



Entomopatojen nematodlar ve simbiyotik bakterileri

Esengül Özdemir^{1*} Şerife Bayram²

¹⁻²Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü – 06110 Ankara

*Sorumlu Yazar

E-posta: ozdemire@ankara.edu.tr

Geliş Tarihi: 15 Şubat 2017

Kabul Tarihi: 20 Nisan 2017

Abstract: Entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) are widely used in biological control of insect pests. These nematodes are characterized by their mutualistic relationship with symbiotic bacteria. The bacterial symbionts are carried throughout the whole intestine of infective juveniles in Heterorhabditidae or in a special vesicle in infective juveniles in Steinernematidae. The nematodes provide protection and transportation for their bacterial symbionts. The bacterial symbionts in turn kill the host and establish and maintain suitable conditions for nematode reproduction, providing nutrients and antimicrobial substances that inhibit the growth of other microorganisms. In this article, the relation between the entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria and also the possibilities of the utility of these entomopathogenic nematodes&symbiotic bacteria complexes in agricultural pest management have been discussed.

Keywords: Entomopathogenic nematodes, symbiotic bacteria, biological control, Heterorhabditidae, Steinernematidae

Özet: Entomopatojen nematodlar (Heterorhabditidae ve Steinernematidae) zararlı böceklerin biyolojik mücadelesinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bu nematodlar, simbiyotik bakterilerle olan mutualistik ilişkileri ile karakterize edilmektedirler. Bakteriyel simbiyontlar, Heterorhabditidae infektif juvenillerinin tüm sindirim kanalları boyunca, Steinernematidae’de ise infektif juvenillerdeki özel bir kese içerisinde taşınmaktadır. Nematodlar bakteriyel simbiyontları için koruma ve taşıma olanağı sağlamaktadırlar. Simbiyontlar ise sırasıyla konukçu böceği öldürmek, nematodların üremesi için uygun koşulları oluşturmak ve bu koşulların devamlılığını sağlamak, besin ve başka mikroorganizmaların gelişmesini engelleyen antimikrobiyal içerikler sağlamak gibi görevler üstlenirler. Bu makale kapsamında entomopatojen nematodlar ve simbiyotik bakterileri ile olan ilişkileri tartışılmış ve bu entomopatojen nematod simbiyont bakteri komplekslerinin tarımsal zararlılarla mücadelede kullanım olanakları tartışılmıştır.

Anahtar sözcükler: Entomopatojen nematod, simbiyotik bakteri, biyolojik mücadele, Heterorhabditidae, Steinernematidae

GİRİŞ

Tarımsal üretimde kimyasal pestisitlerin çevre ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri konusundaki farkındalığın artmasına bağlı olarak zararlılar ile mücadelede alternatif yöntemlerin araştırılması bir zorunluluk haline gelmiştir. Bu yöntemler içerisinde en önemlilerden bir tanesi olan biyolojik mücadele kapsamında, obligat böcek paraziti olan entomopatojen nematodlar üzerinde en çok çalışılan konulardan bir tanesidir [22]. Toprak entomopatojen nematodların doğal yaşam ortamıdır ve parazitoid ve predatörlerin bu ortama girişleri mümkün olmadığı için, entomopatojen nematodların özellikle bu ortamda önemleri daha da belirgin hale gelmektedir.

Entomopatojen nematodlar simbiyotik bakterileri ile birlikte geniş bir konukçu böcek yelpazesine sahip olup, bir insektisidal kompleks oluşturmaktadırlar. Bitkisel üretimde zararlı böceklerin kontrolünde entomopatojen nematodların kullanılabilmesi, bu simbiyotik bakteriler ve nematodlar ile bakterilerin etkileşimleri hakkındaki bilgimize bağlı durumdadır [2]. Bu bilgiye olan ihtiyaç ise, biyolojik mücadelenin zaman içerisinde bir zorunluluk haline gelmesinden dolayı ortaya çıkmıştır.

