aedes aegypti* larvalarına karşı etkinliği.

### 4.3. SDF Maddesinin Yapısını Belirlemeye Yönelik Çalışmalar

#### 4.3.1. SDF'nin Protein Yapıda Olup Olmadığını Belirlemeye Yönelik Deneyler

Yapılan deneyler sonucunda SDF maddesinin sıcaklık ile muamele edilmesi sonucu aktivitesini kaybetmediği belirlenmiştir. Yağmacılar *X. budapestensis*, *X. cabanillasii* ve *P. luminescens* subsp. *laumondii* ve *P. temperata* subsp. *thracensis* bakterileriyle enfekte edilmiş otoklavlanmamış ve otoklavlanmış larvaların hiçbirisini tüketmemişlerdir (Şekil 4.15). Bunun bir sonucu olarak SDF maddesinin protein yapıda bir madde olmadığı belirlenmiştir.



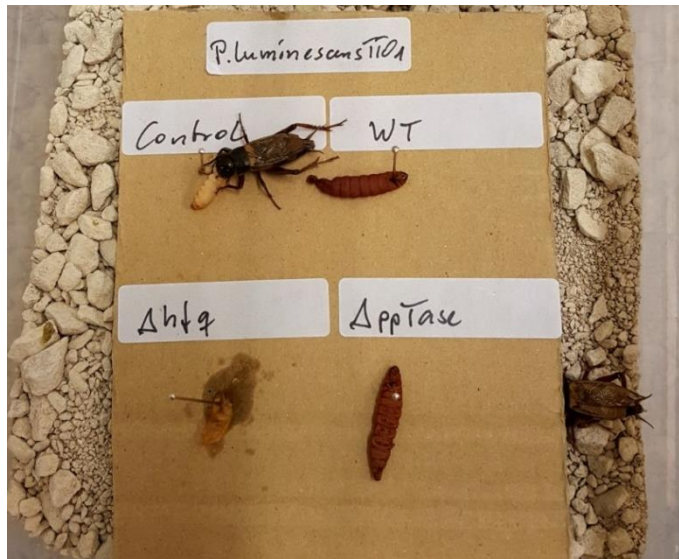
Şekil 4.15. Otoklavlanmış ve otoklavlanmamış enfekte kadavraların deney sonunda tüketilme durumları.

#### 4.3.2. SDF'nin Bakterilerde Hangi Gen Bölgesine Bağımlı Olarak Üretildiğini Belirlemeye Yönelik Deneyler

Yapılan deneyler sonucunda çekirgeler, *P. luminescens* subsp. *laumondii* TT01 suşu ve *X. szentirmaii* bakterilerine ait  $\Delta$ hfq mutanı ile enfekte edilmiş larvalar ile beslenmiştir (Şekil 4.16 ve 4.17). *P. luminescens laumondii* ve *X. szentirmaii* yabancıl tip ve  $\Delta$ Pptase mutanı ile enfekte edilen larvalar ise çekirgeler tarafından tüketilmemiştir. Hfq kodlayan gen bölgesinin ortadan kaldırılmasıyla elde edilen  $\Delta$ hfq mutantının tüketilmesi sonucunda *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* cinsi bakterilerde SDF aktivitesi gösteren maddenin Hfq gen bölgesi bağımlı olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.16. *Xenorhabdus szentirmaii* bakterisinin yabancı tip ve mutant suşları ile enfekte edilmiş *Galleria mellonella* larvalarının çekirgeler tarafından tüketilmesi.



Şekil 4.17. Çekirgelerin *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* TT01 suşuna ait farklı mutantlar ve yabancı tipe enfekte kadavralara verdikleri tepkiler.

### 4.3.3. SDF Etkisi Gösteren Maddenin Ne Olduğunun Belirlenmesi

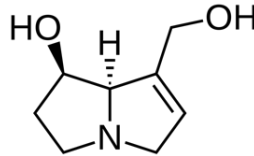
Test edilen tüm *Photorhabdus* türleri her üç yağmacı organizmada (çekirge, balık ve hamamböceği) SDF aktivitesi göstermiştir. Ancak bu durum *Xenorhabdus* türlerinde farklı bulunmuştur. SDF aktivitesi gösteren *Xenorhabdus* türleri; *X. bovienii*, *X. poinarii*, *X. cabanillasii*, *X. nematophila*, *X. szentirmaii*, *X. mauelonii*, *X. innexi*, *X. stockiae*, *X. vietnamensis*, *X. hominickii*, *X. miraniensis*, *X. indica* ve *X. budapestensis*; SDF aktivitesi göstermeyen türlerin ise *X. doucetiae*, *X. ehlersii*, *X. beddingii* ve *X. ishibashii* türleri oldukları belirlenmiştir.

SDF maddesinin ne olduğunu bulmak için *Xenorhabdus* cinsine ait 17, *Photorhabdus* cinsine ait ise 3 farklı türün (*P. luminescens* türünün üç ayrı alttürü, *kayaii*, *akhurstii* ve *laumondii*) yani toplamda 20 farklı bakterinin SDF aktivitesi gösterip göstermediği farklı yağmacılara karşı test edildikten sonra, bu deneylerden elde edilen veriler bir tablo haline getirilerek farklı *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* türlerinin ürettiği sekonder metabolit listesiyle (Çizelge 4.5) karşılaştırılmıştır (Tobias vd., 2017). SDF aktivitesi gösteren *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* türlerinin ürettikleri sekonder metabolitler Çizelge 4.5 üzerinde işaretlenmiştir. Buna göre *X. nematophila* türü hariç tüm SDF aktivitesi gösteren *Xenorhabdus* türü bakterilerin Pyrrolizidin alkaloid (Şekil 4.18) ürettiği; SDF aktivitesi göstermeyen bakterilerin hiç birisinin ise ortak nokta olarak bu maddeyi üretmediği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5. *Gryllus bimaculatus*, *Blatta lateralis* ve *Squalius porsakensis* yağmacılarının farklı *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* türleri tarafından enfekte edilen *Galleria mellonella* kadvralarına verdikleri tepkiler.

Ambactin	Antraquinone	Cyclohexanediones	GameXPeptide	Xenotetrapeptide	Glibobactin	Fabclavine	Kolossin	PAX peptide	Photopyrone	Phurealipid	Pyrrrolizidine alkaloid	Rhabdopeptide	Rhabduscin	Tilvaline	Xeroimpeptide	Xenematide	Xenoamicin	Xenocoumacin	Xenocyloln	Xenorhabdinin	Xenortide	Lumizininone	Phentivietylamide	Szentiamide	Taxillaid	Tyvaltamide	Xenofuranone	Xenotrivalpeptide	SDF aktivitesi ( <i>G. bimaculatus</i> )	SDF Aktivitesi ( <i>B. lateralis</i> )	SDF aktivitesi ( <i>S. porsakensis</i> )	
																																<i>P. asym. subsp. australis</i> DSM 17609
																																<i>P. temperata subsp. thracensis</i>
																																<i>P. lum. subsp. laumondii</i> TTO1
																																<i>X. budapestensis</i> DSM 16342
																																<i>X. cabanillasii</i> JM26
																																<i>X. innexi</i> DSM 16336
																																<i>X. stockiae</i> DSM 17904
																																<i>X. bovienii</i> SS-2004
																																<i>X. hominickii</i> DSM 17903
																																<i>X. nematophila</i> ATCC 19061
																																<i>X. mauleonii</i> DSM 17908
																																<i>X. szentirmaii</i> US
																																<i>X. szentirmaii</i> DSM 16338
																																<i>X. miraniensis</i> DSM 17902
																																<i>X. poinarii</i> G6
																																<i>X. vietnamensis</i> DSM 22392
																																<i>X. doucetiae</i> FRM16
																																<i>X. ehlersii</i> DSM 16337
																																<i>X. ishibashii</i> DSM 22670
																																<i>X. beddingii</i> DSM 4764

Elde edilen sonuçlar *Xenorhabdus*'larda SDF maddesinin büyük bir olasılıkla **Pyrrrolizidine alkaloid** (Şekil 4.18) olabileceğini, buna en yakın olasılığın ise Rhabdopeptide olduğunu göstermiştir.

