

Türkiye İçin Yeni Bir Entomopatojen Nematod Türü; *Heterorhabditis marelatus* Liu and Berry, 1996 (Rhabditida: Heterorhabditidae)

İlker KEPENEKÇİ¹I. Alper SUSURLUK²

Geliş Tarihi: 12.01.2000

Özet: Entomopatojen nematodlar olarak *Steinernema*, *Neosteinerema* (Rhabditida: Steinernematidae) ve *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae) cinslerine ait türler, böceklerle biyolojik mücadelede, diğer nematod gruplarına göre çok daha önemli bir yere sahiptir. *Steinernema feltiae* (Filipjev 1934) Woust, Mracek, Gerdin and Bedding, 1982 ülkemizde ilk kaydedilen entomopatojen nematod türüdür. Bu tür, Özer et al. (1995) tarafından Rize' de tespit edilmiştir. Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Kampüs alanından alınan toprak örnekleri içerisinde *Heterorhabditis marelatus* Liu and Berry 1996 (Rhabditida: Heterorhabditidae) bulunmuştur. Söz konusu türün erkek birey ve enfektif larvalarına ait morfolojik ve morfometrik özellikleri belirlenerek orijinal tanımı ile karşılaştırılmış, hayat çemberi kontrollü koşullarda takip edilmiş ve literatür kayıtlarına göre yayılış alanı ve konukçuları hakkında bilgi verilmiştir. Çalışmada saptanan *H. marelatus* Türkiye nematod faunası için yeni kayıt niteliğindedir.

Anahtar Kelimeler: Entomopatojenik nematod, *Heterorhabditis marelatus*, toprak, Ankara

A New Species of Entomopathogen Nematode for Turkey *Heterorhabditis marelatus* Liu and Berry, 1996 (Rhabditida: Heterorhabditidae)

Abstract: The species of *Steinernema*, *Neosteinerema* (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae) have more important role than the other nematod groups in biological control of the insect pests. In this study, *Heterorhabditis marelatus* Liu and Berry 1996 (Rhabditida: Heterorhabditidae) was found from the soil of Agriculture Faculty Campus Areas of Ankara University. The morphological and morphometric characteristics of male and infective larvae of this species and life cycle of *H. marelatus* were determined and compared with original description (type strain). In addition, its distribution area and host were given according to the literature. *H. marelatus* is a new record for nematoda fauna of Turkey.

Key Words: Entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis marelatus*, soil, Ankara

Giriş

Entomopatojen nematodlar olarak bilinen *Steinernema*, *Neosteinerema* ve *Heterorhabditis* (Rhabditida) cinslerine ait türler, böceklerin biyolojik mücadelesinde diğer nematod gruplarına göre çok önemli bir yere sahiptir. Bu cinslere bağlı olarak Dünya' da bu güne kadar *Steinernema* cinsine ait 22, *Neosteinerema* cinsine ait 1, *Heterorhabditis* cinsine ait 8 olmak üzere toplam 31 tür tespit edilmiştir (Hominick et al. 1997).

Türkiye' de entomopatojen nematodlarla ilgili çalışmalara son yıllarda başlanmıştır. Şimdiye kadar Özer et al., (1995) tarafından Rize' den alınan toprak örneklerinde *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae) cinsine ait *S. feltiae* (Filipjev, 1934) Woust, Mracek, Gerdin and Bedding 1982 ve Kepenekçi et. al. (1999) tarafından Ekecik (Aksaray) kışlağında toplanan Kımıl (*Aelia rostrata* Boh.) (Heteroptera: Pentatomidae)

popülasyonlarında *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae) cinsine ait *H. bacteriophora* Poinar 1976 saptanmıştır.

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Kampüs arazisinden alınan toprak örneğinde *Heterorhabditis* cinsine ait *H. marelatus* Liu and Berry 1996 saptanmıştır. Söz konusu türün morfolojik ve morfometrik özellikleri belirlenerek orijinal tanımı ile karşılaştırılmış, hayat çemberi takip edilmiş ve literatür kayıtlarına göre yayılış alanı ve konukçusu verilmiştir. Çalışma sonucunda saptanan tür Türkiye nematod faunası için yeni kayıt niteliğindedir. Dünya için de yeni saptanıp tanımlanmış bir tür olup, ilk bulunduğu bölge haricinde başka bir bölgede saptandığına dair bir literatür kaydına rastlanmamıştır.

