



**GİRESUN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ENTOMOPATOJENİK NEMATODLARLA (*Steinernema* ve  
*Heterorhabditis*) SİMBİYOTİK YAŞAYAN *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus*  
BAKTERİLERİNİN TANIMLANMASI**

**ŞEBNEM HAZAL GÜLŞEN**

**EYLÜL 2014  
GİRESUN**

**GİRESUN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ENTOMOPATOJENİK NEMATODLARLA (*Steinernema* ve  
*Heterorhabditis*) SİMBİYOTİK YAŞAYAN *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus*  
BAKTERİLERİNİN TANIMLANMASI**

**ŞEBNEM HAZAL GÜLŞEN**

**EYLÜL 2014**

**GİRESUN**

Fen Bilimleri Enstitü Müdürü'nün onayı.

..../..../....

Doç. Dr. Kültiğın ÇAVUŞOĞLU  
Enstitü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak Biyoloji Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

..../..../....

Prof. Dr. İhsan AKYURT  
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve Yüksek Lisans tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarım.

Doç. Dr. Hatice KATI  
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Hatice KATI

.....

Doç. Dr. Emine YALÇIN

.....

Yrd. Doç. Dr. Kadriye ÖZCAN

.....

## ÖZET

# ENTOMOPATOJENİK NEMATODLARLA (*Steinernema* ve *Heterorhabditis*) SİMBİYOTİK YAŞAYAN *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* BAKTERİLERİNİN TANIMLANMASI

GÜLŞEN, Şebnem Hazal

Giresun Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Hatice KATI

Eylül 2014, 57 sayfa

Bu tez çalışması kapsamında Güney Afrika Cumhuriyeti topraklarından izole edilmiş olan 123 entomopatojenik nematod izolatıyla mutualistik ilişkili olan bakterilerin izolasyonu ve moleküler olarak tanımlanması yapılmıştır. Tüm bakteri izolatlarının tür teşhislerinde ve filogenetik ağaçların çiziminde RecA gen bölgesi sekansları kullanılmıştır. Toplam 890 baz çiftinden oluşan RecA gen bölgesi, recA-F (5'-GCTATTGATGAAAATAAACA-3') ve recA-R (5'-RATTTTRTCWCCRTTRTAGCT-3') primerleri kullanılarak PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Yapılan RecA gen bölgesi analiz sonuçlarına göre *Steinernema* cinsi nematodlardan izole edilen *Xenorhabdus* bakterilerinin 53 suşunun birbirlerine oldukça yakın gruplar olduğu, ancak bunların daha önce tanımlanmış *Xenorhabdus* türlerinden ise oldukça farklı bir grubu temsil ettiği belirlenmiştir. Elde edilen veriler SGI-145 izolat numarasıyla gösterilen bakteri suşunun *X. miraniensis* türüne, 16 suşun ise *X. khoisanae* türüne ait olduklarını göstermiştir. Ayrıca 5 izolatın (SGI-

220, SGI-226, SGI-221, SGI-238 ve SGI-249) *X. indica*, 3 suşun (NWGA-7, NWGA-33 ve SGI-145-b) ise *X. bovienii* türüne ait oldukları belirlenmiştir.

Oluşturulan *Photorhabdus* cinsine ait filogenetik ağaç bakteri suşlarının büyük bölümünün *Photorhabdus luminescens* türüne ait olduklarını ancak bu suşların *P. luminescens* türünün farklı alttürleri olabileceğini göstermiştir. Bunun yanı sıra sadece bir adet izolatın (SGI-193) *P. luminescens* subsp. *thracensis* türüne ait olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak elde edilen moleküler veriler Güney Afrika izolatları arasında en azından bir tane yeni *Xenorhabdus* türünün ve *Photorhabdus luminescens* türüne bağlı yeni birkaç alttürün olduğunu ortaya koymuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Entomopatojenik nematodlar, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*, biyolojik mücadele, RecA.

## ABSTRACT

# IDENTIFICATION OF SYMBIOTIC BACTERIA *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* ASSOCIATED WITH ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES (*Steinernema* and *Heterorhabditis*)

GÜLŞEN, Şebnem Hazal

Giresun University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Master Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hatice KATI

September 2014, 57 pages

Isolation and molecular identification of 123 mutualistic bacterial isolate associated with entomopathogenic nematodes recovered from The Republic of South Africa soil samples were carried out. Species identification and phylogenetic analysis of all bacterial isolates were subsequently performed on the basis of RecA sequences. A 890 bp region of the recA gene was amplified by PCR using the following primers: recA-F (5'-GCTATTGATGAAAATAAACA-3') and recA-R (5'-RATTTTRTCWCCRTTRTAGCT-3'). RecA analyses showed that 53 of *Xenorhabdus* bacterial strains isolated from the genus *Steinernema* were all closely related to each other and most distantly related to known species. SGI-145 was similar to *X. miraniensis* and 16 strains were belong to *X. khoisanae* species. It was determined that 5 of the strains (SGI-220, SGI-226, SGI-221, SGI-238 and SGI-249) were similar to *X. indica* and 3of the strains (NWGA-7, NWGA-33 and SGI-145-b) were closely related to *X. bovienii* species.

Rec A sequences resolved all *Photorhabdus* species. Most of the novel strains was belong to *P. luminescens* species but might represent novel subspecies. Only one isolate (SGI-193) was identified as *P. luminescens* subsp. *thracensis*.

As a result, the data obtained from molecular analyses showed that there are at least one new *Xenorhabdus* species and several new subspecies belong to *Photorhabdus luminescens* species in South African bacterial isolates.

**Key words:** Entomopathogenic nematodes, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*, biological control, RecA.

## TEŞEKKÜR

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve bana yol gösteren değerli danışman hocam Doç. Dr. Hatice KATI'ya ve birçok konuda yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Hüseyin YILMAZ'a,

Yüksek Lisans eğitimim sırasında tanıştığım, bana laboratuvarını açan, maddi, manevi hiçbir desteği esirgemeyen, hayat görüşüyle ilham veren, bilgi ve tecrübelerini paylaşan Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümünden tezimin ikinci danışmanı değerli hocam Prof. Dr. Selçuk HAZIR'a,

Tezimin moleküler çalışmalarında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesinden hayat dolu, sevgili hocam Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a,

Çalışmalarımın ve deneylerimin her basamağında yardımlarını esirgemeyen, moralimin her zaman yerinde olmasına ve güzel vakit geçirmeme vesile olan çok sevgili dostlarım Arş. Gör. Derya ULUĞ, Arife GÜMÜŞ ve Harun ÇİMEN'e,

Lisans ve Yüksek Lisans hayatım boyunca yardım ve dostluklarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Sibel ALTÜRK ve Burak KARACA'ya,

Tez çalışmamı FEF-14001 no'lu projeye destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimine,

Hayatımın her döneminde yanımda olan, desteklerini esirgemeyen, her düştüğümde kaldıran ve yoluma devam etmemi sağlayan çok sevgili annem Cemile GÜLŞEN'e, babam Yavuz GÜLŞEN'e, canım kardeşim Şule Melissa GÜLŞEN'e, halalarım Ayla GÜLŞEN ve Asuman ÖZÇELİK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



# İÇİNDEKİLER

|  |      |
|--|------|
| ÖZET.....  | I    |
| ABSTRACT.....  | III  |
| TEŞEKKÜR.....  | V    |
| İÇİNDEKİLER .....  | VI   |
| TABLolar DİZİNİ .....  | VIII |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....   | IX   |
| SİMGELER DİZİNİ.....   | X    |
| KISALTMALAR DİZİNİ.....  | XI   |
| 1. GİRİŞ .....   | 1    |
| 1.1. Nematodlar .....  | 1    |
| 1.2. Entomopatojenik Nematodlar (Fam: Steinernematidae ve Heterorhabditidae).4 |      |
| 1.2.1. Entomopatojenik Nematodların Hayat Döngüsü .....                        | 5    |
| 1.3. Entomopatojenik Nematod-Bakteri İlişkisi.....                             | 7    |
| 1.4. Tezin Amacı .....   | 15   |
| 2. MATERYAL VE METOT .....   | 16   |
| 2.1. Çalışmada Kullanılan Entomopatojenik Nematodlar.....                      | 16   |
| 2.1.1. Çalışmada Kullanılan Nematod Kültürlerinin Üretimi ve Saklanması.....   | 21   |
| 2.2. Çalışmada Kullanılan Bakteriler .....                                     | 22   |
| 2.2.1. Mutualistik Bakterilerin İzolasyonu.....                                | 22   |
| 2.2.2. Mutualistik Bakterilerin Saflaştırılması ve Saklanması .....            | 24   |
| 2.3. Moleküler Çalışmalar .....  | 24   |
| 2.3.1. Bakterilerden DNA İzolasyonu .....                                      | 24   |
| 2.3.2. İzole Edilen DNA'ların PCR Yöntemiyle çoğaltılması .....                | 25   |
| 2.3.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezinde Görüntülenmesi.....          | 27   |
| 2.3.4. Sekans Analizleri ve Filogenetik Çalışmalar .....                       | 27   |
| 3. ARAŞTIRMA BULGULARI .....   | 29   |
| 3.1. Çalışmada Kullanılan Mutualistik Bakterilerin İzolasyonu .....            | 29   |
| 3.2. Moleküler Çalışmalar .....  | 32   |
| 3.2.1. Sekans Analizleri ve Filogenetik Çalışmalar .....                       | 32   |

|                            |    |
|----------------------------|----|
| 4. TARTIŞMA VE SONUÇ ..... | 39 |
| 4.1. Tartışma.....         | 39 |
| 4.2. Sonuç.....            | 41 |
| <br>                       |    |
| KAYNAKLAR .....            | 42 |
| ÖZGEÇMİŞ .....             | 57 |

## TABLÖLAR DİZİNİ

### TABLO

|  |    |
|--|----|
| 2.1. Çalışmada Kullanılan Nematodlara İlişkin Bilgiler.....                    | 16 |
| 2.2. PCR reaksiyonunda kullanılan malzemelerin konstantasyon hesaplaması ..... | 26 |
| 3.1. <i>Xenorhabdus</i> Cinsi Bakterilerin Benzerlik Oranları (%).....         | 36 |
| 3.2. <i>Photorhabdus</i> Cinsi Bakterilerin Benzerlik Oranları (%).....        | 38 |

# ŞEKİLLER DİZİNİ

## ŞEKİL

|   |    |
|---|----|
| 1.1. Entomopatojenik nematodların hayat döngüsündeki 6 evre .....   | 5  |
| 1.2. Entomopatojenik nematodlarda mutualistik bakterilerin taşındıkları bölgeler...   | 6  |
| 1.3. Entomopatojenik nematodların genel yaşam döngüsü.....  | 7  |
| 2.1. Motorlu doku homojenizatörü kullanılarak nematodların parçalanması .....   | 23 |
| 3.1. <i>Xenorhabdus</i> cinsi bakterilerin NBTA ortamında oluşan koloni görünümü ....   | 29 |
| 3.2. <i>Photorhabdus</i> cinsi bakterilerin NBTA ortamında oluşan koloni görünümü...  | 30 |
| 3.3. <i>Xenorhabdus</i> cinsi bakterilerin Gram boyamadan sonra ışık mikroskobu altındaki görüntüsü.....                              | 31 |
| 3.4. <i>Photorhabdus</i> cinsi bakteriler ve inclusion cisimciklerinin Gram boyamadan sonra ışık mikroskobu altındaki görüntüsü ..... | 31 |
| 3.5. PCR ürünlerinin elektroforez görüntüsü .....   | 32 |
| 3.6. <i>Xenorhabdus</i> cinsi bakteriler için oluşturulan filogenetik ağaç.....   | 33 |
| 3.7. <i>Photorhabdus</i> cinsi bakteriler için oluşturulan filogenetik ağaç.....  | 34 |

## SİMGELER DİZİNİ

| <b>Simge</b>  | <b>Açıklama</b> |
|---------------|-----------------|
| $\mu\text{m}$ | Mikrometre      |
| ml            | Mililitre       |
| dk            | Dakika          |
| gr            | Gram            |
| mM            | Milimolar       |
| M             | Molar           |
| mg            | Miligram        |
| $\mu\text{l}$ | Mikrolitre      |
| pmol          | Pikomol         |
| C             | Santrigrat      |

## KISALTMALAR DİZİNİ

| <b>Kısaltma</b>               | <b>Açıklama</b>              |
|-------------------------------|------------------------------|
| H <sub>2</sub> O              | Su                           |
| DNA                           | Deoksiribonükleik asit       |
| UV                            | Ultraviole                   |
| dH <sub>2</sub> O             | Distile Su                   |
| Taq DNA Pol                   | Taq DNA Polimeraz enzimi     |
| IJ                            | İnfektif Jüvenil             |
| MgCl <sub>2</sub>             | Magnezyum Klorür             |
| dNTP mix                      | Deoksiribonükleotid karışımı |
| RecA                          | Rekombinant A gen bölgesi    |
| PCR                           | Polimeraz Zincir Reaksiyonu  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Hidrojen Peroksit            |

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Nematodlar

Nematodlar; çoğunlukla mikroskobik canlılardır ve boyutları 5 cm'nin altındadır. Fakat bazı parazitik türleri 1 metreye kadar ulaşabilir (Ruppert ve ark., 2004). Uzun ve silindirik bir vücut yapısına sahip olduklarından, genellikle yuvarlak solucanlar veya iplikçi solucanlar olarak isimlendirilirler (Stock ve ark., 2009). Vücut yüzeylerinde çoğunlukla halkalar veya çıkıntılar bulunur (Weischer ve ark., 2000).

Vücutları bilateral, baş kısımları ise radyal simetriye sahiptir. Ağız genellikle iç kenarları üzerinde bir dizi diş taşıyan üç veya altı dudaktan oluşur (Barnes, 1980). Papilla adı verilen duyu organları genellikle vücudun ön kısmında bulunur. Ayrıca bir çift yan duyu çukuru (amphid), kuyruk tarafında da papillalar ve 'Phasmid' denilen yapılar bulunur. Bu karakterlerin sayısı ve dizilimleri tür teşhisinde oldukça önemlidir (Hominick ve ark., 1997; Kaya ve Stock, 1997).

Sindirim, boşaltım, üreme, sinir ve kas sistemleri vardır. Fakat dolaşım ve solunum sistemleri bulunmaz (Viglierchio, 1991). Sindirim sistemleri nematodların çoğunda iyi gelişmiştir ve ağız, stoma, özofagus, bağırsaklar, rektum ve anüsten oluşur (Koppenhöfer, 2000). Boşaltım sistemleri ise çok basit yapılı hücre gruplarından oluşmuştur. Serbest yaşayan türlerde bu yapı 'rennet bezi' ismini alırken, parazit türlerin çoğunda 'H' veya 'U' benzeri yanal kanallar sistemi şeklindedir. Nematodlarda boşaltım sisteminin görevi azotlu birleşiklerin atılması ve vücut boşluğunun turgor basıncını ayarlamaktır (Viglierchio, 1991). Nematodların sinir sistemi özofagusu çevreleyen bir sinir halkası (nerve ring) ve buradan çıkıp arkaya ve öne doğru uzanan sinir iplikçiklerinden oluşur (Maggenti, 1981).

Yalancı tip vücut boşluğuna (pseudosöloom) sahiptirler ve bu sebeple vücut yapıları tüp içinde tüp gibidir. Dolaşım faaliyetlerini bu yalancı tip vücut boşluğu, solunumlarını ise nemli vücut yüzeyleri vasıtasıyla yaparlar (Koppenhöfer, 2007). Nematodların vücut yüzeyleri kollajen yapıda kalın bir kutikula ile kaplıdır. Bu kutikula genellikle kompleks bir yapıdadır ve birkaç katmandan oluşabilir (Barnes, 1980). Nematod kutikulası biyotik (parazit, patojen ve predatör gibi) ve abiyotik

(toprak partikülü, kimyasallar gibi) faktörlere karşı bariyer görevi görür. Bu kutikula yarı geçirgen bir membrandır ve sıvıların, nematodun vücudu ile dışarı arasında geçişini sağlar. Bu sayede nematod ile çevresi arasında doğrudan ilişki sağlanır. Nematodun bütün yüzeyi kutikula ile sarılmıştır ve stoma, farinks, rektum, vulva, kloak, boşaltım deliği kanalı ve belirli duyu organlarını içerir (Chen ve ark., 2004).

Çoğu nematod, erkek ve dişi bireylere sahip olan dioik türlerdir. Her iki cinsiyette de bir veya iki adet tüp şeklinde gonad bulunur. Erkeklerde her testis geniş bir sperm kanalına ve bu kanal da kloakla ilişkili bir glandular kanala açılır (Barnes, 1980). Erkekler çiftleşme organı olarak görev yapan bir çift spiküle sahiptirler. Ayrıca sklerotize olmuş çiftleşmede rol oynayan gubernakulum adı verilen bir yapı mevcuttur. Bazı familyalarda (Heterorhabditidae, Strongyloidea) erkek bireylerin arka uçları 'bursa' diye adlandırılan şemsiye şeklinde bir kese meydana getirir (Kaya ve Stock, 1997). Dişilerde bir veya iki yumurtalık bulunur. Yumurtalıklar önce bir yumurta kanalı ve ardından uterusu açılır. Daha sonra bu iki yumurtalık ventral yüzeyin ortasında bulunan vulvaya açılır (Barnes, 1980). Üreme çoğunlukla eşeylidir ve erkekler dişilerden daha küçüktür. Erkekler genellikle dişiye tutunmayı sağlayan karakteristik, bükük bir kuyruğa sahiptirler. Çiftleşme sırasında bir veya daha fazla sayıdaki spikül (erkek üreme organı) kloaktan dışarı çıkarak dişinin genital açıklığına sokulur. Sperm ameboid hareket ederek dişi bireye aktarılır. Serbest yaşayan türlerde yumurtadan çıkan larvalar (daha az gelişmiş bir üreme sistemi dışında) erginlerle çok benzerlik gösterirler. Fakat parazitik nematodların yaşam döngüleri çok daha karmaşıktır (Lalošević ve ark., 2013).

Farklı üreme şekilleri gösteren bazı nematod türleri de bulunmaktadır. Örneğin, *Heterorhabditis* türlerinin üremesinde 'endotokia matricida' adı verilen ve maternal ölüme sebep olan bir aşama bulunmaktadır. Bu nematod türlerinin birinci jenerasyonu hermafrodittir ve kendiliğinden döllenmiş yumurtalarını açılana kadar uterusu tutarlar. Uterusta açılan yumurtalardan çıkan juveniller dişi bireyi yiyerek parçalar ve dışarı çıkarlar. Bu olay genellikle besin kaynaklarının yeterli olmadığı durumlarda görülür (Johnigk ve Ehlers, 1999). Farklı üreme şekillerine bir diğer örnek ise hayvanlar arasında çok nadir olarak görülen, erkek birey ve hermafrodit bireyler bir arada bulunduğu androdioik tip üremedir. Bu üreme tipi model organizmalar olarak da bilinen *Caenorhabditis elegans* ve *C. briggsae* türlerinde



görülür. Buna ek olarak bazı nematod türlerinde birden fazla üreme şekli bir arada görülebilir. Örneğin, *Meloidogyne* cinsi kök-ur nematodları eşeyli üreme, fakültatif eşeyli üreme, mayotik ve miyotik partenogenez gibi birçok farklı üreme şeklini bir arada bulundurabilir. *Mesorhabditis* cinsi nematodlarda ise ender bir partenogenez şekli görülür. Bu tip üremede sperm üreten erkek birey dişiyle çiftleşir fakat sperm yumurtaya girmez. Yumurtanın bölünmeye başlaması için spermin yumurta yüzeyine değmesi yeterlidir. Fakat sperm ile yumurta birleşmediğinden erkek bireyin genetik materyali yavru bireye aktarılmaz. Böylece yeni doğan nesil annenin klonu olur (Barnes, 1980).

Nematodlar, denizler ve tatlı suların yanı sıra sıcak su kaynakları, çok yüksek veya alçak bölgeler, buzullar ve çöller gibi ekstrem şartlara sahip ortamlar da dahil olmak üzere neredeyse bütün ekosistemlerde yaşayabilen hayvanlardır ve dünyanın litosfer tabakasının her yerinde bulunabilirler (Kaya, 1993 ; Borgonie ve ark., 2011).