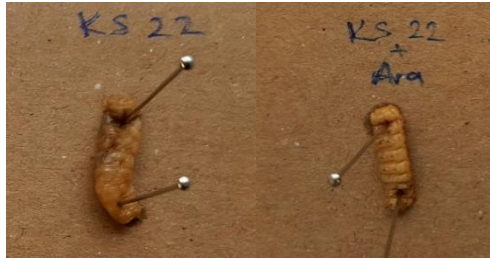


Şekil 4.18. Bir pyrrrolizidin alkaloid molekülünün genel kimyasal yapısı.

Promotor bölgesi değiştirilmiş mutantlar ile yapılan deneyler sonucunda çekirgelerin sadece pyrrrolizixenamid isimli sekonder metaboliti üreten (KS 22 + Arabinoz) supernatantında bekletilmiş kadvraları yemedikleri tespit edilmiştir (Çizelge 4.6) (Şekil 4.19).

Çizelge 4.6. *Xenorhabdus szentirmaii* türüne ait farklı gen bölgelerinde indüklenebilir promotor değişikliği yapılmış mutantlarla üretimi kontrol edilen maddeler ve çekirgelerin bunlara verdiği tepkiler.

Promotor bölgesi değiştirilmiş mutant bakterilerde üretimi kontrol altına alınan metabolitler	Çekirgelerin tepkisi (+): Tüketilen; (-): Tüketilmeyen
<i>Xenorhabdus szentirmaii</i> $\Delta$ hfq mutant (Kontrol) / +Arabinoz	+/+
Dipeptide / +Arabinoz	+/+
Szentiramide / +Arabinoz	+/+
$\Delta$ hfq pCEP-KM-3663 / +Arabinoz	+/+
Xenobacteria / +Arabinoz	+/+
$\Delta$ hfq pCEP-KM-0377 / +Arabinoz	+/+
Rhabduscin / +Arabinoz	+/+
Rhabdopeptide / +Arabinoz	+/+
Yersinibactin / +Arabinoz	+/+
Xenorfuranone / +Arabinoz	+/+
Fabclavine / +Arabinoz	+/+
GameXpeptide / +Arabinoz	+/+
<b>Pyrrolizixenamid / +Arabinoz</b>	<b>-/+</b>

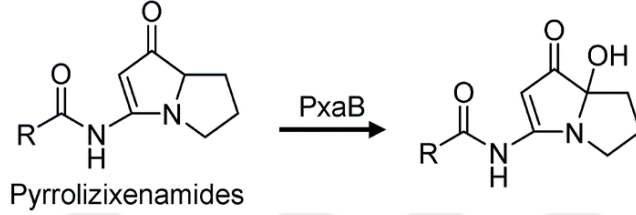


3 saat sonra



Şekil 4.19. Pyrrolizixenamid üretimi promotor bölge değişimi ile kontrol altına alınmış *Xenorhabdus szentirmaii* KS22 mutantının arabinoz ile indüklenmiş (+Ara) ve indüklenmemiş supernatantlarına çekirgelerin verdiği tepki.

Böylece *Xenorhabdus* bakterilerinde SDF aktivitesinden sorumlu maddenin **Pyrrrolizixenamide (PXA)**'ler olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. *Xenorhabdus* bakterilerinde tanımlanan Pyrrrolizixenamid (PXA) molekülünün kimyasal yapısı.

#### 4.3.4. Doğada Böcek Kadavraları İçerisinde Bulunan Entomopatojen Nematodların Hayatta Kalmasında ve Üremesinde SDF'nin Rolünün Belirlenmesi

Çekirgeler, hamamböcekleri ve balıklar, *S. diaprepesi* ve *S. longicaudum* türlerine ait EPN'ler ile enfekte edilen larvaları tüketmişlerdir. Yağmacılar, SDF aktivitesi gösterdiği bilinen *X. szentirmaii* bakterisini taşıyan *S. rarum* ile enfekte edilen larvalarla ise beslenmemiştir. Bunun sonucunda EPN'lerin SDF benzeri bir madde üretmediği, bu maddenin sadece taşıdıkları simbiyotik bakteriler tarafından üretildiği ve SDF yokluğunda enfekte kadavraların yağmacılar tarafından tüketilmek suretiyle entomopatojen nematodların neslini devam ettirme olasılığını ortadan kaldırdığı görülmüştür.



Şekil 4.21. Çekirgelerin SDF üretmeyen *Steinernema longicaudum* ile enfekte ve kontrol gurubundaki larvalar ile beslenmesi.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında yapılan deneyler sonucunda EPN'ler ile mutualistik yaşayan *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* türlerine ait bakteriler tarafından üretilen, predatör ve yağmacılara karşı uzaklaştırıcı etki gösteren maddelerin farklı maddeler olduğu; hatta *Xenorhabdus* cinsi içerisinde yer alan türlerin bazılarında bu etkinliğin bulunmasına rağmen bazılarında ise bulunmadığı görülmüştür.

Predasyon doğal hayatta oldukça yaygındır ve pek çok hayvan türü yaşamlarının bazı bölümlerinde predasyonla karşı karşıya kalma riski altındadırlar. Bu durum, canlılarda tür içi ve türler arası pek çok predatör karşıtı savunma mekanizmasının evrimleşmesine neden olmuştur (Caro, 2005). Canlıların predasyona karşı farklı savunma mekanizmaları geliştirmelerinin sebebi, bireylerin birden fazla predatör türü tarafından saldırıya uğrayabilme riski taşımalarıdır. Örneğin bitkilerin hem böcekler hem de patojenler gibi doğal düşmanları vardır (Maleck ve Dietrich, 1999). Aynı zamanda bir birey, farklı saldırılarda farklı predatörlere karşı farklı savunma mekanizmaları geliştirebilir (Caro, 2005).

Endler (1986), predasyonu 1) saptama, 2) tanımlama, 3) yaklaşma, 4) zapt etme ve 5) tüketme olmak üzere toplam 5 safhaya ayırmıştır. Predatörlerin saldırısına uğrayan organizmalar, predasyonun farklı safhalarına etki eden birden fazla savunma mekanizması kullanabilirler. Endler (1991) aynı zamanda predasyona karşı geliştirilen savunma mekanizmalarının predasyonun erken safhalarına karşı geliştirilmesi durumunda bunun canlının yararına olacağını ileri sürmüştür. Ancak predasyonun son evrelerine karşı geliştirilmiş savunma mekanizmalarının da pek çok örneği mevcuttur (Edmunds, 1974; Eisner vd., 2005). Entomopatojen nematodlarla simbiyotik ilişkili bakterilerin ürettiği sekonder metabolitlerden bazılarının farklı yağmacılara karşı uzaklaştırıcı etki göstermesi, enfekte kadavraların tüketilmesini engellediği için predasyonun son evresine karşı geliştirilen savunma mekanizmalarından biri olarak gösterilebilir. Jones vd., 2016 yılında yayınladıkları çalışmada, EPN'ler ile enfekte kadavralardan salınan bir kokunun nokturnal predatörlere karşı uzaklaştırıcı etki gösterdiğini belirlemiştir. Aynı zamanda enfeksiyon gün sayısı arttıkça nokturnal bir predatör olan *Pterostichus madidus*'un enfekte kadavralarla beslenme oranının azaldığını bildirmişlerdir.



Yapılan deneyler sonucunda Steinernematidae familyasındaki entomopatojen nematodlarla mutualistik olarak yaşayan *Xenorhabdus* bakterilerinin hepsinin SDF üretmediği (*X. ehlersii*, *X. doucetiae*, *X. beddingii* ve *X. ishibashii*) ve dolayısıyla yağmacılar tarafından tüketilmeye karşı savunmasız oldukları belirlenmiştir. Yağmacıların, SDF aktivitesi gösteren *Xenorhabdus* bakterileri ile enfekte edilmiş kadvralar ile beslenmekten kaçındığı görülmüştür. SDF aktivitesi gösteren tüm *Xenorhabdus* türlerinin (*X. nematophila* hariç) ise pyrrolizidine alkaloid türevi bir madde ürettikleri ve bu maddenin SDF aktivitesinden sorumlu olabileceği bulunmuştur.