Entomopatojen nematodlar, iki familyadan oluşmaktadır. Bu familyalar: Steinernematidae (Chitwood&Chitwood 1937) ve Heterorhabditidae’dır [29]. Steinernematidae familyası 50’den fazla türü olan *Steinernema* (Travassos 1927) cinsi ve sadece *Neosteinerinema longicurvicauda* türüne sahip olan *Neosteinerinema* (Nguyen&Smart 1994) cinslerinden oluşmaktadır. Heterorhabditidae familyası ise sadece

Heterorhabditis cinsine sahip olan monotipik bir familyadır ve bu cins içerisinde bir düzineden fazla tür tanımlanmıştır (Çizelge 1) [35].

Entomopatojen nematod familyaları Steinernematidae ve Heterorhabditidae, gram negatif *Enterobacteriaceae* familyasından sırası ile *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* cinsi bakteriler ile simbiyotik bir ilişki içerisinde bulunmaktadır. Her iki bakteri de *Enterobacteriaceae* familyasından olmalarına rağmen nitratı bağlamazlar ve sınırlı sayıda karbondihidratı fermente ederler. Bu bakteriler, nematodun serbest yaşayan ve infektif juvenil (3. dönem) adı verilen formunun midesinde taşınırlar. İnfektif juveniller toprakta böcek larvasını bulduktan sonra larvanın hemosölüne bir giriş noktası elde ederler. Simbiyotik bakteriler, çoğalıp böceğin ölümünden ve kadavrayı nematodun gelişme ve çoğalması için ideal olan bir besin çorbasına dönüştürmekten sorumlu olan çok miktarda toksin ve hidrolitik ekzoenzimi üretecekleri böcek hemolemfine yayılırlar. Bunu müteakiben, 48 saat içerisinde konukçunun ölümü gerçekleşmektedir. Simbiyotik bakteriler ve zarar görmüş dokularla beslenen nematodlar, böceğin kadavrası içerisinde gelişip, üremektedirler [33].

Entomopatojen nematodlar ve simbiyotik bakterilerinin kısa tarihçesi

İlk entomopatojen nematod Steiner adlı bilim insanı tarafından 1923 yılında *Apleclana kraussei* (Şimdi *Steinernema kraussei*) olarak tanımlanmakla birlikte o dönemde bu nematodun sistematikteki yeri tam olarak belirlenmemiştir. İkinci entomopatojen nematod olan *Neoapectana glaseri* Steiner (1929), Steiner tarafından Oxyuridae familyası içerisinde tanımlanmıştır. Bu

Çizelge 1. Entomopatojen nematodlar ve simbiyont türler [35]