Nematodlar yeryüzünde en çok birey sayısına sahip hayvanlardır. Dünya üzerindeki her 5 çok hücreli canlıdan 4'ünün nematod olduğu düşünülmektedir (Crow, 2002). Nematod türlerinin birbirinden ayırt edilmesi çok zordur ve yarısından çoğu parazitik olmak üzere 25.000'in üzerinde tür tayin edilebilmiş olmasına rağmen, toplam tür sayısının 1.000.000 civarı olduğu tahmin edilmektedir (Hodda, 2011; Zhang, 2013). Nematodların büyük çoğunluğu bakteri, fungus, küçük hayvanlar ve ölü organizmalarla beslenir. Çok az bir bölümü ise hayvan ve bitki patojenidir. Bunlardan böcek patojeni olanlar zararlı böceklerle mücadelede aktif olarak kullanılmaktadırlar. Böcek ile nematod arasındaki ilişki rastlantısal, zorunlu, kommensal veya parazitik olabilir (Kaya, 1993). Günümüzde 30 nematod familyasının, böcekler ve diğer omurgasız hayvanlarla ilişki içinde olduğu bilinmektedir (Stock ve Hunt, 2005). Bu familyalardan; Mermithidae ve Tetradenematidae (Ordo: Stichosomida); Allantonematidae, Phaenopsitylenchidae ve Sphaerulariidae (Ordo: Tylenchida); Heterorhabditidae ve Steinernematidae (Ordo: Rhabditida) familyaları böceklerin biyolojik kontrolünde kullanılma potansiyeline sahip olanlardır (Koppenhöfer, 2007). Bunların içinde Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarına ait olanlar kitlesel üretime uygundur ve bu nematodları ticari bir ürün olarak piyasada bulmak mümkündür. Dünyanın birçok

yerinde bu nematodlar “böcek patojeni”, “böcek paraziti”, “entomopatojenik” ya da bazen sadece “faydalı nematodlar” olarak adlandırılırlar (Crow, 2002).

## **1.2. Entomopatojenik Nematodlar (Fam: Steinernematidae ve Heterorhabditidae)**

Entomopatojenik nematodlar (EPN), böceklerin ölümüne sebep olan bir nematod grubudur. Entomopatojenik terimi Yunanca kökenlidir. ‘Entomon’ kelimesi böcek, ‘patojen’ ise hastalık yapan anlamına gelir. Farklı canlı türlerine zarar veren birçok nematod türü bulunmasına rağmen entomopatojenik nematodlar sadece böceklere zarar verirler. Entomopatojenik nematodlar, enfekte ettikleri böceğin içinde parazit olarak yaşadıklarından endoparazit olarak adlandırılırlar. Güve, kelebek, sinek ve böcek larvaları hatta yetişkin çekirge ve Ağustos böcekleri gibi toprakta yaşayan birçok farklı böcek türünü enfekte edebilirler. Entomopatojenik nematodlara dünyanın her yerinde ve birçok farklı habitatta rastlanmıştır. Steinernematid ve Heterorhabditidler zararlı böceklerin biyolojik kontrolünde kullanılmaya uygun olduklarından en çok çalışılan familyalardır (Kaya ve Gaugler, 1993).

Entomopatojenik nematodların moleküler filogenetik verilere göre hazırlanan sınıflandırması şöyledir (Blaxter ve ark., 1998):

\* Regnum: Animalia

\* Phylum: Nematoda

\* Class: Secernentea

\* Subclass: Rhabditia

\* Ordo: Rhabditida

\* Subordo: Cephalobuna

\* Superfamilya: Strongyloidea

\* Familya: Steinernematidae

\* Subordo: Rhabditina

\* Superfamilya: Rhabditoidea

\* Familya: Heterorhabditidae

Günümüze kadar bu iki familyaya ait 3 adet cins bulunmuştur. Bunlardan Steinernematidae familyasına bağlı ikisi *Steinernema* ve *Neosteinerema* olarak adlandırılırken, Heterorhabditidae familyasına bağlı cins ise *Heterorhabditis* olarak adlandırılmaktadır. Steinernematidae familyasına bağlı 87'den fazla tür tanımlanmıştır, bunlardan sadece bir tanesi *Neosteinerema* cinsine aittir. Heterorhabditidae familyasına bağlı 18 tür tanımlanmıştır (Stock ve Goodrich-Blair, 2012).

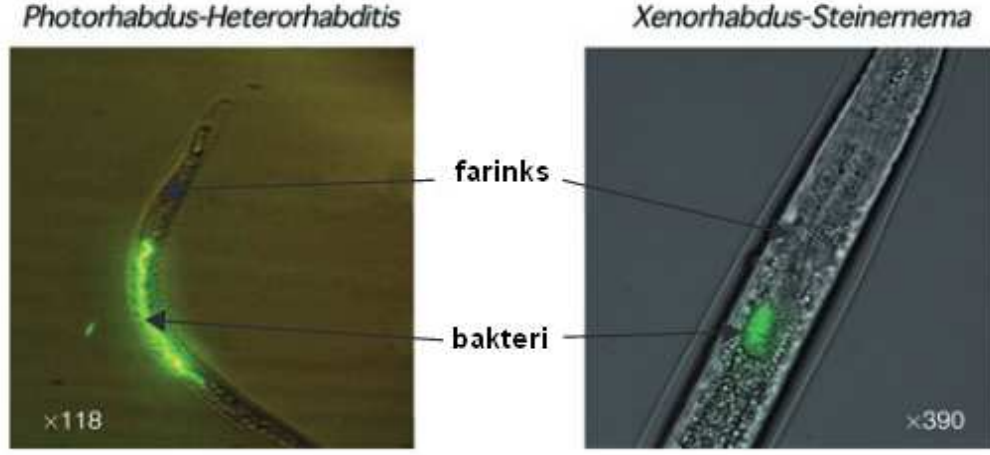
### 1.2.1. Entomopatojenik Nematodların Hayat Döngüsü

Ekonomik önemleri nedeniyle Heterorhabditidae ve Steinernematidae familyalarının hayat döngüleri üzerine birçok araştırma yapılmıştır. Bunlarda yumurta, 4 farklı morfolojik larval dönem ve ergin dönem olmak üzere toplam 6 evre vardır (Kaya, 1993) (Şekil 1.1). Nematodların toprakta serbest olarak yaşayan tek evresi olan 3. juvenil (J3) evresi “infektif juvenil (IJ)” evre olarak adlandırılır. Nematodlar bu evredeyken beslenmez ve gelişmezler (Kaya ve Gaugler, 1993).

Yumurta evresi → J1 → J2 → J3 (IJ) → J4 → Ergin evre

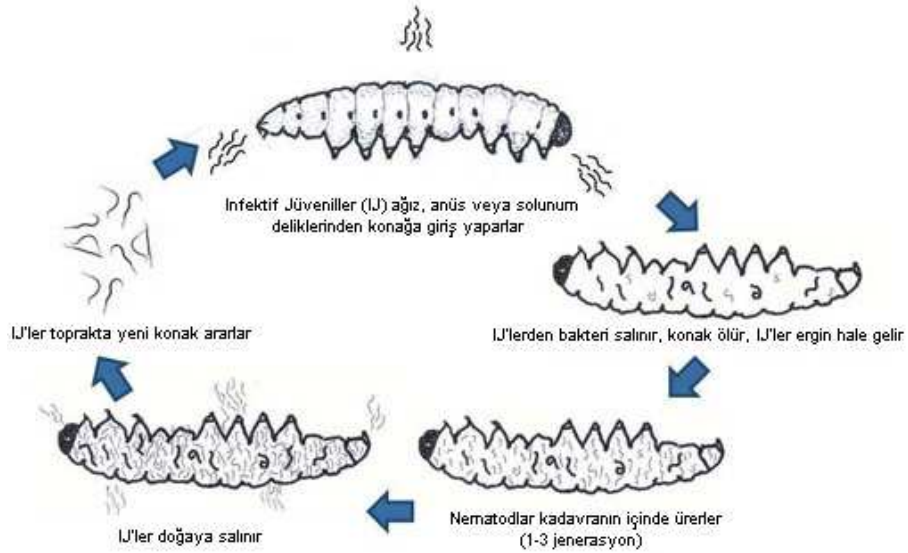
**Şekil 1.1.** Entomopatojenik nematodların hayat döngüsündeki 6 evre (Kaya, 1993) (J: Juvenil, IJ: İnfektif Juvenil).

İnfektif juveniller, böceğe ağız, anüs gibi açıklıklardan veya sadece Heterorhabditlere özel olarak kutikulanın ince kısımlarından giriş yaptıktan sonra, taşıdıkları mutualistik bakteriler salınır. *Steinernematid*’lerde *Xenorhabdus*, *Heterorhabdit*’lerde ise *Photorhabdus* cinsi bakteriler bulunur. Bu bakteriler *Steinernema* cinsine ait türlerde infektif juvenillerin bağırsaklarının ön kısmındaki özel bir kesede bulunurken, *Heterorhabditis* cinsine ait türlerde ise bağırsağın özellikle ilk 1/3’lük kısmında yoğun olarak taşınmaktadırlar (Martens ve Goodrich-Blair, 2005) (Şekil 1.2).



**Şekil 1.2.** Entomopatojenik nematodlarda mutualistik bakterilerin taşındıkları bölgeler (Goodrich-Blair ve Clarke, 2007).

Nematodlardan salınan mutualistik bakteriler, böcek hemolenfi içinde üremeye ve saldıkları toksinler ile böceği öldürmeye başlarlar. Nematodlar, bakteriler için sığınak görevi görürken bakteriler de bunun karşılığında konak böceği öldürerek nematodlara besin kaynağı oluşmasını sağlarlar. Nematod ve bakteri, birlikte konakla beslenir ve kadavranın içinde 1-3 nesil çoğalır (Wang ve Bedding, 1996; Cagnolo ve ark., 2004). *Steinernematid* infektif juvenilleri dişi veya erkek olabilirken *Heterorhabdit*'ler ilk jenerasyonda hermafrodittir, daha sonraki nesillerde cinsiyet ayrımı oluşur. Steinernematidlerde bunun tek istisnası, ilk jenerasyonda hermafrodit bireylere de rastlanmış olan *Steinernema hermaphroditum* türüdür (Stock ve ark., 2004). *Heterorhabditis* cinsinde birinci nesilden sonraki nesillerde hermafroditlerle birlikte ayrı eşeyli bireyler de görülmektedir (Gaugler ve Kaya, 1990). Konaktaki besin kaynağı tükenince yetişkinler tekrar dış çevre koşullarında yaşamaya uygun olan infektif juvenilleri üretirler. Kadavranın iç ortamından aldıkları mutualistik bakterileri taşıyan yüzbinlerce infektif juvenil yeni konak aramak için kadavradan çıkış yaparlar (Boemare, 2002).



**Şekil 1.3.** Entomopatojenik nematodların genel yaşam döngüsü (Arthurs, 2012).

### 1.3. Entomopatojenik Nematod-Bakteri İlişkisi

Daha önceki bölümde de bahsedildiği gibi *Steinernematid*'lerde *Xenorhabdus*, *Heterorhabdit*'lerde ise *Photorhabdus* cinsi bakteriler bulunur. Yapılan taksonomik çalışmalara göre her entomopatojenik nematod türü yalnız bir bakteri ile mutualistik ilişki içerisinde bulunabilirken, mutualistik bakteriler birden fazla nematod türü ile ilişkili olabilmektedir (Hazir ve ark., 2003). Bu mutualistik ilişkilerin ilk defa yaklaşık 350 milyon yıl önce Orta Paleozoikte, *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* soylarını oluşturacak Gram-negatif enterik bakteriler (Enterobacteriaceae) ile *Heterorhabdit* ve *Steinernematid*'lerin ataları arasında birbirinden bağımsız olarak başladığı düşünülmektedir. Bakteriler bu mutualistik ilişkide hem dış ortamdaki çevre şartlarından ve topraktaki rekabet ortamından korunur hem de kendilerini besince zengin böcek dokusuna taşıtırlar (Adams ve ark., 2006). Bu iki bakteri cinsi de nematodlarla mutualistik yaşam gösterir ve böcek patojenidir. Ancak genetik ve fizyolojik çalışmalar bu iki bakterinin bu roller için farklı yöntemler kullandığını ortaya koymuştur. Bu sebeple bu iki bakterinin farklı kökenlerden gelip aynı çevre koşullarında yaşamaya uyum sağladığı düşünülmektedir (Goodrich-Blair ve Clarke, 2007; Griffin ve ark., 2001; Poinar, 1993).

*Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* cinsi bakterilerin sınıflandırması şöyledir (Thomas ve Poinar, 1979; Fischer-Le Saux ve ark., 1999):

\* Regnum: Bacteria

\* Phylum: Proteobacteria

\* Class: Gammaproteobacteria

\* Ordo: Enterobacteriales

\* Familya: Enterobacteriaceae

\* Genus: *Xenorhabdus*

\*Genus: *Photorhabdus*

*Xenorhabdus* ve *Photorhabdus*'lar Gram-negatif, basil morfolojili, sporlanmayan, fakültatif anaerobik, oksidaz negatif, kemoorganik heterotrof solunum yapan, fermentif metabolizmaya sahip ve çeşitli böceklere karşı patojen olan enterobakterilerdir (Thomas ve Poinar, 1979; Akhurst, 1983; Forst ve Clarke, 2002; Boemare ve Akhurst, 2006).

İki bakteri cinsinin de fenotipik olarak farklı formları bulunmaktadır. Doğal form Faz I olarak adlandırılır ve yalnızca ilişkili oldukları nematodlarda bulunur. İkincil form yani Faz II bakteriler ise bakteri yapay ortamda üretildiği zaman kendiliğinden ortaya çıkmaktadır. Bu iki faz arasında bazı fizyolojik ve morfolojik farklılıklar bulunmaktadır. Faz I'deki bakteriler antibiyotik üretebilmekte, belli boyaları absorblayabilmekte ve kristalleşmiş proteinlerden oluşan hücre içi inkülüzyon cisimciklerine sahiptirler. Faz II safhasındaki bakteriler ise bu özellikleri taşımazlar. Ürettikleri inkülüzyon cisimcikleri ise etkin değildir (Boemare ve Akhurst, 2006).

Pek çok benzer özelliklerinin yanı sıra bu iki cins arasında bazı farklılıklar da bulunmaktadır. Örneğin, pek çok *Photorhabdus* suşu biyoluminesens yapabilir ve katalaz pozitifdir. Oysa *Xenorhabdus* cinsi bakteriler her iki özelliğe de sahip değildir (Boemare ve Akhurst, 2006). Ayrıca *Xenorhabdus*'lar *Steinernematid* nematodların 3. evre juvenillerinde (IJ), bağırsakta bulunan özel bir kesede taşınırken, *Photorhabdus*'lar *Heterorhabdit*'lerin bağırsaklarında kolonize olurlar (Bird ve Akhurst, 1983; Snyder ve ark., 2007; Waterfield ve ark., 2001; Clarke, 2008).

Benzer yaşam tarzlarına rağmen, *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus*'lar moleküler mekanizmalar açısından da farklılık gösterirler (Goodrich-Blair ve Clarke, 2007). Örneğin; iki bakteri türü de böceğin bağışıklık sistemi tarafından sentezlenen antimikrobiyal peptit (AMP)'lere karşı dirençlidirler fakat bunun için ikisi de farklı yöntemler kullanırlar. *Photorhabdus*'lar lipopolisakkarit modifikasyonu yaparak konak kaynaklı AMP'lere direnç oluştururken (Bennett ve Clarke, 2005; Derzelle ve ark., 2004; Eleftherianos, 2006), *X. nematophila* böceğin AMP sentezinin başlamasına tamamen engel olur (Ji ve Kim, 2004; Park ve ark., 2007). Bu genetik ve moleküler farklılıklar, iki bakterinin morfolojileri ve yaşam tarzlarına da yansımaktadır. *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus*'ların II'lerde farklı bölgelerde taşınmaları buna örnektir. Ayrıca, *P. luminescens* bakterisinin *H. bacteriophora*'nın II'lerine aktarılması için, bakterinin maternal rektal bezlerde kolonize olması ve yumurtaların dişi bireyin içinde açılması buna başka bir örnektir (endotokia matricida) (Ciche ve ark., 2008). *Steinernema carpocapse*'de ne rektal bezlerde kolonizasyon nede endotokia matricida evresi görülmez. *Photorhabdus* bakterilerinin enfeksiyon esnasında belirli bir yol takip ettiği tespit edilmiştir. İlk olarak hemolenf içerisinde hızla üreyip böceğin immün sistemi yok edilmekte, daha sonra orta bağırsak içerisine çeşitli toksinler salınmaktadır. Enfeksiyonun ileri safhasında ise metallo-proteazlar salınarak bağırsak epiteli parçalanmakta ve dokular nematodların besleneceği hale getirilmektedir. *Photorhabdus* bakterileri mcf (make caterpillar floppy) geni tarafından kodlanan toksinlere sahiptir. Bu toksinler böceğin bağırsak dokusunu parçalamaktadır (Boemare ve Akhurst, 2006). *Xenorhabdus*'un konukçu dokusuna yerleşirken izlediği yol henüz tam anlaşılammıştır. Fakat hücre dış yüzeyinin lipopolisakkarit bileşenlerinden endotoksinler salgılayarak doku hücrelerini parçaladıkları tahmin edilmektedir (Adams ve ark., 2006).

*Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterileri pek çok ikincil metabolitin yanında faz durumlarına bağlı olarak bakteriosinler, böcek toksin kompleksleri (Tc's) ve kolisin E3 tip öldürücü proteinler üretmektedirler. Çünkü bu bakteriler kompleks hayat döngülerinde yalnızca konukçuyu öldürmekle kalmayıp, kadavrayı böceğin bağırsak florasından ve dışarıdan gelen diğer rekabetçi mikroorganizmalara karşı da savunmak zorundadırlar (Bode, 2009).

İnfektif juveniller konukçularını enfekte ettikten sonra mutualistik bakterileri konukçuyu 48 saat içerisinde septisemi nedeniyle öldürmektedir. Bundan sonraki dönemde nematodlar konukçu içerisinde gelişip üremeye başlarlar. Yeni nesil infektif juvenillerin çıkış yapmasına kadar geçen sürede (7-15 gün) kadavra toprağın içerisinde ya da üzerindedir. Bu esnada kadavra içerisinde gelişmekte olan nematodlar omnivorların veya yağmacıların saldırılarına açık vaziyettedir (Baur ve ark., 1998; Kaya, 2002). Muhtemelen böyle bir durumda omurgasız canlıların kadvraları diğer yağmacılar tarafından birkaç dakika veya saat içerisinde hızlı bir biçimde tüketilmektedir (Foltan ve Puza, 2009). Oysa mutualistik bakteriler (özellikle de *Photorhabdus* türleri) tarafından üretilen ve “Yağmacı Uzaklaştırıcı Faktör (SDF)” olarak adlandırılan bir madde nedeniyle yağmacı organizmalar nematodla enfekte kadvralardan uzak tutulmaktadır (Gulcu ve ark., 2012).

Böceklerin nematodlara gösterdikleri tepki birbiriyle etkileşim halinde olan hücrel ve humoral eylemlerden (fagositoz, nodül oluşumu, hücrel veya melanotik kapsülleme, antimikrobiyal peptid üretimi) oluşmaktadır. İlk aşamada gösterilen tepki nematodlara yöneliktir. Çünkü bakteriler bu esnada zaten nematodun içerisinde bulunmaktadır. Ancak bakteriler nematodun konukçuya girmesinden sonraki 30 dakika ile 5 saat arasında böcek hemosölüne bırakılırlar (Dowds ve Peters, 2002). Böcekler nematodların mutualistik bakterilerini fagosite ederek, granülositler tarafından nodül içerisine alarak veya sekropin gibi antimikrobiyal peptidler ile yok etmeye çalışmaktadır. Ancak bakteriler nodül içerisinde de çoğalmaya devam edebilmektedir. Eğer nodül yapısı uygun ise tekrar hemolenfe çıkararak, konukçuyu öldürmektedirler. Nematod-bakteri birlikteliği böceğin bağışıklığına karşı ortak hareket etmektedir. Nematodlar melanin oluşumu için gerekli pro-feniloksidaz salınımını ve bununla beraber hemolenfteki antimikrobiyal aktiviteyi inhibe etmektedir. Bakteriler ise enzimatik aktiviteler ile böceğin bağışıklığını bozmaktadır. Örneğin *X. nematophila*'nın lipopolisakkaritleri feniloksidaz aktivasyonunu baskılamaktadır. Ayrıca bu bakterinin lipid A molekülü hemositlere toksik etki yapmaktadır (Dowds ve Peters, 2002; Ciche ve ark. 2006). Mutualistik bakteriler aynı zamanda konukçuyu paralize eden ekzotoksinler, sitotoksinler ve hücre dışı proteolitik enzimler üretebilmektedir (Boemare ve ark., 1997; Forst ve ark., 1997).