¹ Ziraî Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü - Ankara

² Ankara Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Bölümü - Ankara

Materyal ve Yöntem

Çalışmanın ana materyalini; *H. marelatus* ve bu nematod türünün izolasyonu ve üretilmesi için kullanılan *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Galleridae) kültürü oluşturmıştır.

Kampüs alanından alınan 1' er kg' lık toprak örnekleri 200' er g' lık parçalara ayrılıp ağzı kapaklı kaplar içerisine konulmuştur. Bu kaplar daha sonra içine 5' er adet son dönem *G. mellonella* larvaları konulduktan sonra 25-26 °C' de 5-6 gün bekletilmiştir. Bu süre sonunda nematodia enfekteli *G. mellonella* larvalar ayrılmış ve White-Trap metodu olarak adlandırılan iç içe geçmiş 2 petri düzeneği kullanılarak *G. mellonella* larvalarından elde edilen nematodun enfektif larva dönemi bu türün stok kültürünü oluşturmuştur (White 1927). *G. mellonella* larvalarının yetiştirilmesi için özel besin ortamı hazırlanmıştır. Bu amaçla 890 g. Un 22 g. Kuru ekmekek mayası, 500 g. Gliserin, 500 g. Bal. 445 g. Buğday kepeği kullanılmıştır (Haydak 1936, Mohammed and Coppel 1983).

Nematodların preparasyonu ve teşhisi için her bir döneme (enfektif larva ve erkek) ait ortalama 100 nematod Ringer solüsyonunda (Woodring and Kaya 1988) toplandıktan sonra; 80 °C'deki TAF (% 40'lık Formalinden 7 ml. Triethanolamine 2 ml. destile su 91 ml) içinde fikse edilmiştir (Seinhorst 1959). Daha sonra bu fiksatif içindeki nematodlar, birkaç damla laktofenol (1 kısım phenol kristali + 1 kısım laktik asit + 1 kısım destile su) içinde toplanıp bu laktofenol çukur lam üzerine konularak 50-55 °C'de ısıtılıp gliserin içinde daimi preparatları yapılarak muhafaza edilmiştir.

Daimi preparatların yapımında kullanılacak lamlar, balmumu yüzük (Wax-ring) yöntemi uygulanarak hazırlanmıştır (Hooper 1986).

Çalışmada saptanan entomopatojen nematod türünün teşhisi Nguyen and Smart (1996), Kaya and Stock (1997) ve Hominick et. al. (1997)' nin hazırlamış oldukları teşhis anahtarlarından yararlanılarak yapılmıştır. Ölçümler enfektif larva, erkek' den 20' şer adet birey üzerinden yapılmış olup teşhiste önemli ölçüm değerleri Çizelge 1. ve 2.' de verilmiştir. Ölçüm ve çizim çalışmalarında Zeiss marka çizim tüplü mikroskop kullanılmıştır. Buna ek olarak ölçüm değerlerinin Fortuner' e (1984) göre %95 olasılıkla standart hatası istatistik olarak hesaplanmıştır.

Entomopatojenik nematodların ölçümlerinde kullanılan kısaltmalar ve standart formüller

L=Vücut uzunluğu

W=Vücut genişliği

EP=Anteriör uçtan boşaltım deliğine kadar olan uzaklık

NR=Anteriör uçtan sinir halkasına kadar olan uzaklık

ES=Oesophagus uzunluğu

HM= Anteriör uçtan hemizonide kadar olan uzaklık

T=Kuyruk uzunluğu

AW= Anal vücut kalınlığı

a=L/Wb=L/ES

c=L/T

D=EP/ES

E=EP/T

Spic.=Spicül uzunluğu

Gub.=Gubernaculum uzunluğu

GS=Gubernaculum uzunluğu/Spicüle uzunluğu

Bulgular ve Tartışma

Çalışma sonucunda Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Kampüs alanından alınan toprak örneğinden *G. mellonella* kullanılarak *H. marelatus* izole edilmiştir. Saptanan entomopatojen nematod türünün morfolojik ve morfometrik özellikleri belirlenerek orijinal tanımı ile karşılaştırılmış, hayat çemberi takip edilmiş ve literatür kayıtlarına göre yayılış alanı ve konukçusu verilmiştir. Çalışmada saptanan tür Türkiye nematod faunası için yeni kayıt niteliğindedir.