Steinernematidae	Bakteriyel Simbiyont
Steinernema Travassos, 1977	
<i>S. abbasi</i>	<i>X. indica</i>
<i>S. aciari</i>	Bilinmiyor
<i>S. affine</i> (Bovien, 1937)	<i>X. bovienii</i>
<i>S. akhursti</i>	Bilinmiyor
<i>S. anatoliense</i>	<i>X. bovienii</i>
<i>S. apuliae</i>	Bilinmiyor
<i>S. arenarium</i> (Artyukhovskiy, 1967)	<i>X. kozodoii</i>
<i>S. ashunense</i>	Bilinmiyor
<i>S. bedding</i>	Bilinmiyor
<i>S. asiaticum</i>	Bilinmiyor
<i>S. carpocapsae</i> (Weiser, 1955)	<i>X. nematophila</i>
<i>S. ceratophorum</i>	Bilinmiyor
<i>S. cubanum</i>	<i>X. poinarii</i>
<i>S. diaprepesi</i>	<i>X. doucetiae</i>
<i>S. feltiae</i> (Filipjev, 1934)	<i>X. bovienii</i>
<i>S. glaseri</i> (Steiner, 1929)	<i>X. poinarii</i>
<i>S. hermaphroditum</i>	<i>X. griffinae</i>
<i>S. intermedium</i> (Poinar, 1985)	<i>X. bovienii</i>
<i>S. jollieti</i>	<i>X. bovienii</i>
<i>S. kari</i>	<i>X. hominickii</i>
<i>S. kraussei</i> (Steiner, 1923)	<i>X. bovienii</i>
<i>S. leizhouense</i>	Bilinmiyor
<i>S. litorale</i>	<i>X. bovienii</i>
<i>S. loci</i>	Bilinmiyor
<i>S. longicaudum</i>	Bilinmiyor
<i>S. monticolum</i>	<i>X. hominickii</i>
<i>S. neocurtillae</i>	Bilinmiyor
<i>S. oregonense</i>	<i>X. bovienii</i>
<i>S. pakistanense</i>	Bilinmiyor
<i>S. puertoricense</i>	<i>X. romani</i>
<i>S. puntauvene</i>	<i>X. bovienii</i>
<i>S. rarum</i> (de Doucet, 1986)	<i>X. szentirmaii</i>
<i>S. riobrave</i>	<i>X. cabanillasii</i>
<i>S. ritteri</i> de	Bilinmiyor
<i>S. sangi</i>	Bilinmiyor
<i>S. sasonense</i>	Bilinmiyor
<i>S. scapterisci</i>	<i>X. innexi</i>
<i>S. scarabaei</i>	<i>X. koppenhoferii</i>
<i>S. siamkayai</i>	<i>X. stockiae</i>
<i>S. sichuanense</i>	Bilinmiyor
<i>S. silvaticum</i>	<i>X. bovienii</i>
<i>S. tami</i>	Bilinmiyor
<i>S. thanhi</i>	Bilinmiyor
<i>S. websteri</i>	<i>X. nematophila</i>
<i>S. weiseri</i>	<i>X. bovienii</i>
<i>S. thermophilum</i>	<i>X. indica</i>
<i>S. yirgalemense</i>	Bilinmiyor
Neosteinerma Nguyen and Smart, 1994	
<i>Neosteinerma longicurvicauda</i>	Bilinmiyor
Heterorhabditidae	
Heterorhabditis Poinar, 1976	
<i>H. baujardi</i>	Bilinmiyor
<i>H. brevicaudis</i>	Bilinmiyor
<i>H. downsi</i>	<i>P. temperata</i>
<i>H. floridensis</i>	Bilinmiyor
<i>H. indica</i>	<i>P. luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>
<i>H. marelata</i>	Bilinmiyor
<i>H. megidis</i>	<i>P. temperata</i>
<i>H. mexicana</i>	Bilinmiyor
<i>H. poinari</i>	Bilinmiyor
<i>H. taysearae</i>	Bilinmiyor
<i>H. zealandica</i>	<i>P. temperata</i>

nematod, ilk olarak Japon böceği (*Popillia japonica*)'ne karşı kullanılmıştır. Daha sonra Jaroslav Weiser tarafından 1955 yılında elma içkurdu larvalarından *Neoalectana carpocapse*'nin Avrupa popülasyonunu ve aynı yıl Dutky ve Hough kuzeydoğu Amerika'daki elma içkurdu larvalarından o zaman için henüz tanımlanmamış olan bir steinernematid DD-136 ırkını izole etmiştir. Bu gelişmeler ile birlikte entomopatojen nematodların patojeniteleri ve biyolojileri ile ilgili ciddi çalışmalar başlamıştır. Weiser'in, 1965 yılında, morfoloji ve hibridizasyon çalışmalarında kullanılan *S. carpocapse* kültürlerini elde etmesinin ardından *S. carpocapse*'nin Çekoslovakya ırkı ve Kuzey Amerika DD-136 ırkının aynı türe ait olduğu ortaya konulmuştur [30].

İlk olarak *Achromobacter nematophilus* adı verilen ve *S. carpocapse* ile bağlantılı olan simbiyotik bakteri Poinar ve Thomas (1965) tarafından tanımlanmıştır. Nematodun infektif juvenillerinde bu bakterinin konumu ışık mikroskobu ve daha sonra elektron mikroskobu kullanılarak gösterilmiştir [30, 32]. Aynı süreçte bu bakterinin nematodun gelişimindeki ve konukçunun ölümündeki rolü de açığa kavuşturulmuştur ve ardından bu bakteri yeni bir cins olan *Xenorhabdus* cinsine dahil edilmiştir [34].

Heterorhabditis cinsi nematodlar ilk olarak 1976 yılında tespit edilmiş ve bu nematod ile simbiyotik yaşayan *Xenorhabditis luminescence* bakterisi ise 1979 yılında tanımlanmıştır [15,34]. Bu bakterinin en etkileyici yönlerinden biri floresan ışığı yayma yeteneğidir; hatta bu özellik o kadar barizdir ki enfekte olmuş böcek kadavrasının tamamı karanlıkta parlamaktadır. Fakat bu bakteri türü daha sonra *Photorhabdus* cinsi içerisine dahil edilmiştir [1].