Bakteriler kadavra içerisinde hızla çoğalırken, üreme safhalarının sonuna doğru, ortamı diğer mikroorganizmaların istilasına karşı koruyacak çeşitli antimikrobiyal bileşikler de üretmeye başlarlar. Bu bileşikler diğer bakteri, fungus ve mayalara karşı etkili olan antibiyotikleri, *Photorhabdus* türlerine yakın bakterilere karşı aktif olan lumisinler ve xenorhabdisin gibi bakteriosinleri içermektedir (Webster ve ark., 2002; Sharma ve ark., 2002; Thaler ve ark., 1995). Bakteriosinlerin varlığı nematodla aralarındaki mutualizm açısından önemlidir. Enfeksiyonlara karşı klasik anlamda bir koruyuculuk sağlamasa da aynı çevrede bulunan diğer bakterileri öldürerek, besin rekabetinde avantaj sağlarlar (Hancock ve Diamond, 2000). Bu sayede rekabete girebilecek benzer bakteri gruplarına üstünlük sağlanmış olur. Lumisinler diğer *Photorhabdus* türleri dışında, filogenetik olarak da uzak bir tür olan *Escherichia coli*'ye karşı da etkilidir. Böylece bu bakteriosinlerin böceğin bağırsak florasının temizlenmesinde de rol oynadıkları düşünülmektedir (Sharma ve ark., 2002).

*Photorhabdus* bakterilerinin faz I evrelerinde ürettikleri pek çok ikincil metabolitten özellikle antimikrobiyal özelliğe sahip olanları hidroksi-stilben ve poliketidler (Antraquinon türevleri) olmak üzere iki farklı grup kimyasal tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda bazı *Photorhabdus luminescens subsp. luminescens* ve *P. temperata* izolatlarının *in vitro* şartlarda antibakteriyal antraquinone pigmentlerini ve hem antibakteriyal hem de antifungal özelliğe sahip trans-stilben maddesini ürettikleri tespit edilmiştir (Boemare ve Akhurst, 2006; Bode ve ark., 2007). Aynı zamanda *Photorhabdus* bakterileri faz I evrelerinde pigment de üretmektedir. Bakteri soylarına göre renklenme değişiklik göstermekle birlikte bu pigmentten dolayı enfekte kadvralar genelde kırmızı renkli olmaktadır (Boemare ve Akhurst, 2006). *Photorhabdus*, izopropylstilben (isopropylstilbenes) ve etilstilben (ethylstil-benes), antraquinon (antraquinones-AQs) ve sidrofor fotobaktin (siderophorephotobactin) ürettiği bilinen tek bakteri cinsidir (Bode, 2009). Özellikle stilbenler ve AQ'ler çok basit bileşiklerdir; fakat sıra dışı bir biyosentezin sonucunda kompleks bir ekolojik rolleri vardır. Oysa stilbenler tipik bitki metabolitleridirler (örneğin üzümdeki veya kırmızı şaraptaki resveratrol gibi). *Photorhabdus* bakterileri bitkiler alemi dışında stilben üretebilen tek canlıdır. Stilbenler Gram-pozitif bakterilere ve funguslara karşı antibiyotik aktivite gösterirler, böceklerin immün

sistemindeki fenol-oksidadları inhibe ederler ve nematodların tam bir gelişim göstermeleri için gerekli sinyal molekül olarak görev yaparlar (Bode, 2009).

Anthraquinone'lar ise bitki, fungus ve bakterilerdeki yaygın metabolitlerdir. Genel olarak karınca ve kuşları uzaklaştırıcı özellikleriyle bilinen bu bileşik sınıfının *Photorhabdus* bakterileri için önemli bir ekolojik duruma hizmet ettikleri varsayılmaktadır (Pankewitz ve Hilker, 2008; Bode, 2009). *Photorhabdus* bakterilerince üretilen AQ'lar biyokimyasal olarak poliketid sentaz (PKS) tip-2 mekanizmasıyla meydana getirilmektedir. Şimdiye kadar farklı *Photorhabdus* soylarından 7 tane AQ tanımlanmıştır. Bunlardan 5'i yapay ortamda üretilen bakterilerden elde edilmişken, diğer 2 bileşik yalnızca böcek larvasındaki *Photorhabdus* kültürlerinden izole edilmiştir (Bode ve ark., 2007). *Photorhabdus* bakterileri Gram-negatif bakteriler içerisinde PKS tip-2 mekanizmasına sahip ikinci örnektir (Bode, 2009).

Buna ek olarak bazı *Photorhabdus* soyları tarafından üretilen protein toksinlerinin oral yolla ya da enjeksiyon yoluyla pek çok böcek türüne etkili olması son yıllarda biyolojik mücadelede bunlara olan ilgiyi artırmıştır. Her ne kadar oral enfeksiyonun *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus*'un biyolojisinde önemli olmadığı düşünülse de, toksin kompleksleri (Tc's) ve *Photorhabdus* böcek-ilişkili (Pir) toksinlerin her ikisi de bazı böcek türlerine karşı oral aktiviteye sahiptir. Bunların aksine tırtıl yumuşatıcı (make caterpillar floppy) toksinler mcf1 ve mcf2 ile PVCs (*Photorhabdus* virulence cassettes) toksinlerinin her ikisi de enjeksiyon yoluyla etkin olabilmektedir (Boemare ve Akhurst, 2006; Ffrench-Constant ve ark., 2007). Toksin kompleksleri (Tc's) yüksek moleküler ağırlığa sahip, birden fazla alt ünitesi bulunan Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen insektisit özelliğine sahip toksinlerdir. Bunu kodlayan genler ilk olarak entomopatojenik nematodlar ile ilişkili *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* bakterilerinde tanımlanmıştır. Bunun ardından toksin komplekslere benzer lokuslar tamamen böceklerle ilişkili (*Serratia entomophila* vb.) veya böceklerle belirli bir ilişkisi bulunmayan bir dizi bakteride de tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalar ile toksin kompleksler pek çok kromatografi basamağıyla Tca, Tcb, Tcc ve Tcd olarak adlandırılmış 4 farklı komplekse ayrılmıştır. Saflaştırılmış Tca'nın *Bacillus thuringiensis* tarafından yapılan  $\delta$ -endotoksin gibi böceğin orta

bağırsağının epitelyumunu parçaladığı tespit edilmiştir (Ffrench-Constant ve ark., 2007).

Faz I evresindeki *Xenorhabdus* bakterileri için şimdiye kadar bilinen ikincil metabolit moleküller çoğunlukla benzilidenaseton (benzylideneacetone), iodyin (iodinine), fenetilamid (phenethylamides) ve indol (indole) türevleridir. Ancak bunun yanında hibrid PKS/NRPS sisteminden köken almış Xenorhabdins, Xenorxides (oksidlenmiş Xenorhabdinler) ve Xenocoumacins (XCNs) gibi daha kompleks bileşikler de bilinmektedir. Basit yapılarına rağmen bu bileşiklerin farklı biyolojik aktiviteleri tanımlanmıştır (Boemare ve Akhurst, 2006; Bode, 2009).

Günümüzde *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterilerinin ürettiği antimikrobiale maddeler ve toksinler üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bir yandan bu antimikrobiyal maddelerin kimyasal yapıları tanımlanarak antibiyotik üretiminde kullanılmaları yönünde çalışmalar sürdürülürken, diğer yandan da bakterilerin ürettikleri toksinlerle biyopreparat yapımına yönelik araştırmalar hızla devam etmektedir (URL 1: [www.gamexp.eu](http://www.gamexp.eu)) (Nollmann ve ark., 2012; Zhou ve ark., 2013; Sahm ve ark., 2013). Farklı bakteri türü hatta izolatları farklı antimikrobiyal moleküller ve toksinler üretebildiği için araştırmacılar yeni özelliklere sahip *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakteri türü ve izolatları elde edilmesi yönünde çalışmalar yapmaktadırlar (Thanwisai ve ark., 2012).

*Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterilerinin tür teşhislerinde de diğer bakteri türlerinin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan 16S rRNA dizi analizleri kullanılmıştır (Boemare ve ark., 1993; Fischer-Le Saux ve ark., 1999; Tailliez ve ark., 2006, 2010). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterileri için RecA gen sekanslarının daha güvenilir sonuçlar verdiği belirtilmiştir (Tailliez ve ark., 2010; Thanwisai ve ark., 2012; Bode, 2009; Proschak ve ark., 2011; Chaston ve ark., 2011; Fuchs ve ark., 2011).

RecA proteini, tümü DNA bakım ve onarımı ile ilgili birçok görevi olan 38 kilodaltonluk bir proteindir (Little, 1984). RecA'nın DNA onarımındaki temel rolü bakteriyel transformasyondaki homolog rekombinasyon esnasındadır. Bakteriyel transformasyon DNA'nın bir bakteriden genellikle aynı tür olan başka bir bakteriye aktarılmasıdır. RecA proteini, alıcı ve verici bakteri arasındaki bu DNA alışverişi

esnasındaki homolog rekombinasyona aracılık etmektedir (Akamatsu ve Taguchi, 2001; Saito ve ark., 2006). RecA proteini bir nükleoprotein zinciri oluşturmak üzere DNA'nın tek zincirine kuvvetle bağlanır. Oluşan bu tek zincirli DNA ve RecA filamentleri dinamik nükleofilamentler olarak adlandırılır (Kidane ve Graumann, 2005). RecA proteininin DNA üzerinde birden fazla bağlanma bölgesi vardır ve bu nedenle de iki zinciri bir arada tutabilir. Bu özellik çift zincirli DNA ile tek zincirli komplementer DNA bölgesi arasında sinapsis reaksiyonu katalizlenmesini de mümkün kılar. RecA ve ssDNA ipliği kompleksi çift zincirli ana DNA boyunca homolog bölgeleri ararlar (Savir ve Tlusty, 2010; De Vlaminc ve ark., 2012). Michod ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda RecA aracılıklı transformasyonun homolog rekombinasyonel DNA hasarı tamiri için bir uyum yöntemi olduğunu kanıtlamışlardır. Transformasyon prokaryotlarda yaygındır ve şimdiye kadar 67 türün transformasyon yapabildiği tespit edilmiştir (Johnsborg ve ark., 2007). *Bacillus subtilis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Hemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* türleri ve *Xenorhabdus* ile *Photorhabdus* cinsleri bunlara örnektir (Michod ve ark., 2008).

#### 1.4. Tezin Amacı

Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarına ait entomopatojenik nematodların Güney Afrika Cumhuriyeti'ndeki çeşitliliği ve dağılımlarını belirlemek üzere 2003-2014 yılları arasında oldukça kapsamlı bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda alınan toprak örneklerinden 123 farklı nematod izolatu elde edilmiştir. Bunlar arasından 2003-2008 yılları arasında toplanan örneklerden elde edilen 76 nematod izolatının çeşitliliği ve dağılımları yayınlanmıştır (Hatting ve ark., 2009). Bu nematodlardan bir bölümünün de tür teşhisleri yapılmış ve 2 yeni entomopatojenik nematod türü *Steinernema tophus* n.sp. (Çimen ve ark., 2014a) ve *Steinernema innovationi* n. sp. (Çimen ve ark., 2014b) tanımlanmıştır. Ancak elde edilen bu yeni tür nematodların ve diğer entomopatojenik nematod izolatlarının mutualistik ilişkili oldukları bakterilerin izolasyon ve tür tanımlanmasına yönelik herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

Bu tez çalışması kapsamında Güney Afrika Cumhuriyeti topraklarından izole edilmiş olan tüm entomopatojenik nematodlara ait mutualistik bakterilerin izolasyonu ve moleküler olarak tanımlanması yapılmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Çalışmada Kullanılan Entomopatojenik Nematodlar

Bu çalışmada kullanılan nematodların tamamı entomopatojenik nematod olup Heterorhabditidae ve Steinernematidae familyalarına aittirler. Örnekler 2003-2014 yılları arasında Güney Afrika Cumhuriyeti'nin farklı bölgelerinden "insect-bait" yöntemi kullanılarak (Bedding ve Akhurst, 1975) izole edilmiştir. Toplamda 123 farklı nematod izolatu elde edilmiş olup bu izolatlar hem Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü Omurgasız Hayvanlar Laboratuvarında hem de Güney Afrika Cumhuriyeti'ndeki Small Grain Institute'de muhafaza edilmektedir (Hatting ve ark., 2009).

Çalışmada kullanılan nematodlara ait bilgiler Tablo 2.1'de verilmiştir.

**Tablo 2.1.** Çalışmada Kullanılan Nematodlara İlişkin Bilgiler

| İZOLAT | EPN                     | ŞEHİR     | YER                                | HABITAT/BÖCEK   | ÖRNEKLEME TARİHİ | KOORDİNAT                     |
|--------|-------------------------|-----------|------------------------------------|-----------------|------------------|-------------------------------|
| SGI-6  | <i>Steinernema</i>      | Bethlehem | Small Grain Inst.                  | Sürülmüş Tarla  | 25.06.2003       | S28°09'6.1"/<br>E28°17'22.1"  |
| SGI-21 | <i>Steinernema</i>      | Bethlehem | Utopia 3 (H <sub>2</sub> O) outlet | Çim alan        | 01.07.2003       | S28°10'48.4"/<br>E28°17'50.9" |
| SGI-22 | <i>H. bacteriophora</i> | Bethlehem | Utopia 4                           | Brokoli tarlası | 01.07.2003       | S28°10'44.6"/<br>E28°17'51.5" |
| SGI-28 | <i>Steinernema</i>      | Bethlehem | Denmar                             | Yabanmersini    | 15.07.2003       | S28°31'59.7"/<br>E28°10'35.3" |
| SGI-29 | <i>H. bacteriophora</i> | Bethlehem | Denmar                             | Yabanmersini    | 15.07.2003       | S28°31'59.7"/<br>E28°10'35.2" |
| SGI-32 | <i>H. bacteriophora</i> | Bethlehem | Denmar                             | Yabanmersini    | 15.07.2003       | S28°31'59.7"/<br>E28°10'35.5" |
| SGI-33 | <i>Steinernema</i>      | Bethlehem | Denmar                             | Kiraz bahçesi   | 15.07.2003       | S28°31'59.7"/<br>E28°10'31.5" |
| SGI-35 | <i>Steinernema</i>      | Bethlehem | Denmar                             | Kiraz bahçesi   | 15.07.2003       | S28°31'59.7"/<br>E28°10'31.5" |
| SGI-38 | <i>Steinernema</i>      | Bethlehem | Denmar                             | Kiraz bahçesi   | 15.07.2003       | S28°31'59.7"/<br>E28°10'31.5" |
| SGI-39 | <i>Steinernema</i>      | Bethlehem | Denmar                             | Kiraz bahçesi   | 15.07.2003       | S28°31'59.7"/<br>E28°10'31.5" |
| SGI-40 | <i>H. bacteriophora</i> | Bethlehem | Denmar                             | Kiraz bahçesi   | 15.07.2003       | S28°31'59.7"/<br>E28°10'31.5" |
| SGI-42 | <i>Steinernema</i>      | Bethlehem | Denmar                             | Kiraz bahçesi   | 15.07.2003       | S28°31'59.7"/<br>E28°10'31.5" |

**Tablo 2.1. (devam)**

| İZOLAT  | EPN                     | ŞEHİR       | YER                   | HABITAT/BÖCEK  | ÖRNEKLEME TARİHİ | KOORDİNAT                     |
|---------|-------------------------|-------------|-----------------------|----------------|------------------|-------------------------------|
| SGI-43  | <i>Steinemema</i>       | Bethlehem   | Denmar                | Kiraz bahçesi  | 15.07.2003       | S28°31'59.7"/<br>E28°10'31.5" |
| SGI-50  | <i>H. bacteriophora</i> | Bethlehem   | Denmar                | Yabanimersini  | 15.07.2003       | S28°31'59.7"/<br>E28°10'35.6" |
| SGI-58  | <i>Heterorhabditis</i>  | Bethlehem   | SGI (G1)              | Tahıl          | 16.07.2003       | S28°09'46.1"/<br>E28°17'21.5" |
| SGI-60  | <i>Steinemema</i>       | Bethlehem   | SGI (L16)             | Tahıl          | 16.07.2003       | S28°09'46.1"/<br>E28°17'21.2" |
| SGI-82  | <i>Steinemema</i>       | Bethlehem   | SGI (G8f)             | Tahıl          | 23.07.2003       | S28°09'46.1"/<br>E28°17'21.3" |
| SGI-90  | <i>H. bacteriophora</i> | Bethlehem   | Lone Tree Farm (B2)   | Elma bahçesi   | 24.07.2003       | S28°30'20.9"/<br>E28°6'38.0"  |
| SGI-91  | <i>H. bacteriophora</i> | Bethlehem   | Lone Tree Farm (A2)   | Elma bahçesi   | 24.07.2003       | S28°30'27.1"/<br>E28°6'39.2"  |
| SGI-96  | <i>H. bacteriophora</i> | Bethlehem   | Lone Tree Farm (D7/8) | Elma bahçesi   | 24.07.2003       | S28°30'5.7"/ E<br>28°6'41.4"  |
| SGI-145 | <i>Steinemema</i>       | Clanwilliam | Zeekoeivlei           | Rooibos        | 02.09.2003       | S32°10'38.5"/<br>E18°43'19.9" |
| SGI-148 | <i>Steinemema</i>       | Bethlehem   | ARC SGI               | Sürülmüş Tarla | 02.09.2003       | S31°47'54.1"/<br>E18°42'12.5" |
| SGI-152 | <i>Steinemema</i>       | Clanwilliam | Nuwedam               | Rooibos        | 03.09.2003       | S31°47'46.2"/<br>E18°43'5.8"  |
| SGI 164 | <i>H. bacteriophora</i> | Bethlehem   | OTK (67.2)            | Elma bahçesi   | 08.10.2003       | S28°17'26.6"/<br>E28°17'13.1" |
| SGI 165 | <i>H. bacteriophora</i> | Bethlehem   | OTK (61.23)           | Elma bahçesi   | 08.10.2003       | S28°17'26.1"/<br>E28°16'56.1" |
| SGI 166 | <i>H. bacteriophora</i> | Bethlehem   | OTK (98.23)           | Elma bahçesi   | 08.10.2003       | S28°17'43.7"/<br>E28°17'02.5" |
| SGI 170 | <i>H. bacteriophora</i> | Bethlehem   | Lone Tree farm (D5/6) | Elma bahçesi   | 14.10.2004       | S28°30'0.6"/<br>E28°06'31.9"  |
| SGI 172 | <i>H. bacteriophora</i> | Bethlehem   | Lone Tree farm (D5/6) | Elma bahçesi   | 14.10.2004       | S28°30'10.6"/<br>E28°06'31.9" |
| SGI 173 | <i>H. bacteriophora</i> | Bethlehem   | Lone Tree farm (D5/6) | Elma bahçesi   | 28.10.2004       | S28°30'10.6"/<br>E28°06'31.9" |
| SGI 178 | <i>H. bacteriophora</i> | Bethlehem   | Stead                 | Ahududu        | 17.01.2005       |                               |
| SGI 179 | <i>H. bacteriophora</i> | Bethlehem   | Stead                 | Ahududu        | 17.01.2005       |                               |
| SGI 180 | <i>H. bacteriophora</i> | Bethlehem   | Stead                 | Ahududu        | 17.01.2005       |                               |
| SGI 185 | <i>Steinemema</i>       | Bethlehem   | Small Grain Inst.     | Draadhoekke    | 25.11.2005       | S28°09'46.1"/<br>E28°17'21"   |
| SGI 188 | <i>Heterorhabditis</i>  | Bethlehem   | Small Grain Inst.     | Buğday tarlası | 04.12.2007       | S28°09.337/E02<br>8°17.626    |
| SGI 193 | <i>Heterorhabditis</i>  | Bethlehem   | Lettie' plot          | Otluk alan     | 23.02.2008       | S 28°14.279/ E<br>028°17.057  |
| SGI 194 | <i>Steinemema</i>       | Bethlehem   | SGI Fields            | Buğday tarlası | 20.02.2008       | S28°09.336/E<br>028°17.351    |