Sistematikteki yeri

Rhabditida; Rhabditina; Rhabditoidea; Heterorhabditidae; *Heterorhabditis*, *H. marelatus* Liu and Berry 1996 (Şekil 1. A-G, ve Çizelge 1., 2.)

Tanımı

Obligat böcek parazitidirler. Enfektif larvalar simbiyotik bakteri taşırlar. Hem hermofroditik hem de amfimiktik dişiler mevcuttur. Entomopatojen nematodlarda enfektif larva olarak adlandırılan dönem 3. larva dönemidir.

Erkek (Şekil 1.D-G): Testis tektir, düz olarak uzanmasına karşın 80.4±12.29(60.0-95.2) µm lik bir bölümü geriye doğru bir kıvrılma gösterir. Spicüle çift, ventrale doğru hafif kıvrık olup 47.53±3.59(41.9-53.0) µm uzunluğundadır. Spicülün baş bölümü kısa ve ince bir tabaka tarafından boğularak ayrılmıştır. Gubernaculumun 22.3±2.464(18.8-26.0) µm uzunluğu genellikle spicülün uzunluğunun yarısından daha kısadır. Bursa peloderandır, Bursa bölümünde 9 çift genital papilla belirgin olup 6 çifti posterior' de (kuyruk bölümünde) 3 çifti anterior' de yer almıştır. Kuyruk 28.1±3.04(20.5-31.6) µm uzunluğunda olup bursa tarafından tamamen sarılmıştır.

Enfektif larva (Şekil 1.A-C): 3. dönem enfektif larvalar 2. dönem larvanın kütikulası (zırh) içerisindedir. Baş bölgesinde belirgin bir dorsal diş benzeri bir yapı mevcuttur (Şekil 1. A). Ağız açıklığı ve anüs kapalıdır. Stoma birbirine paralel duvarlara sahip kapalı bir oda görünümündedir. Oesophagus ile barsak küçülmüştür. Oesophagus 125.8 ± 5.7 (116.3-132.0) μm uzunluğundadır. Boşaltım deliği sinir halkasının posteriyör ünde yer almış olup anterior uca 102.8 ± 5.7 (93.6-110.0) μm mesafededir. Bağırsaklarında bir kör kese içerisinde simbiyotik bakteri taşırlar. Kuyruk 101.6 ± 5.1 (93.9-109.7) μm uzunluğunda ve sivri uçludur.

Çalışmada bulunan *H. marelatus* türüne ait bireyler gerek morfometrik ölçümler, gerekse morfolojik karakterler bakımından Liu and Berry' nin (1996) tanımına uymaktadır (Çizelge 1.).

Ancak bu çalışmada ölçümü yapılan erkek bireylerin vücut genişliği ortalaması (41.0 ± 6.3) ile Liu and Berry 1996' nın tanımındaki (50.7 ± 3.6) ortalamalar arasındaki farkın fazla olduğu görülmektedir.

Çizelge 1. *H. marelatus*' un enfektif larvalarının önemli ölçümlerinin karşılaştırılması