Nematodlar ve bakteriler

Bakteriler ve nematodlar arasındaki simbiyoz vibriyon ve mürekkep balığı arasındaki ilişki ile benzerlikler taşımaktadır. Örneğin, hem *Photorhabdus* hem de *Xenorhabdus*'un ilişkileri obligat değildir ve her ikisi de laboratuvar koşullarında nematoda bağımlı olmaksızın gelişebilmektedirler. Buna ek olarak nematod ile bakteri arasındaki simbiyotik ilişkide çok yüksek düzeyde bir özgünlük zorunludur. Bu özgünlük genel anlamda bakterinin bir türünün nematodun bir türüne has olduğu *Heterorhabditis-Photorhabdus* çifti için çok daha sıktır [9].

Daha önce de belirtildiği gibi EPN'ler *Steinernema* spp. ve *Heterorhabditis* spp. sırası ile Rhabditidae ve Strongyloididae familyalarına bağlı olan farklı gruplardan nematodlardır. *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* ise Enterobacteriaceae familyasından monofiletik gruplar olup, EPN ile bağlantısı olmayan bakterilerden çok daha fazla ilişkileri vardır. Her iki EPN grubu da benzer yaşam döngüsüne sahiptir fakat her iki cinsin kendi simbiyotik etkileşimleri ile ilgili belirgin farklılıklar bulunmaktadır.

Farklılıklardan bir tanesi nematodun çoğalma şeklidir. *Heterorhabditis* spp.'nin çevreye göre şekillenen hem hermafrodit hem de seksüel çoğalma şekilleri vardır. Bu cins ilk dölden sonra seksüel üremenin kolaylaşabilmesi için yalnız bir infektif juvenilden çoğalabilmektedir. *Steinernema* spp. ise sadece seksüel olarak çoğalabilmektedir. Diğer bir farklılık ise simbiyontun infektif juvenil içerisindeki fiziki lokasyonudur. *H. bacteriophora* Poinar bağırsağının ön kısmında aşağı yukarı 130 ve besin kanalı boyunca değişen sayılarda simbiyotik bakteriyi taşırken [3] *S. carpocapse* (Weiser) ise bağırsağın ön kısmındaki iki loblu bir vezikülde 30 ila 200 arasında simbiyotik bakteri taşımaktadır [25]. Her iki nematoda da simbiyontlar böcek hemosölüne yayılıp patojenik olana kadar haftalarca yaşayabilmektedir. Bu iki nematod cinsinin yayılma mekanizmaları da farklılık göstermektedir. *H. bacteriophora* infektif juvenilleri simbiyotik bakterileri ağız yoluyla kusma benzeri bir hareket ile yayırken [3], *S. carpocapse* infektif juvenilleri ise simbiyontlarını dışkılayarak yaymaktadırlar [26].

Kusma sırasında bakteri tek tek ya da gruplar halinde 300 dakika kadar her iki dakikada ortalama bir bakteri salınacak şekilde devam edebilir. Dışkılama hareketinin ise hemolemf faktörleri tarafından uyarıldığı düşünülmektedir.

Bu farklılıklar dışında her iki türe ait simbiyotik bakterilerin de belirgin fenotipik özellik farklılıkları mevcuttur (Çizelge 2). *P. luminescens* katalaz aktivitesine sahiptir, biyoluminesanstur; aynı zamanda hidrokstisilben antibiyotikleri ve anthraquinon renk pigmenti bileşenleri üretmektedir.

EPN-bakteri kompleksleri bir defa konukçu böceği başarılı bir şekilde öldürdüklerinde, kadavra içerisinde gelişmeye ve çoğalmaya devam ederler. Nematodun gelişmesi için simbiyont olan ihtiyacı, *H. bacteriophora*'da obligat olarak ortaya çıkmaktadır. Simbiyontların yokluğunda infektif juvenillerden yeni bir döl formu çok az sayıda ortaya çıkmakta ve bu döl üreme olgunluğuna ulaşmamaktadır. *Steirnerma* spp. azalan bir verimle de olsa, hem konukçu böcek üzerinde hem de çeşitli agar ve likit ortamlar üzerinde non-simbiyont bakterileri kullanarak gelişip üreyebilmektedirler [2]. Tipik böcek enfeksiyonlarında, nematodların çoğunluğu doğrudan infektif 3. dönem juvenil olurken, her iki nematod da 2-3 döl gelişmekte olup daha sonra bu gelişen döllere de simbiyotik bakteriler tarafından kolonize edilen IJ'lere dönüşmektedirler.