Pyrrolizidine alkaloidler (PA), doğada çoğunlukla bitkiler tarafından kendilerini herbivorlara karşı korumak amacıyla üretilen toksik maddelerdir (Matsuura ve Fett-Neto, 2015). Asteraceae, Boraginaceae ve Fabaceae familyalarında yer alan bitki türlerinin sıklıkla pyrrolizidine alkaloid türevleri ürettiği bilinmektedir. Ayrıca, 6000'den fazla bitkide mevcut olduğu tahmin edilen, ornitin kökenli alkaloidlerin insan ve çiftlik hayvanlarının da dahil olduğu pek çok predatöre karşı etkili olduğu bilinmektedir (Shimshoni vd., 2015). Ayrıca bazı böceklerin bu maddeyi içeren bitkileri kısmen yemek suretiyle kendilerini predatörlere karşı korudukları anlaşılmıştır (Brown, 1984; Hare ve Eisner, 1993; Cardoso, 1997; Robertson ve Stevens, 2017). *Crotalaria* (Fam: Fabaceae) türlerinin pyrrolizidine alkaloidleri, *Utetheisa ornatix* güvesinin larvaları tarafından depolanıp, onları zehirli ve predatörlere karşı repellent hale getirebilir. Bu özellik pupa ve ergin dönemlerde de varlığını sürdürür. Buna ek olarak, alkaloidler ve bunların biyotransformasyon ürünleri yumurtalara da aktarılır ve muhtemelen predatörlere karşı korunmalarını sağlar (Eisner, 2003).

Çok az sayıda PA türevi, bitki dışındaki organizmalardan elde edilebilmiştir. Clazamycin'ler, jenamidine'ler, bohemamine'ler olarak adlandırılan bitki dışı PA türevlerinin hepsi *Stereptomyces*'ten izole edilmiştir. Bitkilerde PA biyosentezi homospermidine döngüsü içermektedir ancak bakteriyel PA biyosentezi hakkında çok az şey bilinmektedir.

İlk defa 2015 yılında yürütülen bir çalışma sonucunda, entomopatojen nematodlarla simbiyotik ilişkili olan *Xenorhabdus* bakterilerinin de bitkilerdeki gibi pyrrolizidin alkaloid türevleri ürettiği belirlenmiş ve bu maddenin biyosentezine ilişkin kimyasal ve moleküler mekanizmalar keşfedilmiştir

(Schimming vd., 2015). Yapılan bu çalışmada pyrrolizidin alkaloidlerin bakterilerde bir ribozom dışı peptid sentetaz (NRPS) ve bir hidroksilaz geni tarafından sentezlendiği ve farklı bakteri alt gruplarında 4 farklı tipte (A, B, C, D) pyrrolizidin alkaloid biyosentez gen grubunun olduğu belirlenmiştir. *Xenorhabdus* bakterileri tarafından üretilen ve bir pyrrolizidin alkaloid türevidir olan bu maddeye “Pyrrolizixenamid (PXA)” ismi verilmiştir. Ancak yapılan bu çalışmada temel olarak bitki savunma mekanizmasında rol oynayan bu maddenin entomopatojen nematodlarla simbiyotik yaşayan bakterilerde neden üretildiği ve işlevinin ne olduğunun anlaşılamadığı belirtilmiştir. İlk defa bu tez çalışması kapsamında pyrrolizixenamid’lerin *Xenorhabdus* bakterileri tarafından neden üretildikleri ve fonksiyonlarının ne olduğu ortaya konmuştur.

*Xenorhabdus nematophila* türü pyrrolizidin alkaloid üretmemekte ancak SDF aktivitesi göstermektedir. Bu durum şaşırtıcı değildir. Çünkü *X. nematophila* türü diğer *Xenorhabdus* türlerinden farklı olarak Nematophin, Xenortide veya Pristinamycin gibi kendine özgü metabolitler üreten bir türdür. *Xenorhabdus nematophila* türüne ait bu özgün metabolitlerden herhangi birisinin SDF aktivitesinden sorumlu olabileceği düşünülmektedir.

*Photorhabdus* cinsine ait bakterilere bakıldığında ise, *P. temperata* subsp. *thracensis* türü dışındakilerin pyrrolizidin alkaloid türevidir bir madde üretmedikleri görülmektedir. Oysa tez kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda tüm *Photorhabdus* türlerinde çok güçlü SDF aktivitesi olduğu belirlenmiştir. *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* cinslerinde yer alan bakterilerin farklı kökenlere sahip oldukları bilinmektedir (Chaston vd., 2011). Bu nedenle birbirinden uzak gruplara ait bu bakteriler tarafından üretilen SDF’nin de çok büyük bir ihtimalle konvergent bir evrimleşmenin ürünü olma ihtimali yüksektir. Bu nedenle *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* cinslerine ait bakterilerde SDF aktivitesi gösteren maddelerin birbirinden farklı olması da muhtemeldir. Yapılan önceki çalışmalar *Photorhabdus* bakterilerinin ürettiği SDF’nin *Xenorhabdus*’ların ürettiğinden daha güçlü olduğunu göstermiştir (Baur vd., 1998; Zhou vd., 2002; Gülcü vd., 2012).

Yapılan deneyler sonucunda *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterilerinde SDF’den sorumlu gen bölgesinin Hfq bağımlı olduğu tespit edilmiştir. Çünkü Hfq gen bölgesinde yapılan mutasyon bu gen bölgesinin inaktif hale gelmesine neden olmuş, SDF maddesi Hfq bağımlı olarak sentezlendiği için mutant suşta

üretilememiştir. Bunun sonucunda da kadavralar çekirgeler tarafından yenmiştir. Oysa yabancı tip ve  $\Delta$ PPtase mutanlığı ile enfekte edilen kadavralar çekirgeler tarafından tüketilmemiştir.

Çalışmanın diğer bölümünde, *P. luminescens* subsp. *kayaii*, *X. cabanillasii* ve *X. szentirmaii* türlerine ait bakteri supernatantlarının *Ae. aegypti* türüne ait ergin sivrisinekler üzerindeki uzaklaştırıcı, yumurtalar üzerindeki ovisidal ve larvalar üzerindeki larvisidal etkisi araştırılmıştır. Sivrisinekler; protozoon, bakteri ve virüs gibi pek çok patojenin hayvanlara ve insanlara bulaşmasında vektörlük yapan önemli böceklerdir. Sivrisinek kaynaklı hastalıkların yayılma riskini azaltmak için iki yaklaşım uygulanmaktadır. Birincisi, kişilerin bireysel olarak alacağı önlemlerdir. Deri yüzeyine uygulanan sivrisinek uzaklaştırıcılar, cibinlikler, pencerelere takılan sinek telleri en yaygın ve en başarılı uygulama türleridir. Deriye uygulanan hemen her uzaklaştırıcı sprey DEET (N,N-Dietil-meta-toluamid) içermektedir (Eldridge, 2005). Bu tez çalışması kapsamında *X. szentirmaii* ve *P. luminescens* subsp. *kayaii* türlerinden elde edilen supernatantların pek çok hastalığa vektörlük *Aedes aegypti* dişilerine karşı da uzaklaştırıcı etki gösterdiği belirlenmiştir. Deneyler sonucunda elde edilen bilgiler ışığında SDF etkisi gösterdiği düşünülen maddeler saf olarak elde edildikten sonra, bu vektörlerden korunma amacıyla kullanılan DEET'e karşı bir alternatif olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir. Bunun için ileriki zamanlarda bu maddelerin saf olarak elde edilmesi ve insan sağlığına olumsuz bir etki gösterip göstermeyeceğinin test edilmesi gerekmektedir.