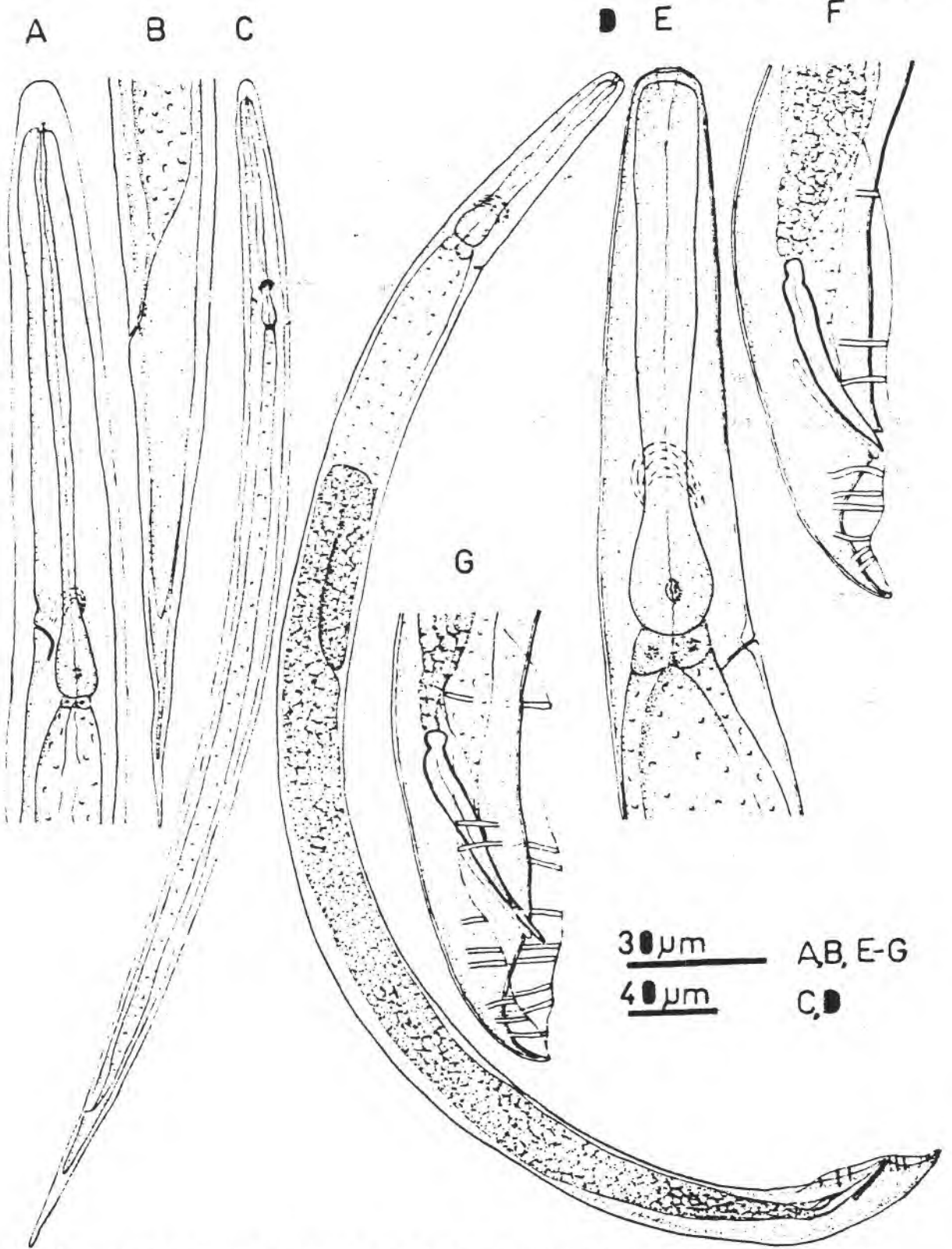
Özellikler	Bu çalışmaya göre; $\bar{X} \pm Sx$ (Min. - Maks.)	Liu and Berry, 1996; $\bar{X} \pm Sx$ (Min. - Maks.)
L*	614.9 ± 15.6 (595-637)	653.7 ± 25.5 (587.7-700.4)
W*	25 ± 1.25 (23.3-27.0)	27.6 ± 2.7 (24.2-32.2)
NR*	91.72 ± 6.36 (80-100)	98.5 ± 7.8 (83.2-112.9)
ES*	125.8 ± 5.7 (116.3-132.0)	132.7 ± 4.8 (120.8-138.6)
HM*	91.72 ± 6.36 (80-100)	105.6 ± 3.5 (99.0-112.9)
EP*	102.8 ± 5.7 (93.6-110.0)	102.4 ± 7.4 (81.2-112.9)
T*	101.6 ± 5.1 (93.9-109.7)	107.2 ± 4.5 (99.0-116.8)
A	24.5 ± 1.2 (22.5-26.5)	23.9 ± 2.5 (20.5-29.0)
B	5.0 ± 0.18 (4.62-5.30)	4.9 ± 0.2 (4.7-5.4)
C	6.1 ± 0.24 (5.64-6.40)	6.1 ± 0.3 (5.5-6.6)
D	0.85 ± 0.08 (0.74-0.98)	0.77 ± 0.1 (0.60-0.86)
E	0.98 ± 0.082 (0.87-1.10)	0.96 ± 0.08 (0.89-1.10)

*) μm olarak ölçülmüştür.