Heterorhabditis spp. ve *Steirnerma* spp. hangi bakteriyi taşıdıklarına göre çok güçlü bir ayrıma sahiptirler [9]. Nematodlar non-simbiyont bakteriler ile karşılaştıkları durumda, simbiyotik bakterinin monokültürlerini içeren IJ'ler simbiyont olmayandan ayrıma yeteneğine de sahiptirler. Bu özelleşmenin altında yatan mekanizma ise henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Entomopatojen nematodlar, davranış, konukçu yelpazesi, infektivite, çoğalma ve çevresel tolerans konularında önemli ölçüde çeşitlilik göstermektedirler. Bu biyolojik çeşitlilik nematodların genetik çeşitliliğini daha fazla karakterize etmek için daha da çok ilgi uyandırmaktadır. Çünkü, yeni ırklar ve yeni türler farklı biyolojik ve/veya ekolojik özelliklere sahip olabilirler ve aynı zamanda önemli tarımsal zararlılara karşı bir biyolojik mücadele ajanı olarak tahmin edildiklerinden daha kullanışlı olabilirler [5, 27].

Çizelge 2. *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* ayrımı

Fenotipik özellik	<i>P. luminescens</i>	<i>X. nematophila</i>
Katalaz	+	-
Biyoluminesans	+	-
Pigmentler	Anthraquinonlar	-
Antibiyotikler	Hidroksistilben-ler	Xenocoumamins
		Xenorhabdins
		İndol türevleri
Kristal proteinler	11.6 kDa	26 kDa
	11.3 kDa	22 kDa
Üreaz aktivitesi	d	-
İndol üretimi	d	-
Aeskulin hidrolizi	d	-

d= ırka bağlı [6].

Simbiyotik bakterilerin biyolojileri

Her iki simbiyotik bakterinin de yaşam döngülerine bakıldığında parazitezmin, nematodun böceğin ağız, anüs ve solunum deliklerinden veya doğrudan integüment yoluyla içeri girmesi (genellikle *Heterorhabditis*'te) ile başladığı görülmektedir. Nematodlar konukçuya giriş yaptıktan sonra, bakteriyel simbiyontları salacakları hemolemfte doğru hareket ederler. Hemolemf içerisinde bakteriler çoğalır ve böcek kadavrasını nematodun gelişip çoğalacağı bir besin çorbasına dönüştürürken böceği öldürürler. Nematodlar bir ila üç döl üredikten sonra, infektif juvenillerin yeni dölünün

gelişmesini uyarır ve karakterize edilememiş çeşitli çevresel uyarımları alır. Tek bir böcek kadavrasından yüzbinlerce infektif juvenil çıkmadan önce, bu infektif juvenillere bakteriler yerleşerek üzerlerinde koloniler oluştururlar. Bu hayat döngüsü süresince, *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* üç tane farklı rolü başarılı bir şekilde yerine getirmek zorundadır. Bunlar: (i) böceğin hızlı bir şekilde öldürülmesi, (ii) nematodun gelişme ve çoğalmasını kolaylaştırmak için böcek kadavrasından besin üretilmesi, (iii) nematodun infektif juvenilleri içerisinde gelişme ve kolonizasyonunun gerçekleştirilmesidir [9].

Steirnerma spp. toksik bir oluşum meydana getirmekte ve böcekteki aktif antimikrobiyal peptidlere karşı bir bağışıklık durdurucu faktör üretmektedir. *Heterorhabditis* ile ilgili olarak ise bu konuda henüz bir şey bilinmemektedir [9]. Her iki cinsin infektif juvenilleri konukçu vücut boşluğuna kendi bakterilerini salmakta ve burada 4. döneme ve ardından ergin döneme geçmektedirler. Böcek genel olarak septisemiden ölmektedir. Bazen bakteriyel bir toksemi septisemi ile sonuçlanmaktadır [6].