Sivrisinek mücadelesinde ikinci bir yaklaşım ise sivrisineklerin alan kontrolünün sağlanmasıdır. Sivrisinek popülasyonlarının azaltılması ve kontrol altında tutulması için kullanılan en yaygın yöntemler sucul olan larvalara ve ayrıca erginlere karşı insektisitlerin uygulanmasıdır. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) dünya genelinde sivrisinek mücadelesinde sıklıkla kullanılan bir biyolojik mücadele ajanıdır. Bu türün uzun yıllardır sivrisinek mücadelesinde kullanılması sebebiyle pek çok araştırmacı doğal sivrisinek popülasyonlarında direnç gelişip gelişmediğini araştırmıştır (Liu vd., 2004, Vasquez vd., 2009, Loke vd., 2010, Kamgang vd., 2011). Yapılan bu çalışmalar sonucunda uzun yıllar sonra bile *Bti*'ye karşı direnç gelişiminin olmadığı ileri sürülmüştür. Ancak bazı araştırmalar ise bazı sinek popülasyonlarında *Bti*'ye karşı duyarlılığın azaldığını göstermiştir (Zhang vd., 2004, Paul vd., 2005, Boyer vd., 2007, 2012). Bu tez

kapsamında yapılan deneyler sonucunda *X. cabanillasii* bakterisinden elde edilen supernatantların sivrisineklerin yumurtalarının açılmasını büyük oranda engellediği ve sivrisinek larvalarına karşı da yüksek oranda toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu bakteriden elde edilen supernatantın sivrisinek mücadelesinde sıklıkla kullanılan *Bti*'ye alternatif olarak kullanılabilir potansiyel bir biyolojik mücadele ajanı olabileceği düşünülmektedir. 2013 yılında yapılan bir çalışmada, *Photorhabdus* türlerinden izole edilen iki farklı antrakinin türevinin *Culex pipiens pallens* türü sivrisineklerin larvalarına karşı yüksek oranda öldürücü etki gösterdiği bulunmuştur (Ahn vd., 2013). *Xenorhabdus cabanillasii* antrakinin üretmemektedir. Bu da, bu tür tarafından üretilen başka bir madde(ler)nin *Ae. aegypti* sivrisineklerinde ovisidal ve larvisidal etkiye sebep olduğunu göstermektedir. İleriki dönemde *X. cabanillasii* tarafından üretilen sekonder metabolitlerin saf olarak elde edilip farklı sivrisinek türlerinin yumurta ve larvalarına karşı etkinlikleri test edilmesi sivrisinek mücadelesinde potansiyel yeni biyotoksinlerin elde edilmesinin yolunu açacaktır.

Sonuç olarak bu doktora tezi kapsamında;

- (1) *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterilerinde SDF özelliğini gösteren maddelerin farklı maddeler olduğu,
- (2) Test edilen tüm *Photorhabdus* türlerinde SDF özelliğinin var olduğu, bazı *Xenorhabdus* türlerinin ise SDF aktivitesine sahip olmadığı,
- (3) *Xenorhabdus* türlerinde (*X. nematophila* hariç) SDF aktivitesi gösteren maddenin bir Pyrrolizidin alkaloid türevi olan **Pyrrolizixenamid** olduğu,
- (4) Bu maddenin Hfq bağımlı olarak üretildiği ve ilgili maddenin üretiminin promotor değişikliği ile kontrol altına alınabildiği,
- (5) Pyrrolizixenamid'in peptid sentetazlar tarafından ribozom dışında sentezlendiği ve yüksek sıcaklıkta yapısının bozunmadığı,
- (6) *Photorhabdus* türlerinde de SDF maddesinin Hfq bağımlı olduğu ve aynı *Xenorhabdus*'lardaki gibi yapısının yüksek sıcaklıkla bozunmadığı ancak etken maddenin Pyrrolizixenamid dışında bir madde olduğu,

(7) SDF etkisi gösteren maddelerin sivrisinekler gibi insan sağlığını olumsuz olarak etkileyen vektörlere karşı da etkili olduğu,

(8) *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterileri tarafından üretilen bazı sekonder metabolitlerin sivrisineklere karşı ovisidal ve larvisidal etki gösterdiği belirlenmiştir.





## KAYNAKLAR

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, 18: 265-267.
- Adams, B.J., Nguyen, K.B. 2002. Taxonomy and systematics. In: Entomopathogenic Nematology, (Gaugler, R. Ed.), CABI Publishing, pp.1-34, Oxon, New York.
- Ahn, J.Y., Lee, J.Y., Yang, E.J., Lee, Y.J., Koo, K.B., Song, K.S., Lee, K.Y. 2013. Mosquitocidal activity of anthraquinones isolated from symbiotic bacteria *Photorhabdus* of entomopathogenic nematode. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, 16: 317-320.
- Akhurst, R.J., Boemare, N.E. 1990. Biology and Taxonomy of *Xenorhabdus*. In: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control (Gaugler, R., and Kaya, H.K. Eds.), CRC Press, pp.75-90, Boca Raton.
- Bartlet, B. R. 1964 Integration of Chemical and Biological Control. In: Biological Control of Insect Pests and Weeds (DeBach, P. Ed.), Chapman & Hall, pp.489-511, London.
- Baur, M.E., Kaya, H.K. and Strong, D.R. 1998. Foraging ants as scavengers on entomopathogenic nematode killed insects. **Biological Control**, 236: 231-236.
- Beld, J., Sonnenschein, E.C., Vickery, C.R., Noel, J.P., Burkart, M.D. 2014. The phosphopantetheinyl transferases: catalysis of a post-translational modification crucial for life. **Natural Product Reports**, 31: 61-108.
- Blaxter, M.L., De Ley, P., Garey, J.R., Liu, L.X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.M., Vida, J.T., Thomas, W.K. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature**, 6671: 71-75.

- Bode, E., Brachmann, A.O., Kegler, C., Şimşek, R., Dauth, C., Zhou, Q., Kaiser, M., Klemmt, P., Bode, H.B. 2015. Simple “on-demand” production of bioactive natural products. **ChemBioChem**, 16: 1115-1119.
- Bode, H.B. 2009. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. **Current Opinion in Chemical Biology**, 2: 224-230.
- Boemare, N.E., 2002. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: Entomopathogenic Nematology (Gaugler, R., Ed), CABI Publishing, pp.35-56, Wallingford, UK.
- Boyer, S., Paris, M., Jegou, S., Lemperiere, G., Ravanel, P. 2012. Influence of insecticide *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* treatments on resistance and enzyme activities in *Aedes rusticus* larvae (Diptera: Culicidae). **Biological Control**, 62: 75-81.
- Boyer, S., Tilquin, M., Ravanel, P. 2007. Differential sensitivity to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *temephos* in field mosquito populations of *Ochlerotatus cataphylla* (Diptera: Culicidae): Toward resistance? **Environmental Toxicology and Chemistry**, 26: 157-162.
- Brachmann, A.O. 2009. Isolation and identification of natural products and biosynthetic pathways from *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. der Universität des Saarlandes, Ph.D. Thesis, Saarbrücken.
- Brachmann, A.O., Forst, S., Furgani, G.M., Fodor, A. Bode, H.B. 2006. Xenofuranones A and B: phenylpyruvate dimers from *Xenorhabdus szentirmaii*. **Journal of Natural Products**, 69: 1830-1832.
- Brown, K.S. Jr. 1984. Adult-obtained pyrrolizidine alkaloids defend ithomiine butterflies against a spider predator. **Nature**, 307: 707-709.
- Cai, X., Nowak, S., Wesche, F., Bischoff, I., Kaiser, M., Fürst, R , Bode, H.B. 2017. Entomopathogenic bacteria use multiple mechanisms for bioactive peptide library design. **Nature Chemistry**, 9: 379-386.