**Tablo 2.1. (devam)**

| İZOLAT  | EPN                    | ŞEHİR         | YER                    | HABITAT/BÖCEK                | ÖRNEKLEME TARİHİ | KOORDİNAT                  |
|---------|------------------------|---------------|------------------------|------------------------------|------------------|----------------------------|
| SGI 195 | <i>Steinemema</i>      | Bethlehem     | Lettie' plot           | Çim alan                     | 23.02.2008       | S 28°14.275/ E 028°17.080  |
| SGI 196 | <i>Steinemema</i>      | Bethlehem     | Willow farm            | Otlak                        | 06.08.2008       | S 28°12.755/ E 28°15.572   |
| SGI 197 | <i>Steinemema</i>      | Bethlehem     | Deemster Pty Ltd       | Çim alan                     | 07.08.2008       | S 28°10. 834/ E 28°17.725  |
| SGI 198 | <i>Steinemema</i>      | Bethlehem     | Saaibid farm           | Otlak                        | 07.08.2008       | S 28°10. 195/ E 28°17.086  |
| SGI 199 | <i>Steinemema</i>      | Bethlehem     | Boshof Farm            | Otlak                        | 07.08.2008       | S 28°05. 031/ E 28°16.924  |
| SGI 200 | <i>Heterorhabditis</i> | Bethlehem     | Boshof Farm            | Otlak                        | 07.08.2008       | S 28°05. 107/ E 28°16.922  |
| SGI 201 | <i>Heterorhabditis</i> | Kaallaagte    | Graskop farm           | Buğday tarlası               | 13.08.2008       | S 27°58.684/ E 28°22.241   |
| SGI 203 | <i>Heterorhabditis</i> | Reitz         | Rooigum                | Yonca                        | 13.08.2008       | S 27°56. 105/ E 28°23.594  |
| SGI 205 | <i>Heterorhabditis</i> | Reitz         | Graskop farm           | Buğday tarlası               | 13.08.2008       | S 27°58. 046/ E 28°22. 643 |
| SGI 206 | <i>Heterorhabditis</i> | Reitz         | Rooigum                | Buğday tarlası               | 13.08.2008       | S 27°55. 766/ E 28°23. 731 |
| SGI 207 | <i>Steinemema</i>      | Bethlehem     | Versien farm           | Buğday ve Yulaf              | 06.08.2008       | S 28°12. 07/ E 28°13. 647  |
| SGI 208 | <i>Steinemema</i>      | Hartz water   | Perseel                | Yonca                        | 03.12.2008       |                            |
| SGI 209 | <i>Heterorhabditis</i> | Hartz water   | Perseel                | Yonca                        | 03.12.2008       |                            |
| SGI 210 | <i>Steinemema</i>      | Paul Roux     | Rexford farm           | Şeker Kamışı ve Beyaz tırtıl | 09.12.2008       |                            |
| SGI 211 | <i>Heterorhabditis</i> | Bethlehem     | 2008 bollworm tria     | Buğday tarlası               | 12.12.2008       |                            |
| SGI 212 | <i>Steinemema</i>      | Paul Roux     | Rexford farm           | Şeker Kamışı ve Beyaz tırtıl | 09.12.2008       |                            |
| SGI 213 | <i>Steinemema</i>      | Hartswater    | Boshoffarp; Plot 2814  |                              | 26.11.2009       |                            |
| SGI 214 | <i>Steinemema</i>      | Bultfontein   | Nuwemoed &Poppieland   |                              | 01.12.2009       |                            |
| SGI 216 | <i>Steinemema</i>      | Virginia      | AB PienaarBdy          |                              | 10.12.2009       |                            |
| SGI 217 | <i>Heterorhabditis</i> | Hartswater    | Boshoffarp; Plot 2814  |                              | 17.02.2010       |                            |
| SGI 219 | <i>Steinemema</i>      | Bultfontein   | Rio                    |                              | 19.02.2010       |                            |
| SGI 220 | <i>Steinemema</i>      | Bultfontein   | Edna                   |                              | 09.03.2010       |                            |
| SGI 221 | <i>Steinemema</i>      | Lindley       | Aandeking &Williesdeel |                              | 24.03.2010       |                            |
| SGI 222 | <i>Steinemema</i>      | Potchefstroom | Bodeskraal             |                              | 11.03.2010       |                            |



**Tablo 2.1. (devam)**

| İZOLAT   | EPN                    | ŞEHİR        | YER                    | HABITAT/BÖCEK                | ÖRNEKLEME TARİHİ | KOORDİNAT                     |
|----------|------------------------|--------------|------------------------|------------------------------|------------------|-------------------------------|
| SGI 224  | <i>Heterorhabditis</i> | Kroonstad    | MalgaskraalBdy         |                              | 23.03.2010       |                               |
| SGI 225  | <i>Steinemema</i>      | Lindley      | Aandeking &Williesdeel |                              | 23.03.2010       |                               |
| SGI 226  | <i>Steinemema</i>      | Bultfontein  | Nuwemoed en Dankbaar   |                              | 30.11.2010       |                               |
| SGI 227  | <i>Steinemema</i>      | Bultfontein  | Nuwemoed en Dankbaar   |                              | 30.11.2010       |                               |
| SGI 228  | <i>Heterorhabditis</i> | Wesselsbron  | Rietvlei               |                              | 01.07.2010       |                               |
| SGI 229  | <i>Steinemema</i>      | Bothaville   | Help my Voort          |                              | 21.07.2010       |                               |
| SGI 230  | <i>Heterorhabditis</i> | Bothaville   | Help my Voort          |                              | 21.07.2010       |                               |
| SGI 231  | <i>Heterorhabditis</i> | Bothaville   | Klein Doornboom farm   |                              | 29.04.2011       |                               |
| SGI 233  | <i>Steinemema</i>      | Tanzania     | Moshi                  | Şeker Kamışı ve Beyaz tırtıl | 11.07.2011       | 0.3°32'42.6"<br>0.37°20'03.2" |
| SGI 234  | <i>Heterorhabditis</i> | Reitz        | Stopspruit farm        | Mısır tarlası                | 25.01.2012       | S27°45'45.2"<br>E028°23'05.5" |
| SGI 235  | <i>Steinemema</i>      | Pieterstyn   | T4737 Junction         | Soya Fasülyesi               | 25.01.2012       | S27°41'31.7"<br>E028°10'08.7" |
| SGI 236  | <i>Steinemema</i>      | Heilbron     | Marlina                | Mısır tarlası                | 25.01.2012       | S27°23'17.7"<br>E028°03'05.1" |
| SGI 238  | <i>Steinemema</i>      | Heilbron     | Driehoek               | Ayçiçeği                     | 25.01.2012       | S27°09'10.6"<br>E027°23'05.5" |
| SGI 239  | <i>Heterorhabditis</i> | Frankfort    | kimberley              | Mısır tarlası                | 23.05.2012       | S26°47.708'<br>E029°19.708'   |
| SGI 240  | <i>Steinemema</i>      | Frankfort    | Grootdam               | Mısır tarlası                | 24.05.2012       | S26°46.438'<br>E029°18.837'   |
| SGI 241  | <i>Steinemema</i>      | Villiers     | Dasklep                | Soya Fasülyesi               | 24.05.2012       | S28°23.156'<br>E027°30.406'   |
| SGI 242  | <i>Steinemema</i>      | Kransfontein | Mooifonmtein           | Mısır tarlası                | 01.08.2012       | S28°23.244'<br>E027°30.722'   |
| SGI 243  | <i>Steinemema</i>      | Vrede        | Meadowbank             | Mısır tarlası                | 01.08.2012       | S28°23.244'<br>E027°30.722'   |
| SGI 244  | <i>Heterorhabditis</i> | Standerton   | Pretoriusvley          | Soya Fasülyesi               | 29.11.2012       | S26°47.708'<br>E029°19.708'   |
| SGI 245  | <i>Heterorhabditis</i> | Standerton   | Slagkraal              | Soya Fasülyesi               | 29.11.2012       | S26°46.438'<br>E029°18.837'   |
| SGI 248  | <i>Steinemema</i>      | Senekal      | Braunsweig             | Mısır tarlası                | 17.01.2013       | S28°25.522'<br>E027°16.162'   |
| SGI 249  | <i>Steinemema</i>      | Winburg      | Comtorita              | Mısır tarlası                | 17.01.2013       | S28°28.051'<br>E027°12.157'   |
| SGI 254  | <i>Heterorhabditis</i> | Ladybrand    | De Rust                | Mısır tarlası                | 17.07.2013       | S28°57.637'<br>E027°24.933'   |
| ROOI 229 | <i>S. khoisanae</i>    | Clanwilliam  | Ysterfontein           | Saailand                     | 11.09.2003       | S32°09'566 /<br>E18°48'176    |

**Tablo 2.1. (devam)**

| İZOLAT     | EPN                     | ŞEHİR          | YER                       | HABITAT/BÖCEK                         | ÖRNEKLEME TARİHİ | KOORDİNAT               |
|------------|-------------------------|----------------|---------------------------|---------------------------------------|------------------|-------------------------|
| ROOI 275   | <i>S. khoisanae</i>     | Clanwilliam    | Paardekop                 | Saailand                              | 16.09.2003       | S32°34'691 / E18°57'170 |
| ROOI 277   | <i>S. khoisanae</i>     | Clanwilliam    | Paardekop                 | Çay                                   | 16.09.2003       | S32°34'471 / E18°55'915 |
| ROOI 283   | <i>S. khoisanae</i>     | Clanwilliam    | Paardekop                 | Saailand                              | 16.09.2003       | S32°35'475 / E18°56'105 |
| ROOI 293   | <i>S. khoisanae</i>     | Clanwilliam    | Bergendal                 | Bozkır                                | 17.09.2003       | S32°32'463 / E18°55'020 |
| ROOI 293A  | <i>S. khoisanae</i>     | Clanwilliam    | Bergendal                 | Bozkır                                | 17.09.2003       | S32°32'463 / E18°55'020 |
| ROOI 299   | <i>Steinernema</i>      | Clanwilliam    | Bergendal                 | Kayısı bahçesi                        | 17.09.2003       | S32°33'332 / E18°55'276 |
| ROOI 299   | <i>Steinernema</i>      | Clanwilliam    | Bergendal                 | Kayısı bahçesi                        | 17.09.2003       | S32°33'332 / E18°55'276 |
| ROOI 334   | <i>S. khoisanae</i>     | Clanwilliam    | Arbeidseind               | Çay                                   | 23.09.2003       | S32°07'581 / E18°41'099 |
| ROOI 334A  | <i>S. khoisanae</i>     | Clanwilliam    | Arbeidseind               | Çay                                   | 23.09.2003       | S32°07'581 / E18°41'099 |
| ROOI 336   | <i>S. khoisanae</i>     | Clanwilliam    | Arbeidseind               | Çay                                   | 23.09.2003       | S32°07'564 / E18°41'176 |
| ROOI 343   | <i>Steinernema</i>      | Clanwilliam    | De Berg                   | Marul tarlası                         | 25.09.2003       | S32°13'076 / E18°46'359 |
| ROOI 352   | <i>Steinernema</i>      | Clanwilliam    | De Berg                   | Eski Bağlık Alan                      | 25.09.2003       | S32°12'602 / E18°45'777 |
| ROOI 369   | <i>Steinernema</i>      | Clanwilliam    | Elandsfontein             | Bozkır                                | 26.09.2003       | S32°18'799 / E18°49'143 |
| SASRI 75   | <i>H. bacteriophora</i> | Mt Edgecombe   | SASRI                     | Kamışlık                              | 6/24/2003        |                         |
| SASRI 198  | <i>Steinernema</i>      | Mt Edgecombe   | Illovo sugar park         | Ağaç altı toprağı                     | 10.02.2003       |                         |
| SASRI 199  | <i>Steinernema</i>      | Stranger       | Kearsney farm             | Nehir kenarındaki portakal ağacı altı | 10.02.2003       |                         |
| SASRI 244  | <i>Steinernema</i>      | Umhlanga Rocks | Umhlanga                  | Şeker Kamışı Tarlası                  | 0/24/2003        |                         |
| SASRI 324  | <i>Steinernema</i>      | Stranger       | Kearsney                  | Ağaç altı                             | 11/26/2003       |                         |
| SASEX 324  | <i>Steinernema</i>      | Stranger       | Kearsney                  | Ağaç altı                             | 11/26/2003       |                         |
| SASEX 356  | <i>Steinernema</i>      | Umhlanga Rocks | Umhlanga                  | Kamışlık                              | 12.12.2003       |                         |
| SASRI 426A | <i>Steinernema</i>      | Weltevreden    | KZN Midlands              | Şeker Kamışı ve Beyaz tırtıl          | 20.07.2004       |                         |
| SASRI 426B | <i>H. bacteriophora</i> | Weltevreden    | KZN Midlands              | Şeker Kamışı ve Beyaz tırtıl          | 20.07.2004       |                         |
| INF 16     | <i>H. bacteriophora</i> | Stellenbosch   | Stellenbosch Western Cape | Bağ                                   | 12.08.2003       |                         |
| INF23      | <i>Steinernema</i>      | Stellenbosch   | Stellenbosch Western Cape | Bağ                                   | 13.08.2003       |                         |

**Tablo 2.1. (devam)**

| İZOLAT   | EPN                     | ŞEHİR            | YER                | HABİTAT/BÖCEK    | ÖRNEKLEME TARİHİ | KOORDİNAT              |
|----------|-------------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------------|
| INF 61   | <i>H. bacteriophora</i> |                  | Hex River Valley   | Bağ              | 10.11.2003       |                        |
| INF 73   | <i>Steinernema</i>      |                  | De Doorns          | Bağ              | 16.12.2003       |                        |
| INF 79   | <i>H. bacteriophora</i> | Stellenbosch     | Stellenbosch       | Fasülye tarlası  | 22.01.2004       |                        |
| ITSC 106 | <i>Steinernema</i>      | Burgershall      | Burgershall        | Trunçgil         | 26.03.2005       |                        |
| UNIV 17  | <i>H. bacteriophora</i> | Pietermaritzburg | Natal Univ         | Ag Fac bahçeleri | 12.09.2003       |                        |
| NWGA 1   | <i>Heterorhabditis</i>  | Harrismith       | Rainfall Swinburne | Otluk alan       | 10.05.2005       | 28°18' 06S;29°16' 21E  |
| NWGA 4   | <i>Heterorhabditis</i>  | Harrismith       | Gedachtenis        | Bozkır           | 10.05.2005       | 27°59' 21S;29°05' 23E  |
| NWGA 7   | <i>Steinernema</i>      | Verkykerskop     | Non Pareil         | Otluk alan       | 07.07.2005       | 26°32'747S;30°1 4'352E |
| NWGA 30  | <i>Heterorhabditis</i>  | Ermelo           | Blackwood          | Otluk alan       | 05.09.2005       | 26°32'747S;30°1 4'352E |
| NWGA 33  | <i>Steinernema</i>      | Ermelo           | Blackwood          | Palmiye          | 05.09.2005       | 26°32'318S;30°1 4'549E |
| NWGA 40  | <i>Steinernema</i>      | Ermelo           | Roodewal           | Yonca            | 05.09.2005       | 26°34'003S;30°1 3'612E |
| NWGA 42  | <i>Steinernema</i>      | Ermelo           | Blaukop            | Kırsal boş alan  | 05.09.2005       | 26°30'938S;30°1 4'814E |

### 2.1.1. Çalışmada Kullanılan Nematod Kültürlerinin Üretimi ve Saklanması

Nematod kültürlerinin üretilmesinde büyük mum güvesi olarak bilinen *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvaları kullanılmıştır (Bedding ve Akhurst, 1975). İçinde kurutma kağıdı bulunan 9 cm'lik petri kaplarının her birisine 5'er adet *G. mellonella* larvası ve üzerlerine içerisinde 1000 IJ bulunan 1 ml nematod kültürü eklenmiş ve petri kapları karanlık ortama bırakılmıştır.

Takip eden 1-2 gün içerisinde nematod enfeksiyonundan ölen larvalar, nematod çıkışını sağlamak için White trap (White, 1927) adı verilen düzeneklere aktarılmıştır. Bu düzenek bir adet 6 cm çaplı petri kabının alt kısmının 9 cm çaplı bir petri kabının içine koyulup, 6 cm çaplı petri kabının içine uygun boyutlarda bir kurutma kağıdı yerleştirilmesiyle hazırlanmıştır. Enfekte larvalar bu kurutma kağıdının üzerine alındıktan sonra kurutma kağıdı 1-2 damla distile su ile hafif

nemlendirilmiş, 9 cm çapındaki petrinin alt kısmına ise diğer petrinin seviyesini geçmeyecek kadar distile su eklenmiştir (Kaya ve Stock, 1997).

İnfektif jüvelillerin konaktan çıkışı oda sıcaklığında (23-24°C) Steinernematidler için 6-11 gün, Heterorhabditler için ise 12-14 gündür (Kaya ve Koppenhöfer, 1999). Konaktan çıkış yapıp 9 cm'lik petride bulunan saf suya geçen infektif jüveniller konağın dokuları gibi yabancı maddelerden arındırılmak için 3 kez saf suyla yıkanmıştır. Temizlenen nematodlar 1 litrelik Tetrapak saklama kapları içerisinde, 10 ve 15°C'lik inkübatörlerde muhafaza edilmiştir (Gulcu ve Hazir, 2012).

## **2.2. Çalışmada Kullanılan Bakteriler**

Bu tez çalışmasında kullanılan bakterilerin tamamı *Heterorhabditis* ve *Steinernema* cinsi entomopatojenik nematodlarla mutualistik yaşam gösteren *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* cinslerine ait bakterilerdir.

### **2.2.1. Mutualistik Bakterilerin İzolasyonu**

Bu çalışmada mutualistik bakterilerin nematodlardan izolasyonu için iki farklı yöntem kullanılmıştır.

Birinci yöntemde; nematod kültüründen 1.0 ml alınarak 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine konulmuş ve infektif jüvenillerin dibe çökmeleri beklenmiştir. Dibe çöken nematodlar steril kabinde, 1000 µl'lik otomatik pipet yardımıyla, steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.

Tüplere, nematodların yüzey sterilizasyonu için 500'er µl %0.4'lük Hyamin (Sigma) konulup tüpler çalkalanmış ve 3 dakika süreyle çökmeleri beklenmiştir. Daha sonra Hyamin ortamdan uzaklaştırılmış ve örnekler 3'er defa steril Ringer's solüsyonu (7.5 g NaCl, 0.35 KCl, 0.21 g CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O ve 1 l steril dH<sub>2</sub>O) ile yıkanmıştır (Kaya ve Stock, 1997).

Nematodlar dibe çöktükten sonra tüpteki sıvı ortam uzaklaştırılmış ve tüpün içerisinde kalan infektif juveniller steril uçlu motorlu doku homojenizatörü (Techmate Ltd.) kullanılarak parçalanmıştır (Orozco ve ark., 2013) (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1.** Motorlu doku homojenizatörü kullanılarak nematodların parçalanması.

Parçalama işlemiyle açığa çıkan bakterilerden pipetle 20 µl alınıp NBTA agar (28 g Nutrient agar, 2 ml triphenyltetrazolium chloride (TTC) ve %0.0025 g bromthymol mavisi (BTB), 1 litre steril dH<sub>2</sub>O), besiyerine yayma ekim yapılmış ve 28°C'lik inkübatörde üremeye bırakılmıştır (Orozco ve ark., 2013).

İkinci yöntemde ise; büyük mum güvesi olarak bilinen *G. mellonella*'nın son evredeki larvalarından 5 adet alınarak içinde 2 kat kurutma kağıdı bulunan 9 cm çapındaki petri kaplarına konulmuştur. Nematod örneklerinden otomatik pipet yardımıyla 1'er ml (yaklaşık 800-1000 IJ bulunan) alınıp kurutma kağıdı üzerine verilmiş ve karanlık bir ortamda oda sıcaklığında tutulmuştur. Otuzaltı saat sonra

ölen larvalar alınarak steril kabinde, yüzey sterilizasyonunu sağlamak için, içinde %70'lik alkol bulunan deney tüplerine konulmuş ve 5 dakika süreyle beklenmiştir. Ardından steril edilmiş bir pens yardımıyla alkolden çıkarılan larvalar, bek alevinin yanında bekletilerek yüzeylerindeki alkolün uçması sağlanmıştır.