Simbiyotik bakterilerin hayat döngülerindeki fizyolojik durumlar

EPN ve simbiyotik bakteri arasındaki mutualistik ilişki foretik, patojenik ve saprofitik olmak üzere üç fazdan oluşmaktadır.

Foretik faz, bakterinin ve bu bakteri için vektör konumunda olan böceğin aktif olmadığı, uyusuk dönemleridir. Bakteriler IJ'nin bağırsağında, böcek hemosölüne salınacakları ana kadar bütün çevresel etkilerden çok iyi bir şekilde yalıtılmış ve korunmuş şekilde barınmaktadır [31].

Patojenik fazda, IJ'ler bakteriyel simbiyontlarını potansiyel konukçu böceğe doğru taşımaktadırlar. Nematod böcek hemosölüne girdiği andan itibaren EPN-bakteri kompleksi böceğin, enkapsülasyon ya da melanizasyon gibisavunma mekanizmaları ile karşı karşıya kalmaktadır ve hemen hemen eş zamanlı olarak, bakteriyel simbiyontlar IJ'lerden dışarıya salıverilmektedirler [3, 26]. Bakteri hücreleri salındıktan sonra fagositlenebilirler, cecropin gibi antimikrobiyal peptidler tarafından zarar verilebilirler ve granülositler tarafından nodüllere ayrılabilirler. Nematodlar ve bakteriler böceğin bu savunma tepkisine görünür bir şekilde işbirliği içerisinde savaşırlar. Örneğin, nematod tanıma ve melanizasyon için [22, 37] ve aynı zamanda hemolemfin antimikrobiyal aktivitesi için gerekli olan profenoloksidaz yapısını inhibe eder [14].

Bir kez konukçu böcek öldü mü, nematod ve bakterinin böceğin kadavrasını içerisinde çoğalacağı saprofitik faz başlamaktadır [24].

İki farklı ekolojik nişle ilgili olarak simbiyontların hayat döngüsünde iki farklı fizyolojik durum söz konusudur. Bunlardan ilki nematod konukçunun dinlenme dönemindeki foretik durum: *Xenorhabdus*, *Steirnerma* infektif juvenillerinin özel bir bağırsak vezikülünde doğal olarak ortaya çıkmaktayken, *Photorhabdus*, genellikle *Heterorhabditis* infektif juvenillerinin midelerinin ön kısmında bulunmaktadır. İkinci durum ise, bakterinin hemolemfde inokulasyondan sonra böceğin içerisinde çoğaldığı vejetatif durumdur. Sonuç olarak, simbiyontlar fakir ve zengin besin ortamı durumuna göre değişim göstermektedir. Hayvanlarla simbiyotik ilişki içerisinde olan birçok diğer bakteri kıyasladığında bu bakterilerin hayat döngülerinin oldukça özgün olduğu görülmektedir.

Bakterilerin virülensi ve nematodlara katkıları

Bazı ender ırklar dışında, genel anlamıyla böceğin vücut boşluğuna nematodun penetrasyonu ile bakteriyel enfeksiyon başlamaktadır. Böyle bir durumda böcek midesinde herhangi bir gelişme rapor edilmemiştir. Nematod, bakteri ve böcek etkileşimine bağlı olarak,

patojenik süreç bakteri ya da nematodlardan birinin ya da her ikisinin birden etkisiyle türlerine göre bazı böceklerde direnç ile sonuçlanabilmektedir.

Entomopatojen Nematodların Kitle Üretimleri ve Biyolojik Mücadelede Kullanımları

Entomopatojen nematodlar, in vivo ya da katı veya sıvı ortamda in vitro olarak kitle halinde üretilebilmektedirler [10]. Sıvı fermentasyon yöntemi, entomopatojen nematodların en ucuz kitlesel üretim yöntemidir ve bu metod endüstrileşmiş ülkelerin tercih ettiği bir yöntemdir [18]. Nematodlar türlerine bağlı olarak, 250 000 IJ/mL'ye kadar 7500-8000 litrelik fermentasyon kazanlarında kolayca üretilebilmektedirler. Son yıllarda ise in vivo olarak üretilen entomopatojen nematodlar çoğunlukla bahçe, sera ve çim alanlarda kullanılmaya başlanılmışlardır [18,23]. Biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılan entomopatojen nematod türleri Çizelge 3'te verilmiştir.