- Campos-Herrera, R., 2015. Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests. Springer, pp.531, Cham, Switzerland.
- Cardoso, M.Z. 1997. Testing chemical defence based on pyrrolizidine alkaloids. **Animal Behaviour**, 4: 985-991.
- Caro, T. 2005. Antipredator Defenses in Birds and Mammals. University of Chicago Press, pp.591, United States of America.
- Chaston, J.M., Suen, G., Tucker, S.L., Andersen, A.W., Bhasin, A., Bode, E. 2011. The entomopathogenic bacterial endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: convergent lifestyles from divergent genomes. **Plos One**, 6 (11): e27909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027909>.
- Ciche, T.A. , Darby, C. , Ehlers, R.-U. , Forst, S. , Goodrich-Blair, H. 2006. Dangerous liaisons: The symbiosis of entomopathogenic nematodes and bacteria. **Biological Control**, 38: 22-46.
- Ciche, T.A., Bintrim, S.B., Horswill, A.R., Ensign, J.C. 2001. A phosphopantetheinyl transferase homolog is essential for *Photorhabdus luminescens* to support growth and reproduction of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. **Journal of Bacteriology**, 183: 3117-3126.
- Ciche, T.A., Ensign, J.C. 2003. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? **Applied and Environmental Microbiology**, 4: 1890-1897.
- Ciche, T.A., Kim, K.S., Kaufmann-Daszczuk, B., Nguyen, K.C.Q., Hall, D.H. 2008. Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. **Applied and Environmental Microbiology**, 74: 2275-2287.
- Cory, J.S., Evans, H.F., 2007. Viruses. In: Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests, 2nd edition, (Lacey, L.A., Kaya, H.K. Eds.), Springer, pp.149-174, Dordrecht, The Netherlands.

- Crawford, J. M., C. Portmann, X. Zhang, M. B. Roeffaers, and J. Clardy. 2012. Small molecule perimeter defense in entomopathogenic bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 109: 10821-10826.
- Crawford, J. M., R. Kontnik, and J. Clardy. 2010. Regulating alternative lifestyles in entomopathogenic bacteria. **Current Biology**, 20: 69-74.
- Cruz-Martínez, H., Ruiz-Vega, J., Matadamas-Ortíz, P.T., Cortés-Martínez, C.I., Rosas-Díaz, J. 2017. Formulation of Entomopathogenic Nematodes for Crop Pest Control: a Review. **Plant Protection Science**, 53: 1-10.
- Çimen, H. 2013. Türkiye'den Elde Edilmiş Yeni Bir Entomopatojen Nematod İzolatının Ve Mutualistik Bakterisinin Tanımlanması. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- da Silva, J.L.R., Schwalm, F.U., Silva, C.E., da Costa, M., Heermann, R., da Silva, O.S. 2017. Larvicidal and growth-inhibitory activity of entomopathogenic bacteria culture fluids against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Economic Entomology**, 2: 378-385.
- da Silva, O.S., Prado, G.R., da Silva, J.L.R., Silva, C.E., da Costa, M., Heermann, R. 2013. Oral toxicity of *Photorhabdus luminescens* and *Xenorhabdus nematophila* (Enterobacteriaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, 112: 2891-2896.
- Davidson, E. W., 2012. History of Insect Pathology. In: Insect Pathology, Second Edition, (Vega, F.E., Kaya, H.K., Eds.), Academic Press, pp.13-28, San Diego.
- De, A., Bose, R., Kumar, A., Mozumdar, S. 2014. Worldwide Pesticide Use. In: Targeted Delivery of Pesticides Using Biodegradable Polymeric Nanoparticles (De, A., Bose, R., Kumar, A., Mozumdar, S. Eds.), Springer Science & Business Media, pp.5-6, New Delhi.
- Demain, A.L., Fang, A. 2000. The natural functions of secondary metabolites. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 69: 1-39.

- Deng, W., Zhu, N., Mo, J. 2014. In vitro bioassay methods for laboratory screening of novel mosquito repellents. **Entomological Science**, 17: 365-370.
- Dowds, B.C.A., Peters, A. 2002. Virulence mechanisms In: Entomopathogenic Nematology (Gaugler, R. Ed), CABI, pp.79-98, New York.
- Eberle, K.E., Wennmann, J.T., Kleespies, R.G., Jehle, J.A., 2012. Basic techniques in insect virology. In: Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Lacey, L.A. Ed.), Academic Press, pp.15-74, San Diego.
- Edmunds, M. 1974. Defence in Animals: A Survey of Anti-Predator Defences. Longman, pp.357.
- Ehlers, R.-U., Shapiro-Ilan, D.I. 2005. Mass production. In: Nematodes as Biocontrol Agents (Grewal, P.S., Ehlers, R.-U., Shapiro-Ilan, D.I., Eds), CABI Publishing, pp.65-78, Wallingford, UK.
- Eisner, T. 2003. For the Love of Insects. Harvard University Press, Cambridge.
- Eisner, T., Eisner, M., Siegler, M. 2005. Secret Weapons: Defenses of Insects, Spiders, Scorpions, and Other Many-Legged Creatures. Harvard University Press, pp.372, Canada.
- Eldridge, B.F. 2005. Mosquitoes, the Culicidae. In: Biology of Disease Vectors, 2nd Edition, (Marquard, W.H., Ed.), Elsevier Academic, pp.95-113, Burlington.
- Endler, J. 1986. Natural Selection in the Wild. Princeton University Press, pp.336, New Jersey.
- Endler, J. 1991. Variation in the appearance of guppy color patterns to guppies and their predators under different visual conditions. **Vision Research**, 31: 587-608.
- Faner, M.A., Feig, A.L. 2013. Identifying and characterizing Hfq-RNA interactions. **Methods**, 63: 144-159.

- Fenton, A., Magoolagan, L., Kennedy, Z., Spencer, K.A. 2011. Parasite-induced warning coloration: a novel form of host manipulation. **Animal Behaviour**, 81: 417-422.
- French-Constant R, Waterfield N. 2006. An ABC guide to the bacterial toxin complexes. **Advances in Applied Microbiology**, 58: 169-183.
- French-Constant R, Waterfield N., Daborn, P., Joyce, S., Bennett, H., Au, C., Dowling, A., Boundy, S., Reynolds, S., Clarke, D. 2003. *Photorhabdus*: towards a functional genomic analysis of a symbiont and pathogen. **FEMS Microbiology Reviews**, 26, 433-456.
- Foltan, P., Puza, V. 2009. To complete their life cycle, pathogenic nematode-bacteria complexes deter scavengers from feeding on their host cadaver. **Behavioural Processes**, 80: 76-79.
- Forst, S. , Dowds, B. , Boemare, N., Stackebrandt, E. 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. **Annual Review of Microbiology**, 51: 47-72.
- Forst, S., Clarke, D. 2002. Bacteria-nematode symbiosis. In: Entomopathogenic Nematology (Gaugler R., Ed.), CABI, pp.57-77, New York.
- Friedman, M.J. 1990. Commercial production and development. In: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control (Gaugler, R., and Kaya, H.K. Eds.), CRC Press, pp.153-172, Boca Raton, Florida.
- Fuchs, S.W., Grundmann, F., Kurz, M., Kaiser, M., Bode, H.B. 2014. Fabclavines: Bioactive Peptide-Polyketide-Polyamino Hybrids from *Xenorhabdus*. **Chembiochem**, 15: 512-516.
- Gaugler, R., Brown, I., Shapiro-Ilan, D.I., Atwa, A. 2002. Automated technology for *in vivo* mass production of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**. 24: 199-206.
- Gaugler, R., Kaya, H.K., 2000. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., pp.342-343. Boca Raton, Florida.