Daha sonra abdomen bölgesi insülin iğnesi ile delinmiş ve dışarı çıkan hemosöl plastik öze ile alınıp NBTA agar besiyerine çizgi ekim yapılmıştır. Petriler 28°C'lik inkübatörde üremeye bırakılmıştır (Akhurst, 1982; Hazir ve ark., 2004).

### **2.2.2. Mutualistik Bakterilerin Saflaştırılması ve Saklanması**

İzolasyon çalışması yapılan 123 adet bakteri suşunun tamamı öncelikle, ekili oldukları petri kaplarından tek tek düşen koloniler seçilip tekrar NBTA agara çizgi ekim yapılarak saf kültür elde edilmiştir. Elde edilen saf kültürlerin birer kolonisinden LB Broth besiyerine ekim yapılarak 28°C'ye ayarlı çalkalamalı inkübatörde 1 gece boyunca üremeye bırakılmıştır. Stok kültür hazırlamak için, bir gece boyunca üreyen bakterilerden otomatik pipet yardımıyla 830 µl alınarak, içinde 170 µl %100'lük gliserol bulunan mikrosantrifüj tüplerine konulmuştur. Daha sonra mikrosantrifüj tüplerinin kapaklarına ait olduğu bakterinin kodu yazılmış ve kapaklar parafilmle sarılmıştır. Bu işlemler steril kabinde gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan stok kültürler -80°C'de saklanmıştır (Cowles ve ark., 2007).

NBTA agar ortamında üreyen bakterilerin koloni morfolojileri, kolonilerin sünme durumu ve boyama yapılarak Gram özellikleri belirlenmiştir. Ayrıca bakterilerin katalaz enzimi yönünden pozitif veya negatiflik durumlarını belirlemek için lam üzerine alınan kolonilere hidrojenperoksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) damlatılmıştır.

## **2.3. Moleküler Çalışmalar**

### **2.3.1. Bakterilerden DNA İzolasyonu**

DNA izolasyonunda BIO-RAD firmasına ait InstaGene Matrix DNA saflaştırma kitleri kullanılmıştır. İzolasyon basamakları şu şekildedir:

- 1- NBTA besiyerinde 48 saat üretilmiş olan bakterilerden tek kullanımlık plastik öze yardımıyla 1-2 koloni alınmış ve içinde 1 ml steril su bulunan mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır
- 2- Tüpler 11.800 rpm'de 2-3 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır.
- 3- Pelletin üzerine 100 µl InstaGene Matrix eklenip iyice çalkalandıktan sonra 56°C'ye ayarlı su banyosunda 25 dakika inkübe edilmiştir. InstaGene Matrix ilave edilirken matriksin dibe çökmesine engel olmak için manyetik karıştırıcıda karıştırılıyor olmasına dikkat edilmiş ve kalın uçlu bir otomatik pipet kullanılmıştır.
- 4- İnkübasyonun ardından örnekler yüksek hızda 10 saniye vortekslenildikten sonra 95°C'ye ayarlı blokta 8 dakika bekletilmiştir.
- 5- Örnekler tekrar yüksek hızda 10 saniye vortekslenip, 11.800 rpm'de 2-3 dakika santrifüjlenmiştir.

Bu işlemlerden sonra mikrosantrifüj tüpünün dibindeki yoğun sıvı örneklerin izole edilmiş DNA'sıdır. Bu DNA'lar -20°C'de 2-3 ay kadar muhafaza edilebilmektedir (Kim ve ark., 2012).

### **2.3.2. İzole Edilen DNA'ların PCR Yöntemiyle Çoğaltılması**

InstaGene Matrix DNA saflaştırma ürünü ile izole edilip -20° C'de saklanan DNA'lar oda sıcaklığına alınıp çözünmesi beklendikten sonra yüksek hızlı vortex'de 10 saniye karıştırılıp, 11.800 rpm'de 2-3 dakika santrifüjlenmiştir. Bu esnada 20°C'de saklanan ve PCR reaksiyonu için gerekli olan 100 pmol Primerler (forward ve reverse), Taq DNA polimeraz, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTP mix ve 10x Taq Buffer çözünmesi için oda sıcaklığına alınmıştır.

Tüm bakteri izolatlarının tür teşhislerinde ve filogenetik ağaçların çiziminde RecA gen sekansları kullanılmıştır. Toplam 890 baz çiftinden oluşan RecA gen bölgesi aşağıda verilen primerler kullanılarak PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Reaksiyonda kullanılan primerler; recA-F (5'-GCTATTGATGAAAATAACA-3')

ve recA-R (5'-RATTTTRTCWCCRTTRTAGCT-3')'dir (Thanwisai ve ark., 2012). Stok primerler steril dH<sub>2</sub>O ile %20 oranında sulandırılmıştır.

PCR reaksiyonunda kullanılacak karışım 123 örnek ve bir kontrol için, istenen konsantrasyonlar hesaplandıktan sonra pipetaj hatası da hesaba katılarak toplamda 6200 µl (124µl x 50µl) olacak şekilde 5 adet mikrosantrifüj tüpü içerisinde hazırlanmıştır. Mikrosantrifüj tüplerindeki reaksiyon karışımı iyice çalkalandıktan sonra 100 µl hacimli 123 adet PCR tüpünün her birine, otomatik pipet kullanılarak karışımdan 48'er µl konulmuştur. Tüplerdeki 48 µl karışımın içinde; 5 µl taq buffer, 4 µl MgCl<sub>2</sub>, 1 µl dNTP mix, 0.2 µl primer Forward, 0.2 µl primer Reverse, 0.3 µl Taq DNA polimeraz ve 37.3 µl steril dH<sub>2</sub>O bulunmaktadır. Reaksiyon malzemelerinin konantrasyon hesaplaması Tablo 2.2'de verilmiştir.

**Tablo 2.2.** PCR reaksiyonunda kullanılan malzemelerin konantrasyon hesaplaması

| MALZEME                  | İSTENEN KONSANTRASYON | 50 µl KARIŞIM İÇİN |
|--------------------------|-----------------------|--------------------|
| 10x Buffer               | 1x                    | 5 µl               |
| MgCl <sub>2</sub> 25 mM  | 2 mM                  | 4 µl               |
| dNTP mix 10 mM           | 0.2 mM                | 1 µl               |
| Primer F 100 pmol        | 0.4 pmol              | 0.2 µl             |
| Primer R 100 pmol        | 0.4 pmol              | 0.2 µl             |
| Taq DNA Pol.             | 0.3 µl/50 µl          | 0.3 µl             |
| Steril dH <sub>2</sub> O | 37.3/50 µl            | 37.3 µl            |

Reaksiyon karışımı konulan PCR tüplerinin kapaklarına cam kalemiyle örnek numaraları ve kontrol için 'C' yazılmıştır. Tüplere, daha önceden hazırladığımız DNA'lardan kapaktaki numaralara göre 2'şer µl, kontrol tüpüne ise 2 µl steril dH<sub>2</sub>O



eklenmiş böylece tüplerdeki toplam hacim 50 µl olmuştur. Kapakları kapatılan tüpler 5'er saniye vortexlendikten sonra BIO-RAD T100™ Thermal Cyclers'a dizilmiştir.

PCR döngüsü, 94°C'de 5 dakikalık bir ilk basamak, takibinde 30 döngülük 94°C'de 1 dakika, 50°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika ve son olarak 72°C'de 7 dakikalık bir uzama basamağı şeklinde ayarlanmıştır (Thanwisai ve ark., 2012). Reaksiyon yaklaşık olarak 3 saat sürmüştür.

### **2.3.3. PCR Ürünlerinin Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi**

Thermal Cyclers'dan çıkarılan örnekler DNA varlığını gözlemlemek amacıyla Agaroz Jel Elektroforezinde yürütülmüştür. Elektroforez için %1.5'lik agaroz jel ortamı hazırlanmış, örnekler görüntüleme boyası eklendikten sonra 5'er µl alınarak jelin kuyularına yüklenmiştir. Örnekler 100 Amperde 30 dakika boyunca yürütülmüştür.

### **2.3.4. Sekans Analizleri ve Filogenetik Çalışmalar**

Örnekler PCR'da çoğaltılıp elektroforezde görüntüledikten sonra DNA saflaştırma ve sekans analizi için Güney Kore'de bulunan Macrogen firmasına gönderilmiştir. Örneklerin dizi analizi Recombinant A gen bölgesine göre forward ve reverse olarak yapılmıştır (Thanwisai ve ark., 2012).

Macrogen firmasından gelen sekans analizi sonuçları her örnek için Bioedit Sequence Alignment Editor programı kullanılarak düzenlenmiştir. Programa alınan dizilerden reverse olanlar komplementer hale getirildikten sonra CLUSTAL W ile forward ve reverse dizileri eşlenmiş ve kuyruk kısımları kesilmiştir. Dizilerde mutasyon varsa pikler teker teker kontrol edilerek elle düzeltme yapılmıştır. Bütün diziler düzenlendikten sonra tekrar hepsi birden CLUSTAL W kullanılarak hizalanıp eşitlenmiştir.

Elde edilen düzeltilmiş sekansların cins tayini yapıldıktan sonra filogenetik ağaçlar *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* cinsleri için ayrı ayrı çizilmiştir. Ağaçlar çizilirken Mega 6.06 programı kullanılmıştır. Ağaçların çiziminde Kimura 2-

parametre modeli ve neighbour-joining modülü kullanılmıştır (Kimura, 1980; Saitou ve Nei, 1987).

Çizilen ağaçlarda, *Xenorhabdus* cinsi bakteriler için daha önceden teşhis edilmiş türlerden *X. beddingii*, *X. bovienii*, *X. budapestensis*, *X. cabanillasii*, *X. doucetiae*, *X. ehlersii*, *X. griffiniae*, *X. hominickii*, *X. indica*, *X. innexi*, *X. japonica*, *X. khoisanae*, *X. koppenhoeferi*, *X. nematophilus*, *X. poinarii*, *X. szentirmai*, *X. vietnamensis*, *X. maulenoi*, *X. bovienii* strain T228, *X. indica* strain OM01, *X. doucetiae* strain FRM16, *X. miraniensis* strain Q1 ve *X. kozodoii* strain ES01; *Photorhabdus* cinsi bakteriler içinse *P. luminescens* subsp. *akhurstii*, *P. luminescens* subsp. *carabbiensis* strain HG29, *P. luminescens* subsp. *hainmesis*, *P. luminescens* subsp. *kayaii*, *P. luminescens* subsp. *thraciensis*, *P. luminescens* subsp. *laumondii*, *P. temperata* strain C1, *P. temperata* subsp. *khanii* strain Meg, *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* strain T327, *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* strain a948, *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* strain a949, *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* strain a950, *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* strain a951, *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* strain a952, *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* strain H2BeauDesert, *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* strain H6Mulwort, *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* strain Kingscliff Waterfield ve *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* strain PB68.1 TH kullanılmıştır. Ağaç çizimlerinde dış grup olarak *Escherichia coli* kullanılmıştır.

Bunun yanı sıra Bioedit Sequence Alignment Editor programı ile farklı tür ve izolatlara ait sekansların yüzde (%) benzerlik oranları hesaplanmıştır.

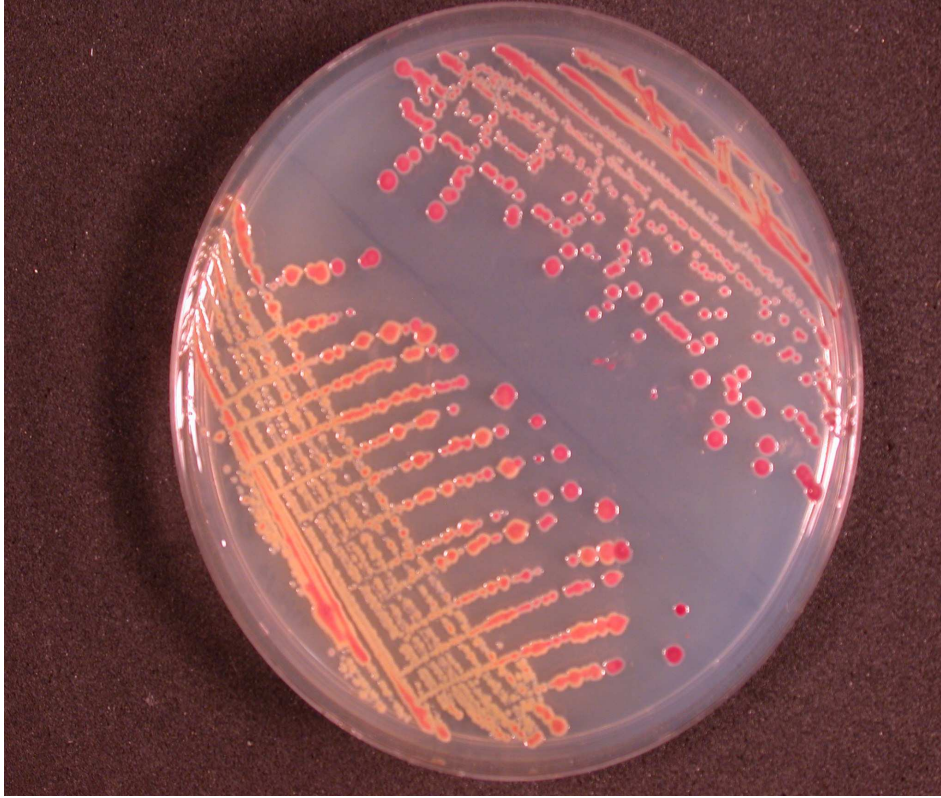
### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Mutualistik Bakterilerin İzolasyonu

Entomopatojenik nematodların mutualistik bakterilerini izole etmek için kullanılan steril infektif juvenillerin parçalanması ya da enfekte *Galleria mellonella* larvalarının hemosöl sıvısının alınması şeklinde kullanılan her iki yöntem de başarılı olmuştur. NBTA ortamında 48 saat süreyle üreyen bakteri kolonileri *Xenorhabdus*'larda koyu yeşil renkli (bromthymol mavisini absorbladığı için) görünürken (şekil 3.1), *Photorhabdus* bakterileri ise NBTA ortamındaki triphenyltetrazoliumchloride maddesini absorbladıklarından kırmızı renk sergilemişlerdir (şekil 3.2).

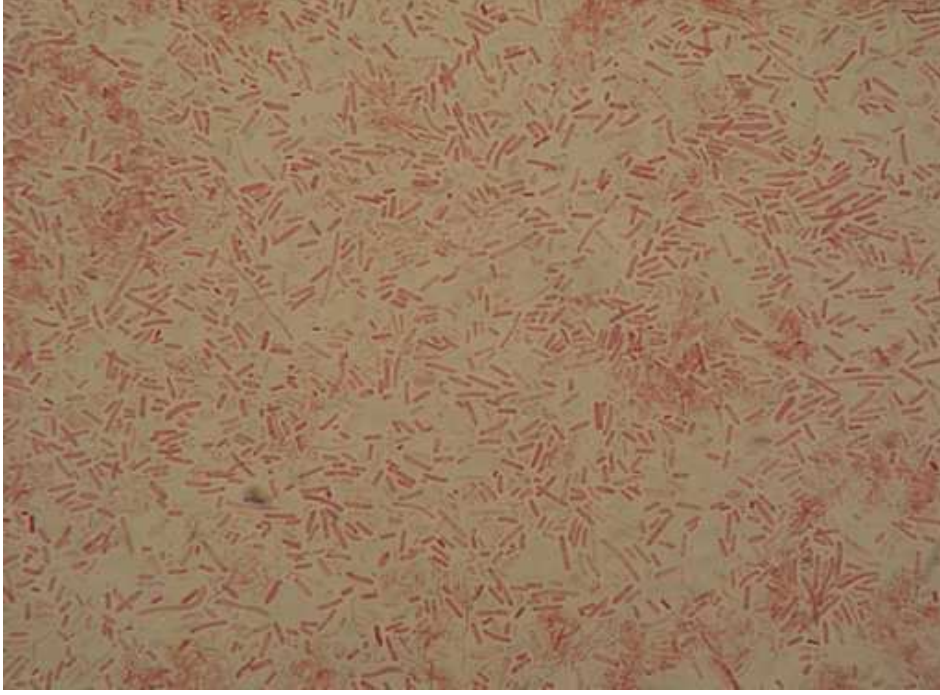


**şekil 3.1.** *Xenorhabdus* cinsi bakterilerin NBTA ortamında oluşan koloni görünümü.

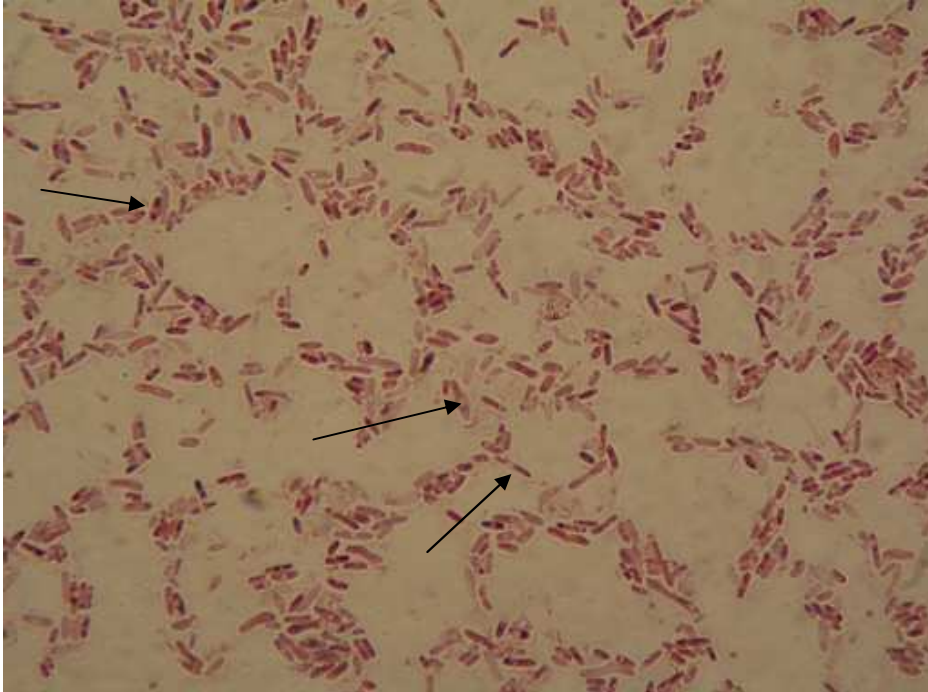


**Şekil 3.2.** *Photorhabdus* cinsi bakterilerin NBTA ortamında oluşan koloni görünümü.

Katı besiy ortamı olan NBTA üzerinde üreyen *Photorhabdus* kolonileri sakızimsı bir yapı sergilemiş olduğundan öze ile alınmaları esnasında sünmeleriyle karakterize olmuşlardır. Ayrıca kolonilere yapılan katalaz testlerinde, *Photorhabdus* örneklerine saf hidrojenperoksit ( $H_2O_2$ ) damlatıldığında köpürme meydana gelmiş (katalaz pozitif), *Xenorhabdus* kolonilerinde ise herhangi bir köpürme olmadığı gözlenmiştir (katalaz negatif). Üreyen bakterilerin morfolojilerini, faz evrelerini ve Gram özelliklerini belirlemek için yapılan boyama sonucunda hem *Xenorhabdus* hem de *Photorhabduslar*'ın faz-I evrede oldukları kısa çubuk şeklindeki hücre yapılarından anlaşılmıştır. Ayrıca boyama sonucunda her iki bakteri cinsine ait izolatların Gram-negatif ve çubuk morfolojili oldukları görülmüştür (Şekil 3.3 ve 3.4). *Photorhabdus* bakterilerinde *Xenorhabdus*'lardan farklı olarak görülen hücre içi inclusion cisimciklerinin (yuvarlak ve parlak) oluştuğu da gözlenmiştir (Şekil 3.4).