Çizelge 2. *H. marelatus*' un erkeklerinin önemli ölçümlerinin karşılaştırılması

Özellikler	Bu çalışmaya göre; $\bar{X} \pm Sx$ (Min. - Maks.)	Liu and Berry, 1996; $\bar{X} \pm Sx$ (Min. - Maks.)
L*	761.0 ± 93.7 (620.0-885.5)	942.3 ± 77.1 (805.0-1046.5)
W*	41.0 ± 6.3 (34.4-51.0)	50.7 ± 3.6 (48.3-56.4)
NR*	71.7 ± 6.7 (61.4-80.0)	73.7 ± 9.0 (61.4-95.0)
ES*	103.3 ± 6.3 (92.1-110.7)	115.2 ± 6.1 (99.0-122.8)
EP*	121.8 ± 15.9 (108.8-157.0)	130.4 ± 29.6 (110.9-168.3)
T*	28.1 ± 3.04 (20.5-31.6)	31.0 ± 3.1 (23.8-37.6)
Stoma uzunluğu*	3.19 ± 0.331 (2.8-3.8)	3.8 ± 0.5 (3.0-5.0)
Stoma genişliği*	4.94 ± 0.714 (3.8-6.0)	5.4 ± 0.8 (4.0-6.0)
Testisdeki kıvrılma*	30.4 ± 12.29 (60.0-95.2)	89.1 ± 22.1 (51.5-138.6)
AW*	18.83 ± 1.64 (16.7-22.5)	23.2 ± 2.4 (19.8-27.7)
Spic*	47.53 ± 3.59 (41.9-53.0)	45.2 ± 3.1 (41.6-49.5)
Gub*	22.3 ± 2.464 (18.8-26.0)	18.6 ± 1.2 (17.8-21.8)
GS	0.47 ± 0.06 (0.38-0.57)	0.41 ± 0.04 (0.36-0.50)

*) μm olarak ölçülmüştür.



Şekil 1. A-G. *H. marelatus*, A-C. Enfektif larva, D-G. Erkek. A,E. Baş ve Oesophagus bölgesi, B, F,G. Kuyruk bölgesi, C,D. Genel görünüş.

Konukçuları ve yayılışı

H. marelatus ilk olarak Seaside Plajı'ndan (Oregon, U.S.A) alınan kumlu toprak örneklerinde saptanmıştır. Konukçusu bilinmemektedir (Liu and Berry 1996). Yapılan literatür taramasında Dünya'da başka bir yerde saptandığına dair bir kayda rastlanmamıştır.

Türkiye'de daha önce bulunduğu dair bir kayda rastlanmamış olup yeni kayıt nefeliğindedir.

Hayat çemberi

Entomopatojen nematodların bir konukçuda oluşturdukları döl sayısı mevcut besin miktarı ile doğrudan ilişkilidir. Konukçudaki popülasyon yoğunluğu düşük ise dişi daha büyük gelişir ve yumurtalarının çoğunu koyar, geriye kalan yumurtalar dişinin vücudu içinde gelişir. Yumurtanın açılmasıyla yeni çıkan 1. dönem larvanın dudak bölgesi naziktir. Fakat kısa sürede 6 labial papilla özel şeklini alır. Hızlı bir gelişmeyi takiben 4. dönem larvalardan sonra ikinci dölün erkek ve dişileri gelişir.

Heterorhabditidler doğal açıklıkların yanı sıra sertleşmiş özel labial dişlere sahip olmalarıyla konukçuya kutikulanın daha yumuşak ve ince olduğu bölgelerden de girerler. 1. dönem Heterorhabditis larvalarından hermofrodit dişiler gelişir. Bu dişilerden seksüel generasyonu oluşturacak bireyler meydana gelir (Amfimiktik dişi ve erkek). Konukçudaki popülasyon yoğunluğu yüksek olduğunda besin ihtiyacı karşılanamaz olur, yeni oluşan dişiler küçüktür, yumurtaların çoğu veya tümü dişi vücudu içinde kalır. Dişi vücudu içinde gelişen erken dönemdeki heterorhabditidler genellikle erken dönemdeki steinernematidlerin kaldıklarından daha uzun süre dişi içinde kalırlar (Ehlers 1996).