- Georgis, R. 1990. Formulation and application technology. In: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. (Gaugler, R., and Kaya, H.K. Eds.), CRC Press, pp.173-194, Boca Raton, Florida.
- Georgis, R., Koppenhöfer, A.M., Lacey, L.A., Bélair, G., Duncan, L.W., Grewal, P.S. 2006. Success and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. **Biological Control**, 38: 103-123.
- Glare, T.R., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Kohl, J., Marrone, P., Morin, L., Stewart, A., 2012. Have biopesticides come of age?. **Trends in Biotechnology**, 30: 250-258.
- Goettel, M.S., Eilenberg, J., Glare, T.R., 2010. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. In: Insect Control: Biological and Synthetic Agents (Gilbert, L.I., Gill, D.S. Eds.), Academic Press, pp.387-431, San Diego.
- Gokulan, K., Khare, S., Cerniglia, C. 2014. Metabolic Pathways: Production of secondary metabolites of bacteria. In: Encyclopedia of Food Microbiology 2nd Edition, (Batt, C.A., Totorello, L.-M. Eds.), Elsevier Ltd, Academic Press, pp.561-569.
- Goodrich-Blair, H., Clarke, D.J. 2007. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. **Molecular Microbiology**, 64: 260-268.
- Govindarajan, M., Karuppanan, P. 2011. Mosquito larvicidal and ovicidal properties of *Eclipta alba* (L.) Hassk (Asteraceae) against chikungunya vector, *Aedes aegypti* (Linn.) (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 1: 24-28.
- Grewal, P.S. 2002. Formulation and application technology. In: Entomopathogenic Nematology (Gaugler, R., Ed.), CABI Publishing, pp.265-288, Wallingford, UK.
- Grewal, P.S., Ehlers, R.-U., Shapiro-Ilan, D.I. 2005. Nematodes as Biological Control Agents. CABI, pp.505, Wallingford.

- Gualtieri, M., Aumelas, A., Thaler, J. O. 2009. Identification of a new antimicrobial lysine-rich cyclolipopeptide family from *Xenorhabdus nematophila*. **Journal of Antibiotics**, 62: 295-302.
- Gülcü, B. 2010. Biyolojik Mücadele Ajanı Entomopatojenik Nematodlar Üzerine Araştırmalar. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Aydın.
- Gülcü, B., Çimen, H., Ramalingam, K. R., Hazır, S. 2017. Entomopathogenic Nematodes and their Mutualistic Bacteria: Their: Ecology and Application as Microbial Control Agents. **Biopesticides International**, 13(2): 79-112.
- Gülcü, B., Hazır, S., Kaya, H.K. 2012. Scavenger deterrent factor (SDF) from symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, 3: 326-333.
- Han, R., Ehlers, R.U. 2000. Pathogenicity, development, and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic in vivo conditions. **Journal of Invertebrate Pathology**, 75: 55-58.
- Hare, J.F., Eisner, T. 1993. Pyrrolizidine alkaloid deters ant predators of *Utetheisa ornatrix* eggs: effects of alkaloid concentration, oxidation state, and prior exposure of ants to alkaloid-laden prey. **Oecologia**, 1: 9-18.
- Harry K. Kaya, H.K., Aguilera, M.M., Alumai, A., Choo, H. Y., de la Torre, M., Fodor, A., Ganguly, S., Hazır, S., Lakatos, T., Pye, A., Wilson, M., Yamanaka, S., Yang, H., Ehlers, R.-U. 2006. Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the World. **Biological Control**, 38: 134-155.
- Hazır S., Keskin N., Stock S.P., Kaya H.K., Özcan S. 2003. Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Turkey. **Biodiversity and Conservation**, 12: 375-386.

- Hazır, S., Shapiro-Ilan, D.I., Bock, C.H., Leite, G. 2018. Thermo-stability, dose effects and shelf-life of antifungal metabolite-containing supernatants produced by *Xenorhabdus szentirmaii*. **European Journal of Plant Pathology**, 150: 297-306.
- Hemingway, J. 2005. Biological Control of Mosquitoes. In: *Biology of Disease Vectors* (Marquardt, W.C. Ed.) Elsevier Academic Press, 2nd ed., pp.649-660, New York.
- Houard, J., Aumelas, A., Noël, T., Pages, S., Givaudan, Fitton-Ouhabi, V., Villain-Guillot, P., Gualtieri M. 2013. Cabanillasin, a new antifungal metabolite, produced by entomopathogenic *Xenorhabdus cabanillasii* JM26. **The Journal of Antibiotics (Tokyo)**, 66(10): 617-620.
- Hu, K. J., Li, J. X., Li, B., Webster, J. M., Chen, G. H. 2006. A novel antimicrobial epoxide isolated from larval *Galleria mellonella* infected by the nematode symbiont, *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 14: 4677-4681.
- Imam, H., Zarnigar, Sofi, G., Seikh, A. 2014. The basic rules and methods of mosquito rearing (*Aedes aegypti*). **Tropical Parasitology**, 1: 53-55.
- Ji, D., Yi, G. H. Kang, Y. H. Choi, P. Kim, N. I. Baek, and Y. Kim. 2004. Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, 239: 241-248.
- Johnson, M. W., Tabashnik B. E. 1999. Enhanced Biological Control Through Pesticide Selectivity. In: *Handbook of Biological Control*. (Thomas S. Bellows, T. S., Fisher, T.W., Caltagirone, L.E., Dahlsten, D.L., Gordh, G. and Huffaker, C.B. Eds) Academic Press, pp.297-317.
- Jones, R.S., Fenton, A., Speed, M.P. 2016. "Parasite-induced aposematism" protects entomopathogenic nematode parasites against invertebrate enemies. **Behavioural Ecology**, 2: 645-651.

- Joyce, S. A., L. Lango, and D. J. Clarke. 2011. The regulation of secondary metabolism and mutualism in the insect pathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Advances in Applied Microbiology**, 76: 1-25.
- Kamgang, B., Marcombe, S., Chandre, F., Nchoutpouen, E., Nwane, P., Etang, J., Corbel, V., Paupy, C. 2011. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. **Parasites & Vectors**, 4: 79.
- Kasap, H., Alptekin, D., Kasap, M., Güzel, A.İ., Lüleyap, Ü. 2003. Artificial bloodfeeding of *Anopheles sacharovi* on a membrane apparatus. **Journal of the American Mosquito Control Association**, 4: 367-370.
- Kaya, H.K., Gaugler, R 1993. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**. 38: 181-206.
- Kennedy, G., Viziano, M., Winders, J. A., Cavallini, P., Gevi, M., Micheli, F., 2000. Studies on the novel anti-staphylococcal compound nematophin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 10: 1751-1754.
- Koppenhöfer, A.M., 2000. Nematodes. In: Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. (Lacey, L.A., Kaya, H.K. Eds.), pp.283-301, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Lacey, L. A. 2017. Entomopathogens Used as Microbial Control Agents. In: Microbiol Control of Insect and Mite Pests. (Lacey, L.A. Ed.), Academic Press, pp.3-12.
- Lacey, L.A., Georgis, R., 2012. Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production. **Journal of Nematology**, 44: 218-225.
- Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Goettel, M.S., Brownbridge, M., 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, 132: 1-41.



- Lewis, E.E., Clarke, D.J., 2012. Nematode parasites and entomopathogens. In: Insect Pathology, second ed. (Vega, F.E., Kaya, H.K. Eds.), Elsevier, pp.395-424, Amsterdam,.
- Li, J., Chen, G., and Webster, J.M. 1997. Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). **Canadian Journal of Microbiology**, 43: 770-773.
- Li, J., Hu, K., Webster, J. M. 1998. Antibiotics from *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). **Chemistry of Heterocyclic Compounds**. 34: 1331-1339.
- Liu, H., Cupp, E.W., Guo, A.G., Liu, N.N. 2004. Insecticide resistance in Alabama and Florida mosquito strains of *Aedes albopictus*. **Journal of Medical Entomology**, 41: 946-952.
- Loke, S.R., Andy-Tan, W.A., Benjamin, S., Lee, H.L., Sofian-Azirun, M. 2010. Susceptibility of field-collected *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to *Bacillus thuringiensis israelensis* and *temephos*. **Tropical Biomedicine**, 27: 493-503.
- Maleck K., Dietrich R.A. 1999. Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies?. **Trends in Plant Science**, 4: 215-219.
- Martens, E.C., Goodrich-Blair, H. 2005. The *Steinernema carpocapsae* intestinal vesicle contains a subcellular structure with which *Xenorhabdus nematophila* associates during colonization initiation. **Cell Microbiology**, 7: 1723-1735.
- Martens, E.C., Heungens, K., Goodrich-Blair, H. 2003. Early colonization events in the mutualistic association between *Steinernema carpocapsae* nematodes and *Xenorhabdus nematophila* bacteria. **Journal of Bacteriology**, 185: 3147-3154.