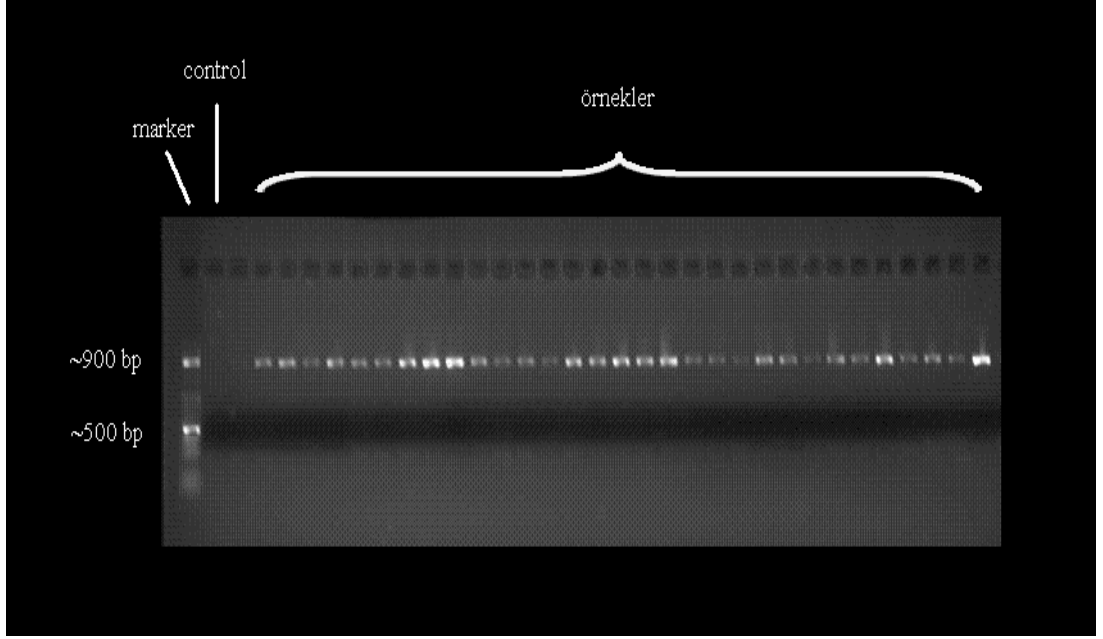
**Şekil 3.3.** *Xenorhabdus* cinsi bakterilerin Gram boyamadan sonra ışık mikroskobu altındaki görüntüsü.



**Şekil 3.4.** *Photorhabdus* cinsi bakteriler ve inclusion cisimciklerinin Gram boyamadan sonra ışık mikroskobu altındaki görüntüsü.

### 3.2. Moleküler Çalışmalar

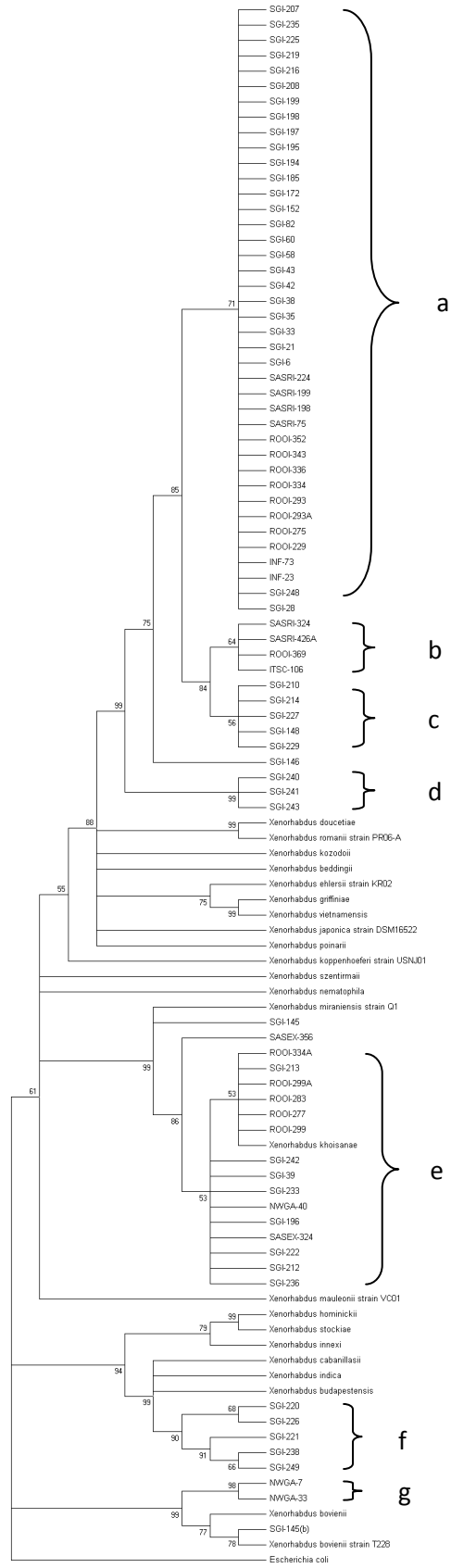
Hazır kit kullanılarak yapılan DNA izolasyonu işlemleri sonucunda bakterilerden elde edilen DNA'ların RecA gen bölgeleri forward ve reverse yönde PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Bu PCR ürünleri sekans öncesi agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. PCR ürünlerinin elektroforez görüntüsü.

#### 3.2.1. Sekans Analizleri ve Filogenetik Çalışmalar

Sekans analiz sonuçlarının düzenlendikten sonra filogenetik ağaçlar *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* cinsleri için ayrı ayrı çizilmiştir. Ağaçlar oluşturulurken gen bankasında bulunan farklı türlere ait RecA gen dizileri ve dış grup olarak *Escherichia coli* bakterisinin RecA sekansı kullanılmıştır (Şekil 3.6 ve 3.7).



Şekil 3.6. *Xenorhabdus* cinsi bakteriler için oluşturulan filogenetik ağaç.





*Xenorhabdus* cinsi bakterilerin daha önceden teşhisi yapılan türlerle olan benzerlik oranları Tablo 3.1’de verilmiştir. Bu karşılaştırma yapılırken; *X. beddingii* (X. bed), *X. bovienii* (X. bov), *X. budapestensis* (X. bud), *X. cabanilasii* (X. cab), *X. doucetiae* (X. dou), *X. ehlersii* (X. ehl), *X. griffiniae* (X. gri), *X. hominickii* (X. hom), *X. indica* (X. ind), *X. innexi* (X. inn), *X. japonica* (X. jap), *X. koppenhoeferi* (X. kop), *X. kozodoii* (X. koz), *X. mauleonii* (X. mau), *X. miraniensis* (X. mir), *X. nematophilus* (X. nem), *X. poinarii* (X. poi), *X. stockiae* (X. sto), *X. szentirmaii* (X. sze), *X. vietnamensis* (X. vie), *X. romanii* (X. rom), *X. khoisanae* (X. kho) ve *E. coli* türleri kullanılmıştır.

*Photorhabdus* cinsi bakterilerin daha önceden teşhisi yapılan türlerle olan benzerlik oranları ise Tablo 3.2’de verilmiştir. Bu karşılaştırma yapılırken; *P. asymbiotica*, *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (*Pl.* subsp *akhurstii*), *P. luminescens* subsp. *laumondii* (*Pl.* subsp *laumondii*), *P. luminescens* subsp. *kayaii* (*Pl.* subsp *kayaii*), *P. luminescens* subsp. *luminescens* (*Pl.* subsp *luminescens*), *P. luminescens* subsp. *thraciensis* (*Pl.* subsp *thraciensis*), *P. temperata* strain C1 (*Pt.* strain C1), *P. temperata* subsp. *khanii* strain Meg (*Pt.* strain Meg), *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* strain T327 ve *E. coli* türleri kullanılmıştır.

**Tablo 3.1. *Xenorhabdus* Cinsi Bakterilerin Benzerlik Oranları (%)**

|            | X. bed | X. bov | X. bud | X. cab | X. dou | X. ehl | X. gri | X. hom | X. ind | X. inn | X. jap | X. kcp | X. koz | X. mau | X. mir | X. nem | X. poi | X. sto | X. sze | X. vie | X. rom | X. kho | E. coli |
|------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| INF-23     | 0.641  | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589  | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |
| INF-73     | 0.641  | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589  | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |
| ITS-106    | 0.638  | 0.584  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.899  | 0.63   | 0.589  | 0.584  | 0.588  | 0.912  | 0.891  | 0.626  | 0.883  | 0.89   | 0.599  | 0.63   | 0.589  | 0.588  | 0.63   | 0.912  | 0.886  | 0.789   |
| NWGA-7     | 0.589  | 0.672  | 0.592  | 0.596  | 0.594  | 0.84   | 0.586  | 0.61   | 0.599  | 0.597  | 0.864  | 0.867  | 0.592  | 0.88   | 0.888  | 0.596  | 0.592  | 0.61   | 0.573  | 0.586  | 0.862  | 0.878  | 0.802   |
| NWGA-33    | 0.589  | 0.672  | 0.592  | 0.596  | 0.594  | 0.84   | 0.586  | 0.61   | 0.599  | 0.597  | 0.864  | 0.867  | 0.592  | 0.88   | 0.888  | 0.596  | 0.592  | 0.61   | 0.573  | 0.586  | 0.862  | 0.878  | 0.802   |
| NWGA-40    | 0.613  | 0.6    | 0.594  | 0.599  | 0.613  | 0.864  | 0.61   | 0.6    | 0.6    | 0.591  | 0.901  | 0.893  | 0.612  | 0.891  | 0.977  | 0.617  | 0.62   | 0.6    | 0.599  | 0.61   | 0.883  | 0.995  | 0.796   |
| ROOH-229   | 0.641  | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589  | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |
| ROOH-275   | 0.641  | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589  | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |
| ROOH-277   | 0.613  | 0.604  | 0.597  | 0.602  | 0.613  | 0.864  | 0.61   | 0.604  | 0.604  | 0.594  | 0.901  | 0.893  | 0.612  | 0.891  | 0.98   | 0.62   | 0.62   | 0.604  | 0.602  | 0.61   | 0.883  | 0.998  | 0.799   |
| ROOH-283   | 0.613  | 0.604  | 0.597  | 0.602  | 0.613  | 0.864  | 0.61   | 0.604  | 0.604  | 0.594  | 0.901  | 0.893  | 0.612  | 0.891  | 0.98   | 0.62   | 0.62   | 0.604  | 0.602  | 0.61   | 0.883  | 0.998  | 0.799   |
| ROOH-293A  | 0.641  | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589  | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |
| ROOH-293   | 0.641  | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589  | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |
| ROOH-299A  | 0.613  | 0.604  | 0.597  | 0.602  | 0.613  | 0.864  | 0.61   | 0.604  | 0.604  | 0.594  | 0.901  | 0.893  | 0.612  | 0.891  | 0.98   | 0.62   | 0.62   | 0.604  | 0.602  | 0.61   | 0.883  | 0.998  | 0.799   |
| ROOH-299   | 0.611  | 0.602  | 0.595  | 0.6    | 0.611  | 0.861  | 0.608  | 0.602  | 0.602  | 0.592  | 0.898  | 0.89   | 0.61   | 0.888  | 0.977  | 0.618  | 0.618  | 0.602  | 0.6    | 0.608  | 0.88   | 0.995  | 0.797   |
| ROOH-334A  | 0.613  | 0.604  | 0.597  | 0.602  | 0.613  | 0.864  | 0.61   | 0.604  | 0.604  | 0.594  | 0.901  | 0.893  | 0.612  | 0.891  | 0.98   | 0.62   | 0.62   | 0.604  | 0.602  | 0.61   | 0.883  | 0.998  | 0.799   |
| ROOH-334   | 0.641  | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589  | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |
| ROOH-336   | 0.641  | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589  | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |
| ROOH-343   | 0.641  | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589  | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |
| ROOH-352   | 0.641  | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589  | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |
| ROOH-369   | 0.638  | 0.584  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.899  | 0.63   | 0.589  | 0.584  | 0.588  | 0.912  | 0.891  | 0.626  | 0.883  | 0.89   | 0.599  | 0.63   | 0.589  | 0.588  | 0.63   | 0.912  | 0.886  | 0.789   |
| SASEX-324  | 0.613  | 0.6    | 0.594  | 0.599  | 0.61   | 0.854  | 0.607  | 0.6    | 0.6    | 0.591  | 0.891  | 0.883  | 0.609  | 0.878  | 0.967  | 0.617  | 0.617  | 0.6    | 0.602  | 0.607  | 0.873  | 0.985  | 0.791   |
| SASEX-356  | 0.61   | 0.597  | 0.591  | 0.596  | 0.607  | 0.851  | 0.604  | 0.597  | 0.597  | 0.588  | 0.885  | 0.882  | 0.605  | 0.877  | 0.964  | 0.615  | 0.613  | 0.597  | 0.6    | 0.604  | 0.87   | 0.982  | 0.793   |
| SASRI-75   | 0.641  | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589  | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |
| SASRI-198  | 0.641  | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589  | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |
| SASRI-199  | 0.641  | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589  | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |
| SASRI-224  | 0.641  | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589  | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |
| SASRI-324  | 0.638  | 0.584  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.899  | 0.63   | 0.589  | 0.584  | 0.588  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |
| SASRI-426A | 0.638  | 0.584  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.899  | 0.63   | 0.589  | 0.584  | 0.588  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |
| SGI-6      | 0.641  | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589  | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |
| SGI-21     | 0.641  | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589  | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |
| SGI-28     | 0.641  | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589  | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |
| SGI-33     | 0.64   | 0.588  | 0.583  | 0.58   | 0.627  | 0.901  | 0.63   | 0.588  | 0.583  | 0.588  | 0.914  | 0.893  | 0.625  | 0.885  | 0.893  | 0.601  | 0.63   | 0.588  | 0.591  | 0.63   | 0.911  | 0.89   | 0.79    |
| SGI-35     | 0.641  | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589  | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |
| SGI-38     | 0.641  | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589  | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |
| SGI-39     | 0.613  | 0.6    | 0.594  | 0.599  | 0.613  | 0.864  | 0.61   | 0.6    | 0.6    | 0.591  | 0.901  | 0.893  | 0.612  | 0.891  | 0.977  | 0.617  | 0.62   | 0.6    | 0.599  | 0.61   | 0.883  | 0.995  | 0.796   |
| SGI-42     | 0.641  | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589  | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |
| SGI-43     | 0.641  | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589  | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |
| SGI-58     | 0.641  | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589  | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886  | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791   |

Tablo 3.1. (devam)

|            | X. bred | X. bov | X. hüd | X. cab | X. dou | X. ehl | X. gri | X. hoem | X. lrd | X. inn | X. jap | X. kop | X. koz | X. mtau | X. mir | X. nem | X. pol | X. sto | X. sze | X. vie | X. rom | X. lha | E. colli |
|------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|
| SGI-60     | 0.641   | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589   | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886   | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791    |
| SGI-82     | 0.641   | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589   | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886   | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791    |
| SGI-145    | 0.609   | 0.599  | 0.592  | 0.597  | 0.612  | 0.852  | 0.602  | 0.599   | 0.599  | 0.599  | 0.859  | 0.89   | 0.607  | 0.88    | 0.967  | 0.621  | 0.615  | 0.599  | 0.599  | 0.602  | 0.88   | 0.969  | 0.796    |
| SGI-145(b) | 0.589   | 0.676  | 0.589  | 0.591  | 0.592  | 0.904  | 0.584  | 0.609   | 0.594  | 0.592  | 0.859  | 0.864  | 0.591  | 0.878   | 0.885  | 0.596  | 0.588  | 0.609  | 0.576  | 0.584  | 0.861  | 0.877  | 0.801    |
| SGI-146    | 0.644   | 0.586  | 0.591  | 0.588  | 0.631  | 0.906  | 0.634  | 0.596   | 0.591  | 0.592  | 0.914  | 0.893  | 0.63   | 0.875   | 0.893  | 0.605  | 0.634  | 0.596  | 0.592  | 0.634  | 0.914  | 0.89   | 0.786    |
| SGI-148    | 0.683   | 0.625  | 0.625  | 0.621  | 0.673  | 0.841  | 0.675  | 0.632   | 0.625  | 0.628  | 0.856  | 0.831  | 0.67   | 0.828   | 0.835  | 0.64   | 0.675  | 0.632  | 0.628  | 0.675  | 0.854  | 0.83   | 0.735    |
| SGI-152    | 0.641   | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589   | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886   | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791    |
| SGI-172    | 0.641   | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589   | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886   | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791    |
| SGI-185    | 0.641   | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589   | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886   | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791    |
| SGI-194    | 0.641   | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589   | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886   | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791    |
| SGI-195    | 0.641   | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589   | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886   | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791    |
| SGI-197    | 0.641   | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589   | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886   | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791    |
| SGI-198    | 0.641   | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589   | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886   | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791    |
| SGI-199    | 0.641   | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589   | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886   | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791    |
| SGI-207    | 0.628   | 0.575  | 0.57   | 0.566  | 0.616  | 0.825  | 0.62   | 0.575   | 0.57   | 0.576  | 0.833  | 0.824  | 0.613  | 0.809   | 0.816  | 0.591  | 0.618  | 0.575  | 0.58   | 0.62   | 0.836  | 0.812  | 0.721    |
| SGI-208    | 0.641   | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589   | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886   | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791    |
| SGI-210    | 0.639   | 0.584  | 0.584  | 0.581  | 0.63   | 0.901  | 0.631  | 0.591   | 0.584  | 0.588  | 0.914  | 0.891  | 0.626  | 0.883   | 0.891  | 0.599  | 0.631  | 0.591  | 0.588  | 0.631  | 0.914  | 0.888  | 0.789    |
| SGI-212    | 0.555   | 0.548  | 0.545  | 0.548  | 0.556  | 0.784  | 0.552  | 0.555   | 0.552  | 0.552  | 0.82   | 0.819  | 0.561  | 0.811   | 0.889  | 0.57   | 0.563  | 0.555  | 0.555  | 0.552  | 0.809  | 0.907  | 0.736    |
| SGI-213    | 0.613   | 0.604  | 0.597  | 0.602  | 0.613  | 0.864  | 0.61   | 0.604   | 0.604  | 0.594  | 0.901  | 0.893  | 0.612  | 0.891   | 0.98   | 0.62   | 0.62   | 0.604  | 0.602  | 0.61   | 0.883  | 0.998  | 0.799    |
| SGI-214    | 0.639   | 0.584  | 0.584  | 0.581  | 0.63   | 0.901  | 0.631  | 0.591   | 0.584  | 0.588  | 0.914  | 0.891  | 0.626  | 0.883   | 0.891  | 0.599  | 0.631  | 0.591  | 0.588  | 0.631  | 0.914  | 0.888  | 0.789    |
| SGI-216    | 0.641   | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589   | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886   | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791    |
| SGI-219    | 0.641   | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589   | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886   | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791    |
| SGI-220    | 0.589   | 0.588  | 0.657  | 0.662  | 0.589  | 0.838  | 0.589  | 0.626   | 0.667  | 0.617  | 0.864  | 0.864  | 0.589  | 0.865   | 0.872  | 0.588  | 0.594  | 0.626  | 0.581  | 0.589  | 0.848  | 0.864  | 0.781    |
| SGI-221    | 0.588   | 0.586  | 0.659  | 0.657  | 0.588  | 0.831  | 0.588  | 0.621   | 0.668  | 0.612  | 0.864  | 0.861  | 0.588  | 0.865   | 0.872  | 0.586  | 0.592  | 0.621  | 0.576  | 0.588  | 0.846  | 0.864  | 0.777    |
| SGI-222    | 0.612   | 0.602  | 0.596  | 0.6    | 0.612  | 0.862  | 0.609  | 0.602   | 0.602  | 0.592  | 0.899  | 0.891  | 0.61   | 0.89    | 0.978  | 0.618  | 0.618  | 0.602  | 0.6    | 0.609  | 0.882  | 0.996  | 0.798    |
| SGI-225    | 0.641   | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589   | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886   | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791    |
| SGI-226    | 0.603   | 0.601  | 0.671  | 0.676  | 0.603  | 0.815  | 0.605  | 0.641   | 0.681  | 0.631  | 0.836  | 0.836  | 0.603  | 0.84    | 0.846  | 0.601  | 0.608  | 0.641  | 0.595  | 0.605  | 0.822  | 0.838  | 0.757    |
| SGI-227    | 0.639   | 0.584  | 0.584  | 0.581  | 0.63   | 0.901  | 0.631  | 0.591   | 0.584  | 0.588  | 0.914  | 0.891  | 0.626  | 0.883   | 0.891  | 0.599  | 0.631  | 0.591  | 0.588  | 0.631  | 0.914  | 0.888  | 0.789    |
| SGI-229    | 0.639   | 0.584  | 0.584  | 0.581  | 0.63   | 0.901  | 0.631  | 0.591   | 0.584  | 0.588  | 0.914  | 0.891  | 0.626  | 0.883   | 0.891  | 0.599  | 0.631  | 0.591  | 0.588  | 0.631  | 0.914  | 0.888  | 0.789    |
| SGI+233    | 0.613   | 0.6    | 0.594  | 0.599  | 0.613  | 0.864  | 0.61   | 0.6     | 0.6    | 0.591  | 0.901  | 0.893  | 0.612  | 0.891   | 0.977  | 0.617  | 0.62   | 0.6    | 0.599  | 0.61   | 0.883  | 0.995  | 0.796    |
| SGI+235    | 0.641   | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589   | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886   | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791    |
| SGI+236    | 0.612   | 0.602  | 0.596  | 0.6    | 0.612  | 0.862  | 0.609  | 0.602   | 0.602  | 0.592  | 0.899  | 0.891  | 0.61   | 0.89    | 0.978  | 0.618  | 0.618  | 0.602  | 0.6    | 0.609  | 0.882  | 0.996  | 0.798    |
| SGI+238    | 0.503   | 0.501  | 0.565  | 0.567  | 0.506  | 0.696  | 0.506  | 0.533   | 0.577  | 0.528  | 0.723  | 0.73   | 0.511  | 0.722   | 0.731  | 0.51   | 0.51   | 0.533  | 0.496  | 0.506  | 0.709  | 0.723  | 0.652    |
| SGI+240    | 0.641   | 0.596  | 0.592  | 0.589  | 0.63   | 0.904  | 0.634  | 0.594   | 0.592  | 0.592  | 0.915  | 0.898  | 0.628  | 0.885   | 0.891  | 0.607  | 0.636  | 0.594  | 0.592  | 0.634  | 0.911  | 0.888  | 0.798    |
| SGI+241    | 0.641   | 0.596  | 0.592  | 0.589  | 0.63   | 0.904  | 0.634  | 0.594   | 0.592  | 0.592  | 0.915  | 0.898  | 0.628  | 0.885   | 0.891  | 0.607  | 0.636  | 0.594  | 0.592  | 0.634  | 0.911  | 0.888  | 0.798    |
| SGI+242    | 0.613   | 0.6    | 0.594  | 0.599  | 0.613  | 0.864  | 0.61   | 0.6     | 0.6    | 0.591  | 0.901  | 0.89   | 0.609  | 0.888   | 0.977  | 0.617  | 0.62   | 0.6    | 0.599  | 0.61   | 0.883  | 0.995  | 0.796    |
| SGI+243    | 0.641   | 0.589  | 0.592  | 0.589  | 0.63   | 0.904  | 0.634  | 0.594   | 0.592  | 0.592  | 0.915  | 0.898  | 0.628  | 0.885   | 0.891  | 0.607  | 0.636  | 0.594  | 0.592  | 0.634  | 0.911  | 0.888  | 0.798    |
| SGI+244    | 0.641   | 0.589  | 0.584  | 0.581  | 0.628  | 0.903  | 0.631  | 0.589   | 0.584  | 0.589  | 0.915  | 0.894  | 0.626  | 0.886   | 0.894  | 0.602  | 0.631  | 0.589  | 0.592  | 0.631  | 0.912  | 0.891  | 0.791    |
| SGI+249    | 0.588   | 0.586  | 0.659  | 0.657  | 0.588  | 0.833  | 0.588  | 0.621   | 0.668  | 0.612  | 0.862  | 0.859  | 0.588  | 0.864   | 0.873  | 0.586  | 0.592  | 0.621  | 0.576  | 0.588  | 0.844  | 0.865  | 0.778    |