Kaynaklar

- Ehlers, R. 1996. Current and Future Use of Nematodes in Biocontrol: Practice and Commercial Aspect with Regard to Regulatory Policy Issue. Biocontrol Science and Technology 6, 303-316.
- Fortuner, R. 1984. Statistics in taxonomic descriptions. Nematologica, 30: 187-192.
- Haydak, M.H. 1936. A food for rearing laboratory insect. J.Econ.Ent. 29 (5): 1026.
- Hominick, W.M. B.R.Briscoe, F.G. del Pino, Jian Heng, D.J. Hunt, E. Kozodoy, Z.Mracek, K.B.Nguyen, A.P. Reid, S. Spiridonov, P.Stock, D.Sturhan, C.Waturu and M.Yoshida, 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions. Journal of Helminthology 71, 271-298.

Laboratuarda yapılan gözlemler sonucunda; *H. marelatus*, *G. mellonella* larvalarına 100 birey/1 ml steril su oranında enfekte edilmiştir. 25-26 °C' de % 75-80 nisbi nem değerinde enfekteli *G. mellonella* larvaları en geç 48 saat içinde ölmüşlerdir. Larvalar öldükten sonra *H. marelatus*' un enfektif larvasının kôrbağırsağında taşıdığı simbiyont bakteriyi hemosöle vermesi ve burada bakterinin üremesi sonunda *G. mellonella*' nın homojen olarak turuncu-mor renge dönmesi de gözlenmiştir. Konukçu içine enfekte olan larvaların gelişmelerinin gözlenmesi amacıyla *G. mellonella* larvaları nematodla enfekte edildikten sonra 12 gün boyunca her gün 2 adet enfekteli larva disekte edilip binokülerde incelenmiştir. Birinci dölün hermafrodit dişilerinin 4. günde, hermafrodit dişilerden seksüel bireyler ise 5. günde meydana gelmeye başlamışlardır. 8. gün sonunda ise amfimiktik erkek ve dişiler görülmüş ve çiftleşmeye başladıkları tespit edilmiştir. 9. günde amfimiktik dişilerin içinde bol miktarda döllenmiş yumurta bulunmuş ve bu yumurtalardan bazılarının açıldığı ve 1. dönem larvanın dişi vücudu içinde hareket ettiği görülmüştür. Yumurtadan çıkan 1. dönem larva 2 gün sonunda 3. dönem larva yani enfektif larva formuna geçmektedir. 11. günde 2. dölün enfektif larvaları *G. mellonella* larvasını yeni konukçular aramak amacıyla terk etmeye başladıkları gözlenmiştir. Bu terk ediş 12. günün sonuna kadar devam etmiştir.

Teşekkür

Bu araştırmada elde edilen entomopatojen nematod türü Dr. İlker Kepenekci tarafından teşhis edilmiş olup Dr. Khuong B. Nguyen tarafından da doğrulanmıştır. Dr. Khuong B. Nguyen'e yoğun çalışma temposuna rağmen teşhise zaman ayırdığı için teşekkür ederiz.

- Hooper, D.J. 1986. Handling fixing, staining and mounting nematodes. In: Southey,J.F. (ed). Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Her Majesty' s stationery office, London: 59-80.
- Kaya, H. K. and S. P. Stock, 1997. Techniques in insect nematology, Manual of Techniques in Insect Pathology, Chapter VI. 281-324.
- Kepenekci, İ., N.,Babaroğlu, G.,Öztürk, and S.,Halıcı, 1999. Türkiye için yeni bir Entomopatojen nematod *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae). 4. Biyolojik Mücadele Kongresi, Adana.
- Liu, J. and R.E., Berry, 1996. *Heterorhabditis marelatus* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Oregon, USA. Fundamental and Journal of Invertebrate Pathology 67, 48-54.

- Mohamed, M.A. and H.C., Coppel, 1983. Mass rearing of the greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Galleridae) for small-scale laboratory studies. *Great Lakes entomol.* 16 (4) 139-141.
- Nguyen, K.B. and G.C.Smart,Jr., 1996. Identification of Entomopathogenic Nematodes in the Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nemata:Rhabditida), *Journal of Nematology* 28: 286-300.
- Özer, N., N.Keskin, and Z,Kırbaş, 1995. Occurence of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae: Heterorhabditidae) in Turkey. *Nematologica* 41: 639-640.
- Seinhorst, J.W. 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica* 4, 117-128.
- White, G.F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66, 302-303.
- Woodring, J.L. and H.K.,Kaya, 1988. *Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: a handbook of techniques.* Southern Cooperative Series Bulletin. 331. Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, A.K. 30 pp.