- Matsuura, H.N., Fett-Neto, A.G. 2015. Plant Alkaloids: Main Features, Toxicity, and Mechanisms of Action. In: Plant Toxins. Toxinology. (Gopalakrishnakone, P., Carlini, C., Ligabue-Braun, R. Eds), Springer, Dordrecht.
- McMullen, J.G., Stock, S.P. 2014. In vivo and in vitro rearing of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae). **Journal of Visualized Experiments**. 91: 52096.
- Miller, L.K., 1997. The Baculoviruses. Plenum Press, pp.447, New York.
- Miller, L.K., Ball, L.K., 1998. The Insect Viruses. Plenum Press, pp.413, New York.
- Mohammed, M.A., Coppel, H.C., 1983. Mass rearing of the greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) for small-scale laboratory studies. **Great Lakes Entomology**, 16: 139-141.
- Orozco, R.A., Hill, T., Stock, S.P. 2013. Characterization and phylogenetic relationships of *Photorhabdus luminescens* subsp. *sonorensis* ( $\gamma$ -Proteobacteria: Enterobacteriaceae), the bacterial symbiont of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis sonorensis* (Nematoda: Heterorhabditidae), **Current Microbiology**, 1: 30-39.
- Paik, S., Park, Y. H., Suh, S. I., Kim, H. S., Lee, I. S., Park, M. K., Lee, C. S., Park, S. H. 2001. Unusual cytotoxic phenethylamides from *Xenorhabdus nematophilus*. **Bulletin of the Korean Chemical Society**. 22: 372-374.
- Park, Y., Jung, K., Kim, Y. 2016. A Mixture of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* with *Xenorhabdus nematophila*-cultured broth enhances toxicity against mosquitoes *Aedes albopictus* and *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae). **Journal of Ecological Entomology**, 3: 1086-1093.
- Paul, A., Harrington, L.C., Zhang, J.L., Scott, J.G. 2005. Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. **Journal of American Mosquito Control Association**, 21: 305-309.

- Perez, E.E., Lewis, E.E., Shapiro-Ilan, D.I. 2003. Impact of the host cadaver on survival and infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) under desiccating conditions. **Journal of Invertebrate Pathology**, 82: 111-118.
- Piel, J. 2004. Secondary metabolites from symbiotic bacteria. **Natural Product Reports**, 21: 519-538.
- Poinar, G.O., Thomas, G. Jr., Haygood, M., Neelson, K.H. 1980. Growth and luminescence of the symbiotic bacteria associated with the terrestrial nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. **Soil Biology and Biochemistry**, 12: 5-10.
- Poinar, Jr., G.O. 1990. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control (Gaugler, R., Kaya, H.K. Eds.), CRC Press, pp.23-62, Boca Raton, Florida.
- Possee, R.D., King, L.A. 2014. Insect Viruses. eLS, John Wiley & Sons, Ltd <http://dx.doi.org/10.1002/9780470015902.a0020712.pub2>.
- Pramer D, al-Rabiai S., 1973. Regulation of insect populations by protozoa and nematodes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 217: 85-92.
- Raja, K.R., Aiswarya, D., Gülcü, B., Raja, M., Perumal, P., Sivaramakrishnan, S., Kaya, H.K. and Hazır, S. 2017. Response of three cyprinid fish species to the scavenger deterrent factor produced by the mutualistic bacteria associated with entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, 143: 40-49.
- Ramírez-Lepe, M., Ramírez-Suero, M. 2012. Biological Control of Mosquito Larvae by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. In: Insecticides-Pest Engineering. (Perveen, F. Ed.), ISBN: 978-953-307-895-3, InTech, pp.239-264.

- Reimer, D. 2013. Identification and characterization of selected secondary metabolite biosynthetic pathways from *Xenorhabdus nematophila*. der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Ph.D. Thesis, Frankfurt.
- Reimer, D., Luxenburger, E., Brachmann, A.O., and Bode, H.B. 2009. A new type of pyrrolidine biosynthesis is involved in the late steps of xenocoumacin production in *Xenorhabdus nematophila*. **Chembiochem**, 13: 224-230.
- Robertson, J., Stevens, K. 2017. Natural Product Reports, 1: 62-89.
- Schimming, O., Challinor, V.L., Tobias, N.J., Adihou, H., Grün, P., Pöschel, L., Richter, Schwalbe, H., Bode, H.B. 2015. Structure, Biosynthesis, and Occurrence of Bacterial Pyrrolizidine Alkaloids. **Biosynthesis**, 43: 12702-12705.
- Shapiro, D.I., Glazer, I. 1996. Comparison of Entomopathogenic Nematode Dispersal from Infected Hosts Versus Aqueous Suspension. **Environmental Entomology**, 6: 1455-1461.
- Shapiro, D.I., Lewis, E.E. 1999. Infectivity of entomopathogenic nematodes from cadavers vs. aqueous applications. **Environmental Entomology**, 28: 907-911.
- Shapiro-Ilan, D.I., Hazır, S., Glazer, I. 2017. Basic and Applied Research: Entomopathogenic Nematodes In: Microbiol Control of Insect and Mite Pests. (Lacey, L.A. Ed.), Academic Press, pp.91-105.
- Shapiro-Ilan, D.I., Lewis, E.E., Behle, R.W., McGuire, M.R. 2001. Formulation of entomopathogenic nematode-infected-cadavers. **Journal of Invertebrate Pathology**, 78: 17-23.
- Shapiro-Ilan, D.I., Lewis, E.E., Tedders, W.L. 2003. Superior efficacy observed in entomopathogenic nematodes applied in infected-host cadavers compared with application in aqueous suspension. **Journal of Invertebrate Pathology**, 83: 270-272.

- Shimshoni, J.A., Duebecke, A., Mulder, P., Cuneah, O., Barel, S. 2015. Pyrrolizidine and tropane alkaloids in teas and the herbal teas peppermint, rooibos and chamomile in the Israeli market. **Food Additives & Contaminants: Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, doi: 10.1080/19440049.2015.1087651.
- Singh, J., Banerjee, N. 2008. Transcriptional analysis and functional characterization of a gene pair encoding iron-regulated xenocin and immunity proteins of *Xenorhabdus nematophila*. **Journal of Bacteriology**, 190: 3877-3885.
- Singh, S., Orr, D., Divinagracia, E., McGraw, J., Dorff, K., Forst, S. 2015. Role of secondary metabolites in establishment of the mutualistic partnership between *Xenorhabdus nematophila* and the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. **Applied and Environmental Microbiology**, 81: 754-764.
- Sittka, A., Pfeiffer, V., Tedin, K., Vogel, J. 2007. The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. **Molecular Microbiology**, 63: 193-217.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. 1995. Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research 3rd Edition, W.H. Freeman and Co., New York.
- Stenhaus, E.A., 1949. Principles of Insect Pathology. McGraw-Hill, pp.757, New York.
- Stock, S.P. 2015. Diversity, biology and evolutionary relationships. In: Nematode pathogenesis of insects and other pests. (Campos-Herrera, R. Ed.), Springer, pp.3-27, Gewerbestrasse, Switzerland.
- Stock, S.P., Goodrich-Blair, H. 2008. Entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts: the inside out of a mutualistic association. **Symbiosis**, 46: 65-76.