**Tablo 3.2. *Photorhabdus* Cinsi Bakterilerin Benzerlik Oranları (%)**

|            | <i>P. asymbiotica</i> | <i>Pl. subsp. akhurstii</i> | <i>Pl. subsp. laumondii</i> | <i>Pl. subsp. kayalii</i> | <i>Pl. subsp. luminescens</i> | <i>Pl. subsp. thraeensis</i> | <i>Pt. strain C1</i> | <i>Pt. strain Meg</i> | <i>Pt. strain T327</i> | <i>E. coli</i> |
|------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|-------------------------------|------------------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|----------------|
| INF-16     | 0.876                 | 0.942                       | 0.942                       | 0.967                     | 0.95                          | 0.899                        | 0.895                | 0.895                 | 0.891                  | 0.786          |
| INF-61     | 0.876                 | 0.942                       | 0.942                       | 0.967                     | 0.95                          | 0.899                        | 0.895                | 0.895                 | 0.891                  | 0.786          |
| INF-79     | 0.875                 | 0.939                       | 0.939                       | 0.964                     | 0.947                         | 0.896                        | 0.892                | 0.892                 | 0.889                  | 0.785          |
| NWGA-1     | 0.89                  | 0.962                       | 0.956                       | 0.981                     | 0.961                         | 0.904                        | 0.898                | 0.898                 | 0.895                  | 0.792          |
| NWGA-4     | 0.89                  | 0.962                       | 0.956                       | 0.981                     | 0.961                         | 0.904                        | 0.898                | 0.898                 | 0.895                  | 0.792          |
| NWGA-30    | 0.89                  | 0.962                       | 0.956                       | 0.981                     | 0.961                         | 0.904                        | 0.898                | 0.898                 | 0.895                  | 0.792          |
| NWGA-42    | 0.876                 | 0.942                       | 0.942                       | 0.967                     | 0.95                          | 0.899                        | 0.895                | 0.895                 | 0.891                  | 0.786          |
| SASRI-4268 | 0.875                 | 0.939                       | 0.939                       | 0.964                     | 0.947                         | 0.896                        | 0.892                | 0.892                 | 0.889                  | 0.785          |
| SGI-22     | 0.878                 | 0.944                       | 0.944                       | 0.969                     | 0.952                         | 0.901                        | 0.896                | 0.896                 | 0.893                  | 0.787          |
| SGI-29     | 0.878                 | 0.944                       | 0.944                       | 0.969                     | 0.952                         | 0.901                        | 0.896                | 0.896                 | 0.893                  | 0.787          |
| SGI-32     | 0.878                 | 0.944                       | 0.944                       | 0.969                     | 0.952                         | 0.901                        | 0.896                | 0.896                 | 0.893                  | 0.787          |
| SGI-40     | 0.875                 | 0.939                       | 0.939                       | 0.964                     | 0.947                         | 0.896                        | 0.892                | 0.892                 | 0.889                  | 0.785          |
| SGI-50     | 0.89                  | 0.962                       | 0.956                       | 0.981                     | 0.961                         | 0.904                        | 0.898                | 0.898                 | 0.895                  | 0.792          |
| SGI-90     | 0.878                 | 0.944                       | 0.944                       | 0.969                     | 0.952                         | 0.901                        | 0.896                | 0.896                 | 0.893                  | 0.787          |
| SGI-91     | 0.804                 | 0.857                       | 0.859                       | 0.877                     | 0.863                         | 0.814                        | 0.814                | 0.814                 | 0.808                  | 0.719          |
| SGI-96     | 0.89                  | 0.962                       | 0.956                       | 0.981                     | 0.961                         | 0.904                        | 0.898                | 0.898                 | 0.895                  | 0.792          |
| SGI-164    | 0.878                 | 0.944                       | 0.944                       | 0.969                     | 0.952                         | 0.901                        | 0.896                | 0.896                 | 0.893                  | 0.787          |
| SGI-165    | 0.875                 | 0.939                       | 0.939                       | 0.964                     | 0.947                         | 0.896                        | 0.892                | 0.892                 | 0.889                  | 0.785          |
| SGI-166    | 0.89                  | 0.962                       | 0.956                       | 0.981                     | 0.961                         | 0.904                        | 0.898                | 0.898                 | 0.895                  | 0.792          |
| SGI-170    | 0.875                 | 0.939                       | 0.939                       | 0.964                     | 0.947                         | 0.896                        | 0.892                | 0.892                 | 0.889                  | 0.785          |
| SGI-173    | 0.876                 | 0.942                       | 0.942                       | 0.967                     | 0.95                          | 0.899                        | 0.895                | 0.895                 | 0.891                  | 0.786          |
| SGI-178    | 0.872                 | 0.936                       | 0.936                       | 0.959                     | 0.942                         | 0.893                        | 0.89                 | 0.89                  | 0.887                  | 0.786          |
| SGI-179    | 0.878                 | 0.944                       | 0.944                       | 0.969                     | 0.952                         | 0.901                        | 0.896                | 0.896                 | 0.893                  | 0.787          |
| SGI-180    | 0.876                 | 0.942                       | 0.942                       | 0.967                     | 0.95                          | 0.899                        | 0.895                | 0.895                 | 0.892                  | 0.786          |
| SGI-188    | 0.876                 | 0.942                       | 0.942                       | 0.967                     | 0.95                          | 0.899                        | 0.895                | 0.895                 | 0.891                  | 0.786          |
| SGI-193    | 0.9                   | 0.89                        | 0.895                       | 0.901                     | 0.895                         | 0.969                        | 0.967                | 0.967                 | 0.961                  | 0.787          |
| SGI-200    | 0.876                 | 0.942                       | 0.942                       | 0.967                     | 0.95                          | 0.899                        | 0.895                | 0.895                 | 0.891                  | 0.786          |
| SGI-201    | 0.875                 | 0.939                       | 0.939                       | 0.964                     | 0.947                         | 0.896                        | 0.892                | 0.892                 | 0.889                  | 0.785          |
| SGI-202    | 0.876                 | 0.942                       | 0.942                       | 0.967                     | 0.95                          | 0.899                        | 0.895                | 0.895                 | 0.891                  | 0.786          |
| SGI-203    | 0.876                 | 0.942                       | 0.942                       | 0.967                     | 0.95                          | 0.899                        | 0.895                | 0.895                 | 0.891                  | 0.786          |
| SGI-205    | 0.878                 | 0.944                       | 0.944                       | 0.969                     | 0.952                         | 0.901                        | 0.896                | 0.896                 | 0.893                  | 0.787          |
| SGI-206    | 0.875                 | 0.941                       | 0.941                       | 0.965                     | 0.948                         | 0.898                        | 0.893                | 0.893                 | 0.89                   | 0.785          |
| SGI-209    | 0.89                  | 0.962                       | 0.956                       | 0.981                     | 0.961                         | 0.904                        | 0.898                | 0.898                 | 0.895                  | 0.792          |
| SGI-211    | 0.876                 | 0.942                       | 0.942                       | 0.967                     | 0.95                          | 0.899                        | 0.895                | 0.895                 | 0.891                  | 0.786          |
| SGI-217    | 0.875                 | 0.939                       | 0.939                       | 0.964                     | 0.947                         | 0.896                        | 0.892                | 0.892                 | 0.889                  | 0.785          |
| SGI-224    | 0.878                 | 0.944                       | 0.944                       | 0.969                     | 0.952                         | 0.901                        | 0.896                | 0.896                 | 0.893                  | 0.787          |
| SGI-228    | 0.876                 | 0.942                       | 0.942                       | 0.967                     | 0.95                          | 0.899                        | 0.895                | 0.895                 | 0.891                  | 0.786          |
| SGI-230    | 0.878                 | 0.941                       | 0.941                       | 0.965                     | 0.948                         | 0.904                        | 0.899                | 0.899                 | 0.896                  | 0.789          |
| SGI-231    | 0.876                 | 0.942                       | 0.942                       | 0.967                     | 0.95                          | 0.899                        | 0.895                | 0.895                 | 0.891                  | 0.786          |
| SGI-234    | 0.876                 | 0.942                       | 0.942                       | 0.967                     | 0.95                          | 0.899                        | 0.895                | 0.895                 | 0.891                  | 0.786          |
| SGI-239    | 0.878                 | 0.941                       | 0.941                       | 0.965                     | 0.948                         | 0.904                        | 0.899                | 0.899                 | 0.896                  | 0.789          |
| SGI-244    | 0.878                 | 0.941                       | 0.941                       | 0.965                     | 0.948                         | 0.904                        | 0.899                | 0.899                 | 0.896                  | 0.789          |
| SGI-245    | 0.878                 | 0.941                       | 0.941                       | 0.965                     | 0.948                         | 0.904                        | 0.899                | 0.899                 | 0.896                  | 0.789          |
| SGI-254    | 0.876                 | 0.942                       | 0.942                       | 0.967                     | 0.95                          | 0.899                        | 0.895                | 0.895                 | 0.891                  | 0.786          |
| UNIV-17    | 0.875                 | 0.939                       | 0.939                       | 0.964                     | 0.947                         | 0.896                        | 0.892                | 0.892                 | 0.889                  | 0.785          |

## 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 4.1. Tartışma

Bu tez çalışması kapsamında yapılan RecA gen bölgesi analiz sonuçlarına göre *Steinernema* cinsi nematodlardan izole edilen *Xenorhabdus* bakterilerinin 53 suşunun” (filogenetik ağaçta a-b-c-d olarak gösterilen gruplardaki) birbirlerine oldukça yakın gruplar olduğu, ancak bunların daha önce tanımlanmış *Xenorhabdus* türlerinden ise oldukça farklı bir grubu oluşturduğu belirlenmiştir. Bu büyük gruba en yakın tanımlanmış türler *X. doucetiae* ve *X. romanii* türleridir. *Xenorhabdus doucetiae* türüne ait bakteriler *Steinernema diaprepesi* türü nematodlarla, *X. romanii* türüne ait bakteriler ise *Steinernema puertoricense* türü nematodlarla mutualistik ilişkili türlerdir (Tailliez ve ark., 2010). Bu nematod türleri ise Afrika kıtasından bugüne kadar hiç izole edilmemiştir. Bu nedenle a-b-c-d grupları şeklinde gösterilen bakteri izolatlarının yeni bir *Xenorhabdus* türünü temsil ettiği düşünülmektedir (Şekil 3.6). Zaten bu bakterilerden SGI-60 ile ilişkili nematodlar *Steinernema tophus* n. sp (Çimen ve ark., 2014b), ROOI-352 kod numaralı bakteri suşunun ilişkili olduğu entomopatojenik nematodlar ise *Steinernema innovationi* n. sp. olarak yeni türler şeklinde tanımlanmışlardır (Çimen ve ark., 2014a). Çalışmanın başlangıcında bu yeni nematod türlerinin mutualistik bakterilerinin de yeni türler olabileceği tahmin edilmekteydi.

Elde ettiğimiz veriler SGI-145 izolat numarasıyla gösterilen bakteri suşunun *X. miraniensis* türüne, “e” grubu olarak gösterilen yerdeki geriye kalan 16 suşun ise *X. khoisanae* türüne ait olduklarını göstermiştir. Ayrıca 5 izolatla (SGI-220, SGI-226, SGI-221, SGI-238 ve SGI-249 ) temsil edilen “f” grubundaki bakterilerin *X. indica* (*S. thermophilum* ve *S. abbasi* nematod türleriyle ilişkili), “g” grubunda gösterilen 2 suşun ise SGI-145(b) ile birlikte *X. bovienii* türüne (*S. feltiae*, *S. weiseri*, *S. intermedium*, *S. sichuanense* ve *S. kraussei* türü nematodlarla ilişkili) ait oldukları belirlenmiştir (Şekil 3.6).

*Xenorhabdus miraniensis* n. sp. ilk defa Avusturalya’dan elde edilen ancak tür adı bilinmeyen bir entomopatojenik nematod’tan elde edilerek tanımlanmıştır (Tailliez ve ark., 2006). Daha sonra bu bakteri türü Thanwisai ve ark. (2012)

tarafından Tayland'dan elde edilen *Steinernema khoisanae* türüne ait entomopatojenik nematodlardan elde edilmiştir. Ancak Nguyen ve arkadaşları 2006 yılında Güney Afrika Cumhuriyeti topraklarından yeni tür olarak *Steinernema khoisanae* n. sp. yi tanımladıktan sonra bu nematod türüne ait 4 farklı bakteri izolasyonu çalışılan Ferreira ve arkadaşları (2013) yaptıkları çalışmada 16S rRNA gen bölgesi sekansları sonucunda SF87(T) kodlu bakterinin %98 oranında *Xenorhabdus hominickii* DSM 17903(T) suşuna benzediğini bulmuştur. Daha sonra RecA, dnaN, gltX, gyrB ve infB nükleotid gen bölgelerinin sekans dizilerini karşılaştırdığında ise bu bakteri izolasyonunun *Xenorhabdus miraniensis* DSM 17902(T) suşuna %96-97 oranında benzerlik gösterdiğini tespit etmiştir. Bununla birlikte ellerindeki izolatlarla *X. miraniensis*'in tip türü arasında DNA-DNA düzeyinde sadece %52,7'lik bir benzerlik olduğunu belirlemişlerdir. Daha sonra yaptıkları biyokimyasal analizler sonucunda ellerindeki bu 4 bakteri izolasyonunun *X. miraniensis* ve *X. beddingii* türlerine fenotipik olarak benzediğini ancak onlardan farklı olarak esculin hidrolizi sonucunda asit üretmediklerini tespit etmişlerdir. Bütün bu verilerin ardından bu izolatları yeni bir tür *Xenorhabdus khoisanae* n. sp. olarak tanımlamışlardır (Ferreira ve ark., 2013). Ancak burada ilginç olan bir durum ortaya çıkmıştır. Çünkü bir bakteri türünün birden çok nematod türüyle mutualistik olarak yaşayabildiği, oysa her entomopatojenik nematod türünün sadece bir bakteri türüyle ilişkili olduğu bilinmektedir (Kaya ve Gaugler, 1993; Forst ve Nealson, 1996; Boemare, 2002). Bu durumda *S. khoisanae* türü entomopatojenik nematodların bir kısmı *X. miraniensis* (Thanwisai ve ark., 2012), aynı türün başka izolatları ise *X. khoisanae* türü bakterilerle ilişkili görünmektedir. Eğer yapılan çalışmalarda hata yoksa böyle bir veri Dünya literatürü için yeni bir durumdur.

RecA gen bölgesi analiz sonuçlarına göre oluşturulan *Photorhabdus* cinsine ait filogenetik ağaç bakterisi suşlarının büyük bölümünün (a, b, c ve d) *Photorhabdus luminescens* türüne ait olduklarını ve bunların *P. luminescens* türünün farklı alttürleri olabileceğini göstermiştir. Filogenetik ağaca göre "b" dalı içerisinde birden fazla alttürün çıkma olasılığı da mevcut gözükmektedir (Şekil 3.7). *Photorhabdus* izolatları içerisinde sadece SGI-193 numaralı izolat *P. luminescens* subsp. *thracensis* alt türüne ait çıkmıştır. Tailliez ve ark. (2010) yaptıkları kapsamlı

sistematik çalışma sonucunda *P. luminescens* subsp. *thracensis* alttürünü *P. luminescens* türü yerine *P. temperata* türü içerisine dahil etmişlerdir.

*Photorhabdus luminescens* türüne ait bakterilerin *H. bacteriophora*, *H. indica*, *H. georgiana* nematod türleriyle ilişkili oldukları bilinmektedir (Thanwisai ve ark., 2012). Yapılan çalışmalarda Güney Afrika Cumhuriyeti topraklarında bugüne kadar *Heterorhabditis* cinsine ait *H. bacteriophora* (Hatting ve ark., 2009) ve yeni bir tür olan *H. safricana* (Malan ve ark., 2008) türleri saptanmıştır.

#### 4.2. Sonuç

Güney Afrika Cumhuriyeti topraklarından nematod izolasyon işlemleri 2003 yılından günümüze kadar devam etmiş olup elde edilen nematod izolat sayısı 123'e çıkmıştır. Bu tez çalışması kapsamında ilk defa izole edilen 123 entomopatojenik nematod izolatıyla mutualistik yaşayan bakterilerin izolasyonu ve tanımlamaları yapılmıştır. Elde edilen moleküler veriler yeni *Xenorhabdus* türünün ve *Photorhabdus luminescens* türüne bağlı yeni alttürlerin olduğunu göstermiştir.

Bu yeni tür, alttür ve izolatların ürettikleri toksinler, antibiyotik, antimikotik, insektisidal ve nematisidal aktiviteye sahip önemli sekonder metabolitlerin izole edilip tanımlanması ve kimyasal yönden incelenmesi çok önemlidir. Farklı coğrafik bir bölgede türleşme ve alttürleşme gösteren bakterilerin bugüne kadar tanımlanan sekonder metabolitlerden farklı metabolitler ürettiyor olmaları da kuvvetle muhtemeldir.