- Stock, S.P., Griffin, C. T., Chaeran, R. 2004. Morphological and molecular characterisation of *Steinernema hermaphroditum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Indonesia, and its phylogenetic relationships with other members of the genus. **Nematology**, 3: 401-412.
- Szewczyk, B., Hoyos-Carvajal, L., Paluszek, M., Skrzecz, I., Lobo de Souza, M., 2006. Baculoviruses re-emerging biopesticides. **Biotechnology Advances**. 24: 143-160.
- Tailliez, P., Laroui, C., Ginibre, N., Paule, A., Pagès, S., Boemare, N., 2010. Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein-coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. Proposal of new taxa: *X. vietnamensis* sp. nov., *P. luminescens* subsp. *caribbeanensis* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *hainanensis* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *khanii* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* subsp. nov., and the reclassification of *P. luminescens* subsp. *thracensis* as *P. temperata* subsp. *thracensis* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 1921-1937.
- Thaler, J. O., Baghdiguian, S., and N. Boemare. 1995. Purification and characterization of xenorhabdycin, a phage tail-like bacteriocin, from the lysogenic strain f1 of *Xenorhabdus nematophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 61: 2049-2052.
- Tobias, N.J., Wolff, H., Djahanschiri, B., Grundmann, F., Kronenwerth, M., Shi, Y.-M., Simonyi, S., Grün, P., Shapiro-Ilan, D., Pidot, S.J., Stinear, T.P., Ebersberger, I., Bode, H.B. 2017. Natural product diversity associated with the nematode symbionts *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. **Nature Microbiology**, 1676-1685.
- Uluğ, D., Hazır, S., Kaya, H.K., Lewis, E.E. 2014. Natural enemies of natural enemies: the potential top-down impact of predators on entomopathogenic nematode populations. **Ecological Entomology**, 4: 462-469.

- Vasquez, M.I., Violaris, M., Hadjivassilis, A., Wirth, M.C. 2009. Susceptibility of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) field populations in Cyprus to conventional organic insecticides, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *methoprene*. **Journal of Medical Entomology**, 46: 881-887.
- Vega, F.E., Meyling, N.V., Luangsa-Ard, J.J., Blackwell, M., 2012. Fungal entomopathogens. In: Insect Pathology, second ed. (Vega, F.E., Kaya, H.K. Eds.), Academic Press, pp.171-220, San Diego.
- Wangrawa, D.W., Badolo, A., Guelbéogo, W.M., Moussa, W., Kiendrébeogo, M., Nébrié, R.C.H., Sagnon, N., Sanon, A., Oh, Y-K., Kim, Y.B. 2015. Biological activities of four essential oils against *Anopheles gambiae* in Burkina Faso and their in vitro inhibition of acetylcholinesterase. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, 2: 793-802.
- Wojciech J. J. & Korsten L. 2002. Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits. **Annual Review of Phytopathology**, 40: 411-441.
- Yoon, J.K., Kim, K.-C., Cho, Y., Gwon, Y-D., Cho, H. S., Heo, Y., Park, K., Lee, Y-W., Kim, M. 2015. Comparison of repellency effect of mosquito repellents for DEET, citronella, and fennel oil. **Journal of Parasitology Research**, Article ID: 361021.
- Zhang, H.Y., Yang, C.J., Huang, J.Y., Lu, L. 2004. Susceptibility of field populations of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Biocontrol Science and Technology**, 14: 321-325.
- Zhou, X., Kaya, H.K., Heungens, K., Goodrich-Blair, H., 2002. Response of Ants to a Deterrent Factor(s) Produced by the Symbiotic Bacteria of Entomopathogenic Nematodes. **Applied and Environmental Microbiology**, 12: 6202-6209.





## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Derya ULUĞ

Doğum Yeri ve Tarihi : Torbalı, 31.05.1986

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yabancı Diller : İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

#### A) Makaleler

- Asan, C., Hazır, S., Çimen, H., **Uluğ, D.**, Taylor, J., Butt, T., Karagoz, M. 2017. An innovative strategy for control of the chestnut weevil *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae) using *Metarhizium brunneum*. **Crop Protection**, 102: 147-153.
- Butt, T.M., Wood, M., Taylor, J.W.D., Bakırcı, S., Hazır, C., **Uluğ, D.**, Hazır, S. 2016. Differential susceptibility of *Hyalomma excavatum* adults and nymphs to the entomopathogens *Metarhizium anisopliae* ARSEF 4556 and *Steinernema carpocapsae*. **International Journal of Pest Management**, 62 (3): 261-266.
- **Uluğ, D.**, Hazır, C., Hazır, S. 2015. A new and simple technique for the isolation of symbiotic bacteria associated with entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). **Turkish Journal of Zoology**, 39 (2): 365-367.
- **Uluğ, D.**, Hazır, S., Kaya, H.K., Lewis, E.E. 2014. Natural enemies of natural enemies: The potential top-down impact of predators on entomopathogenic nematode populations. **Ecological Entomology**, 39 (4): 462-469 .
- Çakmak, I., Hazır, S., **Uluğ, D.**, Karagöz, M. 2013. Olfactory response of *Sancassania polyphyllae* (Acari: Acaridae) to its phoretic host larva killed by the

entomopathogenic nematode, *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) **Biological Control**, 65 (2): 212-217.

- Gülcü, B., **Uluğ, D.**, Hazır, C., Karagöz, M., Hazır, S. 2012. Biological control potential of native entomopathogenic nematodes Steinernematidae and Heterorhabditidae against *Spodoptera ciliun* (Lepidoptera: Noctuidae) in turfgrass. **Biocontrol Science and Technology**, 24 (8): 965-970 4.

## B) Bildiriler

- Çakmak, İ., Karagöz, M., **Uluğ, D.**, Hazır, C., Hazır, S. The Effect of *Sancassania polyphyllae* (Acari: Acaridae) On Entomopathogenic Nematodes. **VIII Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal**. 10-14 April 2017, Cuba.
- Karagöz, M., Hazır, S., **Uluğ, D.**, Çakmak, İ. Hazır, C. Shapiro- Ilan, D. The Living Insect Bomb: A New Entomopathogenic Nematode Application Method. **VIII Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal**. 10-14 April 2017, Cuba.
- Çakmak, İ., Karagöz, M., **Uluğ, D.**, Hazır, C., Hazır, S. Response of *Sancassania polyphyllae* (Acari: Acaridae) to Food Odors from Various Sources. **VIII Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal**. 10-14 April 2017, Cuba.
- Hazır, S., Karagöz, M., **Uluğ, D.**, Hazır, C., Çakmak, İ. Efficacy of Native Entomopathogenic Nematodes Against the Mediterranean Fruit Fly *Ceratitis capitata*. **Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal**. 10-14 April 2017, Cuba.
- **Uluğ, D.**, Hazır, S., Kaya, H., Lewis, E.E. Potential Natural Enemies of Entomopathogenic Nematodes. **46th Annual Meeting of Society for Invertebrate Pathology**. 11-15 August 2013, Pittsburgh, PA, USA.
- Çakmak, İ., Hazır, S., **Aşıcı, D.**, Karagoz, M., Kaya, H.K. Response of *Sancassania polyphyllae* (Acari: Acaridae) to volatiles from different food sources. **7th Symposium of the European Association of Acarologists**. 9-13 July 2012, Vienna, Austria.

- Gülcü, B., Hazır, S., Karagöz, M., Çakmak, İ, **Aşıcı, D.**, Kaya, H.K. Türkiye Topraklarından Elde Edilen Entomopatojen Nematodların (Steinernematidae ve Heterorhabditidae) Çim Alanlarda Zarar Yapan *Spodoptera* sp. (Lepidoptera: Noctuidae) Larvalarına Karşı Biyolojik Mücadele Potansiyellerinin Araştırılması. **Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi.** 28-30 Haziran 2011, Kahramanmaraş, Türkiye.
- **Aşıcı, D.** 2009. A New Technique for the Isolation of the Mutualistic Bacteria *Photorhabdus* spp. Associated with Entomopathogenic Nematodes in the Genus *Heterorhabditis*.- **Second International Participated Entomopathogen and Microbial Control Symposium.** Eylül 2009, Sarıgerme, Muğla.
- Gülcü, B., Karagöz, M., **Aşıcı, D.**, Hazır, S. Biological Control Potential of Three Different Entomopathogenic Nematode Species Against Chestnut Fruit Pests, *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae) and *Cydia splendana* (Lepidoptera: Tortricidae). **Second International Participated Entomopathogen and Microbial Control Symposium.** Eylül 2009, Sarıgerme, Muğla.

## İLETİŞİM

E-Posta Adresi : deryaasici@adu.edu.tr

Tarih :18/06/2018