## KAYNAKLAR

Adams, B. J., Fodor, A., Koppenhöfer, H. S., Stackebrandt, E., Stock, S. P. ve Klein, M. G. 2006. Reprint of Biodiversity and systematics of nematodebacterium entomopathogens. *Biological Control* 38: 4-21.

Akamatsu, T. ve Taguchi, H. 2001. Incorporation of the whole chromosomal DNA in protoplast lysates into competent cells of *Bacillus subtilis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65 (4): 823–9.

Akhurst, R. J. 1982. Antibiotic activity of *Xenorhabdus spp.*, bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. *Journal of General Microbiology* 128: 3061–3065.

Akhurst, R. J. 1983. Taxonomic study of *Xenorhabdus*, a genus of bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 33: 38–45.

Baur, M.E., Kaya, H.K. ve Strong, D.R. 1998. Foraging ants as scavengers on entomopathogenic nematode-killed insects. *Biological Control* 12: 231–236.

Barnes, R. G. 1980. *Invertebrate zoology*. Philadelphia: Sanders College. ISBN 0-03-056747-5.

Bedding, R. A. ve Akhurst, R. J. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic Rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* 21: 109-110.



Bennett, H. P. J. ve Clarke, D. J. 2005. The pbgPE operon in *Photorhabdus luminescens* is required for pathogenicity and symbiosis. *Journal of Bacteriology* 187: 77–84.

Bird, A. F. ve Akhurst, R. J. 1983. The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. *International Journal for Parasitology* 13: 599–606.

Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey, J. R., Liu, L. X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J. R., Mackey, L. Y., Dorris, M. L., Frisse, M. J., Vida, T ve Kelley, W. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392: 71-75.

Bode, H. B., Brachmann, A., Joyce, O., Jenke-Kodama, H., Schwär, G. ve Clarke, D. J. 2007. A Type II polyketide synthase is responsible for anthraquinone biosynthesis in *Photorhabdus luminescens*. *ChemBioChem* 0000, 00: 1-9.

Bode, H. B. 2009. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. *Current Opinion in Chemical Biology*. 13: 224-230.

Boemare, N. E., Akhurst, R. J. ve Mourant, R. G. 1993. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43: 249-255.

Boemare, N. 2002. Biology, Taxonomy, and Systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. p 57-78 in Gaugler I, editor. *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing. New Jersey.

Boemare, N. ve Akhurst, R. 2006. The Genera *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: The Prokaryotes (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. eds.). Springer Science+Business Media, Inc. 6: 451–494.

Borgonie, G., García-Moyano, A., Litthauer, D., Bert, W., Bester, A., van Heerden, E., Möller, C., Erasmus, M. ve Onstott, T. C. 2011. Nematoda from the terrestrial deep subsurface of South Africa. *Nature* 474 (7349): 79–82.

Cagnolo, S.R., Donari, Y.M. ve Di Rienzo, J.A. 2004. Existence of infective juveniles in the offspring of first- and second-generation adults of *Steinernema rarum* (OLI strain): evaluation of their virulence. *Journal of Invertebrate Pathology* 85: 33–39.

Chaston, J.M, Suen, G., Tucker, S.L., Andersen, A.W., Bhasin, A., Bode, E., Bode, H.B., Brachmann, A.O., Cowles, C.E., Cowles, K.N. ve Goodrich-Blair, H. 2011. The Entomopathogenic Bacterial Endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: Convergent Lifestyles from Divergent Genomes. *PLoS ONE* 6: e27909.

Chen, Z. X., Chen, S. Y. ve Dickson, D. W. 2004. Nematology- Advances and Perspectives Volume I: Nematode Morphology, Physiology and Ecology. Tsinghua University Press Beijing, China. 636p.

Ciche, T.A., Kim, K.S., Kaufmann-Daszczuk, B., Nguyen, K.C. ve Hall, D.H. 2008. Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 2275–2287.

Clarke, D.J. 2008. *Photorhabdus*: a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. *Cellular Microbiology* 10: 2159–2167.

Cowles, K.N., Cowles, C.E., Richards, G.R., Martens, E.C. ve Goodrich-Blair, H. 2007. The global regulator Lrp contributes to mutualism, pathogenesis and phenotypic variation in the bacterium *Xenorhabdus nematophila*. *Cellular Microbiology* 9: 1311–1323.

Crow, W.T. 2002. Using Nematodes to Control Insects: Overview and Frequently Asked Questions. University of Florida. *Extension on Institute of Food and Agricultural Sciences* 1-6.

Çimen, H., Lee, M.-M., Hatting, J., Hazir, S. ve Stock, S.P. 2014a. *Steinernema innovationi* n. sp. (Panagrolaimomorpha: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode species from South Africa. *Journal of Helminthology* 3: 1–4. <http://dx.doi.org/10.1017/s0022149x14000182>.

Çimen, H., Lee, M.-M., Hatting, J., Hazir, S. ve Stock, S.P. 2014b. *Steinernema tophus* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Zootaxa* 3821(3): 337-353.

De Vlaminck, I., van Loenhout, M.T.J., Zweifel, L., den Blanken, J., Hooning, K., Hage, S., Kerssemakers, J. ve Dekker, C. 2012. Mechanism of Homology Recognition in DNA Recombination from Dual-Molecule Experiments. *Molecular Cell* 46 (5): 616–624.

Derzelle, S., Turlin, E., Duchaud, S., Pages, S. ve Kunst, F. 2004. The PhoPPhoQ two component regulatory system of *Photorhabdus luminescens* is essential for virulence in insects. *Journal of Bacteriology* 186: 1270–1279.

Dowds, B. C. A. ve Peters, A. 2002. Virulence mechanisms. In: Entomopathogenic Nematology (Gaugler, R. ed.), CABI Publishing, pp. 79–98. Wallingford, UK.

Eleftherianos, I., Millichap, P.J., Ffrench-Constant, R.H. ve Reynolds, S.E. 2006. RNAi suppression of recognition protein mediated immune responses in the tobacco hornworm *Manduca sexta* causes increased susceptibility to the insect pathogen *Photorhabdus*. *Development and Comparative Immunology* 30: 1099–1107.

Ferreira, T. van Reenen, C.A., Endo, A., Spröer, C., Malan, A.P. ve Dicks, L.M. 2013. Description of *Xenorhabdus khoisanae* sp. nov., the symbiont of the entomopathogenic nematode *Steinernema khoisanae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63(9): 3220-3224.

Ffrench-Constant, R. H., Dowling, A. ve Waterfield, N. R. 2007. Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture. *Toxicon* 49: 436-451.

Fischer-Le Saux, M., Viillard, V., Brunel, B., Normand, P., ve Boemare, N.E. 1999. Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 1645-1656.

Foltan, P. ve Puza, V. 2009. To complete their life cycle, pathogenic nematodebacteria complexes deter scavengers from feeding on their host cadaver. *Behavioural Processes* 80: 76-79.

Forst, S. ve Nealson, K.H. 1996. Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus spp.* and *Photorhabdus spp.* *Microbiology Review* 60: 21-43.

Forst, S., Dowds, B., Boemare, N. E. ve Stackebrandt, E. 1997. *Xenorhabdus* and

*Photorhabdus spp.*: bugs that kill bugs. *Annual Review of Microbiology* 51: 47-72.

Forst, S. ve Clarke, D. 2002. Bacteria-nematode symbioses. In: Gaugler R, ed. *Entomopathogenic Nematology*. Wallingford, UK: CABI Publishing. Pp 57–77.

Fuchs, S.W., Proschak, A., Jaskolla, T.W., Karas, M. ve Bode, H.B. 2011. Structure elucidation and biosynthesis of lysine-rich cyclic peptides in *Xenorhabdus nematophila*. *Organic and Biomolecular Chemistry* 9: 3130-3132.

Gaugler, R. ve Kaya, H. K. 1990. Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.

Goodrich-Blair, H. ve Clarke, D.J. 2007. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. *Molecular Microbiology* 64: 260–268.

Griffin, C.T., O’Callaghan, K.M. ve Dix, I. 2001. A self-fertile species of *Steinernema* from Indonesia: further evidence of convergent evolution amongst entomopathogenic nematodes? *Parasitology* 122: 181–186.

Gulcu, B., Hazir, S. ve Kaya, H. K. 2012. Scavenger Deterrent Factor (SDF) From Symbiotic Bacteria of Entomopathogenic Nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology* 110: 326-333.

Gulcu, B. ve Hazir, S., 2012. An alternative storage method for entomopathogenic nematodes. *Turkish Journal of Zoology* 36 (4): 562-565.

Hancock, R. E. W. ve Diamond, G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Microbiology* 8: 402-410.

Hatting, J., Patricia Stock, S. P. ve Hazir, S. 2009. Biological diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae) in South Africa. *Journal of Invertebrate Pathology* 102: 120-128.

Hazir, S., Kaya, H. K., Stock, S. P. ve Keskin, N. 2003. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. *Turkish Journal of Biology* 27: 181-202.

Hazir, S., Stackebrandt, E., Lang, E., Ehlers, R. U. ve Keskin, N. 2004. Two new subspecies of *Photorhabdus luminescens*, isolated from *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae): *Photorhabdus luminescens* subsp. *kayaii* subsp. nov. and *Photorhabdus luminescens* subsp. *thraciaensis* subsp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 36-42.

Hodda, M. 2011. Phylum Nematoda Cobb, 1932. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.) Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. *Zootaxa* 3148: 63–95.

Hominick, W. M., Briscoe, B. R., del-Pino, F. G., Heng, J., Hunt, D. J., Kozodoy, E., Mracek, Z., Nguyen, K. B., Reid, A. P., Spiridonov, S., Stock, S. P., Sturhan, D., Waturu, C. ve Yoshida, M. 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions. *Journal of Helminthology* 71: 271-298.

Ji, D. ve Kim, Y. 2004. An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibits the expression of an antibacterial peptide, cecropin, of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology* 50: 489–496.

Johnigk, S-A. ve Ehlers, R-U. 1999. Endotokia matricida in hermaphrodites of *Heterorhabditis spp.* and the effect of the food supply. *Nematology* 1 (7–8): 717–726. doi:10.1163/156854199508748. ISSN 1388-5545.

Johnsborg, O., Eldholm, V. ve Håvarstein, L.S. 2007. Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Research in Microbiology*. 158 (10): 767–78.

Kaya, H.K., 1993. Nematodes, nematomorphs, and platyhelminthes. In: *Insect Pathology* (Kaya, H. K. ed.), pp. 459-483.

Kaya, H.K. ve Gaugler, R. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology* 38: 181–206.

Kaya, H.K. ve Stock, S.P. 1997. Techniques in insect nematology. In: *Manual of Techniques in Insect Pathology* (Lacey L. ed.). Academic Press, San Diego, CA. pp. 281-324.

Kaya, H.K. ve Koppenhöfer, A.M. 1999. Biology and Ecology of Insecticidal Nematodes. In Workshop Proceedings: Optimal Use of Insecticidal Nematodes in Pest Management, pp. 1–8. Edited by S. Polavarapu, Rutgers University.

Kaya, H. K. 2002. Natural enemies and other antagonists. In: Gaugler, R. (Ed.), *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, pp. 189-202. Wallingford, UK.

Kidane, D. ve Graumann, P.L. 2005. Intracellular protein and DNA dynamics in competent *Bacillus subtilis* cells. *Cell* 122 (1): 73–84

Kim, S.H., Jeong, H.S., Kim, Y.H., Song, S.A., Lee, J.Y., Oh, S.H., Kim, H.R., Lee, J.N., Kho, W.G. ve Shin, J.H. 2012. Evaluation of DNA extraction methods and their clinical application for direct detection of causative bacteria in continuous ambulatory peritoneal dialysis culture fluids from patients with peritonitis by using broad-range PCR. *Annals of Laboratory Medicine* 32(2):119-25.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.

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

Koppenhöfer, A. M. 2007. Nematodes. In: *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (Lacey, L. A. and Kaya, H. K., eds). Springer, Germany. pp 249-264.

Lalošević, V., Lalošević, D., Capo, I., Simin, V., Galfi, A. ve Traversa, D. 2013. High infection rate of zoonotic *Eucoleus aerophilus* infection in foxes from Serbia. *Parasite* 20: 3.

Little, J.W. 1984. Autodigestion of *lexA* and phage lambda repressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 81 (5): 1375–1379.

Maggenti, A. 1981. *General nematology*. Springer-Verlag, 372p., New York.



Malan, A.P., Nguyen, K.B., De Waal, J.Y. ve Tiedt, L. 2008. *Heterorhabditis safricana* n. sp (Rhabditida : Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Nematology* 10: 381–396.

Martens, E. C. ve Goodrich-Blair, H. 2005. The *Steinernema carpocapsae* intestinal vesicle contains a subcellular structure with which *Xenorhabdus nematophila* associates during colonization initiation. *Cellular Microbiology* 7: 1723–1735.

Michod, R.E., Bernstein, H. ve Nedelcu, A.M. 2008. Adaptive value of sex in microbial pathogens. *Infection, Genetics and Evolution* 8 (3): 267–85.

Nguyen, K.B., Malan, A.P. ve Gozel, U. 2006. *Steinernema khoisanae* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Nematology* 8: 157-175.

Nollmann, F.I., Dowling, A., Kaiser, M., Deckmann, K., Grösch, S., Ffrench-Constant, R. ve Bode H.B. 2012. Synthesis of szentiamide, a depsipeptide from entomopathogenic *Xenorhabdus szentirmaii* with activity against *Plasmodium falciparum*, Beilstein *The Journal of Organic Chemistry* 8: 528-533.

Orozco, R. A., Hill, T. ve 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* 66(1): 30-39.

Pankewitz, F. ve Hilker, M. 2008. Polyketides in insects: ecological role of these widespread chemicals and evolutionary aspects of their biogenesis. *Biological Reviews* 83: 209-226.

Park, Y., Herbert, E.E., Cowles, C.E., Cowles, K.N. ve Menard, M.L. 2007. Clonal variation in *Xenorhabdus nematophila* virulence and suppression of *Manduca sexta* immunity. *Cellular Microbiology* 9: 645–656.

Poinar, G.O., Jr. 1993. Origins and phylogenetic relationships of the entomophilic *Rhabditids*, *Heterorhabditis* and *Steinernema*. *Fundamental and Applied Nematology* 16: 333–338.

Proschak, A., Schultz, K., Herrmann, J., Dowling, A.J., Brachmann, A.O., Ffrench-Constant, R., Müller, R. ve Bode, H.B. 2011. Cytotoxic fatty acid amides from *Xenorhabdus*. *ChemBioChem* 12: 2011-2015.

Ruppert, E.E., Fox, R.S. ve Barnes, R.D. 2004. *Invertebrate Zoology: A Functional Evolutionary Approach* (7th ed.). Belmont, California: Brooks/Cole. ISBN 978-0-03-025982-1.

Sahm, F., Oezen, I., Opitz, C.A., Radlwimmer, B., von Deimling, A., Ahrendt, T., Adams, S., Bode, H.B., Giullemmin, G.J., Wick, W. ve Platten, M. 2013. The endogenous tryptophan metabolite and NAD<sup>+</sup> precursor Quinolinic acid confers resistance of gliomas to oxidative stress, *Cancer Research* 73: 3225-3234.

Saitou, N. ve Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution* 4: 406-425.

Saito, Y., Taguchi, H. ve Akamatsu, T. 2006. Fate of transforming bacterial genome following incorporation into competent cells of *Bacillus subtilis*: a continuous length of incorporated DNA. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101 (3): 257–62.

Savir, Y. ve Tlustý, T. 2010. RecA-mediated homology search as a nearly optimal signal detection system. *Molecular Cell* 40 (3): 388–96.

Sharma, S., Waterfield, N., Bowen, D., Thomas, R., Holland, L., James, R. ve Ffrench-Constant, R. 2002. The lumicins: novel bacteriocins from *Photorhabdus luminescens* with similarity to the uropathogenic-specific protein (USP) from uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 214: 241-249.

Snyder, H., Stock, S.P., Kim, S.K., Flores-Lara, Y. ve Forst, S. 2007. New insights into the colonization and release processes of *Xenorhabdus nematophila* and the morphology and ultrastructure of the bacterial receptacle of its nematode host, *Steinernema carpocapsae*. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5338–5346.

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

Stock, S.P. ve Hunt, D.J. 2005. Morphology and Systematics of Nematodes Used in Biocontrol. In: Grewal, P. S., Ehlers, R. U., Shapiro-Ilan, D. I. *Nematodes as Biocontrol Agents*. CABI Publishing, 3-43.

Stock, S. P., Rivera-Orduño, B., ve Flores-Lara, Y. 2009. *Heterorhabditis sonorensis* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae), a natural pathogen of the seasonal cicada *Diceroprocta ornea* (Walker) (Homoptera: Cicadidae) in the Sonoran desert. *Journal of Invertebrate Pathology* 100: 175–184.

Stock, S.P. ve Goodrich-Blair, H. 2012. Invertebrate parasitic and pathogenic nematodes. In: *Manual of Techniques in Insect Pathology* Second Edition (Lacey L. ed.). Academic Press, San Diego, CA. pp. 373-426.

Tailliez, P., Pages, S., Ginibre, N. ve Boemare, N. 2006. New insight into diversity in the genus *Xenorhabdus*, including the description of ten new species. *International Journal of Systematic and Evolutionary* 56: 2805–2818.

Tailliez, P., Laroui, C., Ginibre, N., Paule, A., Pages, S. ve 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* 60: 1921–1937.

Thaler, J-O, Baghdiguian, S. ve Boemare, N. 1995. Purification and characterization of Xenorhabdicolin, a phage tail-like bacteriocin, from the lysogenic strain F1 of *Xenorhabdus nematophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2049-2052.

Thanwisai, A., Tandhavanant, S., Saiprom, N., Waterfield, N.R. ve Ke Long, P. 2012. Diversity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. and Their Symbiotic Entomopathogenic Nematodes from Thailand. *PLoS ONE* 7(9): e43835.

Thomas, G.M. ve Poinar, G.O. 1979. *Xenorhabdus*, new genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology* 29: 352-360.

URL 1: <http://www.gamexp.eu>

Viglierchio, D.R. 1991. *The World of Nematodes*. University of California, Davis 266pp. Sacramento, USA.

Wang, J.X. ve Bedding, R.A. 1996. Population development of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* in the larvae of *Galleria mellonella*. *Fundamental and Applied Nematology* 19: 363–367.

Waterfield, N., Bowen, D.J., Fetherston, J.D., Perry, R.D. ve Ffrench-Constant, R.H. 2001. The toxin complex genes of *Photorhabdus*: a growing gene family. *Trends in Microbiology* 9: 185–191.

Webster, J.M., Genhui, C., Kaiji, H. ve Li, J. 2002. Bacterial metabolites. In: Gaugler R, ed. *Entomopathogenic nematology*. New York: CABI. pp 99–114.

Weischer, B. ve Brown, D.J.F. 2000. *An Introduction to Nematodes: General Nematology*. Sofia, Bulgaria: Pensoft. pp. 75–76.

White, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from culture. *Science*. 66: 302-303.

Zhang, Z. 2013. Animal biodiversity: An update of classification and diversity in 2013. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.) *Animal Biodiversity: An Outline of Higher-level Classification and Survey of Taxonomic Richness* (Addenda 2013). *Zootaxa* 3703(1): 5–11.

Zhou, Q., Grundmann, F., Kaiser, M., Schiell, M., Gaudriault, S., Batzer, A., Kurz, M. ve Bode, H. B. 2013. Structure and biosynthesis of xenoamicines from entomopathogenic *Xenohabdus*. *European Journal of Chemistry* 19: 16772-16779.

## ÖZGEÇMİŞ

1989 Yılında Antalya'da doğdu. İlk, Orta ve Lise öğrenimini İzmir'de tamamladı. 2008 yılında Giresun Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne girdi. 2011-2012 yılları arasında Erasmus Öğrenci Değişim Programı ile İtalya'daki Università Studi Degli Del Molise'de okudu. 2012 yılında Giresun Üniversitesi'nden mezun oldu. Aynı yıl Giresun Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde başladığı Yüksek Lisans öğrenimi halen devam etmektedir. İyi derecede İngilizce bilmektedir.