Formülasyon

Çizelge 3. Biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılan entomopatojen nematod türleri (<http://www.biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/nematodes.php>)

Zararlınn bilimsel adı	Hedef alınan bitkiler	Etkili nematodlar*
<i>Platyptilia carduidactyla</i>	Enginar	Sc
Lepidoptera: Noctuidae	Sebzeler	Sc, Sf, Sr
<i>Opogona sachari</i>	Süs bitkileri	Hb, Sc
<i>Cosmopolites sordidus</i>	Muz	Sc, Sf, Sg
<i>Sphenophorus</i> spp.(Coleoptera: Curculionidae)	Çim	Hb, Sc
<i>Agrotis ipsilon</i>	Çim, Sebze	Sc
<i>Otiorynchus sulcatus</i>	Böğürtlengiller, süsbitkileri	Hb, Hd, Hm, Hmeg, Sc, Sg
<i>Synanthedon</i> spp. ve diğer sesiidler	Meyve ağaçları ve süs bit	Hb, Sc, Sf
<i>Ctenocephalides felis</i>	Asma, çim	Sc
<i>Pachnaeus</i> spp.(Coleoptera: Curculionidae)	Turunçgiller, süsbitkileri	Sr, Hb
<i>Cydia pomonella</i>	Yumuşak çekirdekliiler	Sc, Sf
<i>Helicoverpa zea</i>	Sebzeler	Sc, Sf, Sr
<i>Diabrotica</i> spp.	Sebzeler	Hb, Sc
<i>Chrysoteuchia topiaria</i>	Yaban mersini	Sc
Diptera: Tipulidae	Çim	Sc
<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Turunçgiller, süs bitkileri	Hb, Sr
Diptera: Sciaridae	Mantarlar, seralar	Sf, Hb
<i>Vitacea polistiformis</i>	Üzümler	Hb, Hz
<i>Macronoctua onusta</i>	Iris	Hb, Sc
<i>Hyllobius albietis</i>	Orman bitkileri	Hd, Sc
<i>Liriomyza</i> spp. (Diptera: Agromyzidae)	Sebze, Süs bitkileri	Sc, Sf
<i>Scapteriscus</i> spp.	Çim	Sc, Sr, Scap
<i>Amyelois transitella</i>	Nut and fruit trees	Sc
<i>Conotrachelus nenuphar</i>	Meyve Ağaçları	Sr
Coleoptera: Scarabaeidae	Çim, Süs bitkileri	Hb, Sc, Sg, Ss, Hz
<i>Scatella</i> spp.	Böğürtlengiller	Sc, Sf
<i>Otiorynchus ovatus</i>	Böğürtlengiller	Hm
<i>Aethina tumida</i>	Anı kovanları	Yes (Hi, Sr)
<i>Cylas formicarius</i>	Tatlı patates	Hb, Sc, Sf

* Hb=*H. bacteriophora*, Hd = *H. downesi*, Hi = *H. indica*, Hm= *H. marellata*, Hmeg = *H. megidis*,

Hz = *H. zealandica*, Sc=*S. carpocapsae*, Sf=*S. feltiae*, Sg=*S. glaseri*, Sk = *S. kushidai*, Sr=*S. riobrave*, Sscap=*S. scapterisci*, Ss = *S. scarabaei*.

Formülasyon, fonksiyonel ve inert bileşenlerin eklenmesi ile aktif bir içerikten bir ürünün hazırlanmasını ifade etmektedir. Formülasyon, aktif bir içeriğin aktivitesini, emilimini, ilgili yere ulaşmasını, kullanım kolaylığını ve depolama stabilitesini artırmak için tasarlanmıştır. Pestisit formülasyon içeriklerinin tipik örnekleri emici maddeleri, adsorbentleri, topaklanmayı önleyici ajanları, antimikrobiyal ajanları, antioksidantları, bağlayıcıları, taşıyıcıları, yayıcıları, nem tutucuları, koruyucuları, çözücülerini, yüzey aktif maddeleri, kıvamaştırıcıları ve UV emicileri içermektedir. Entomopatojen nematod formülasyonlarının bütün konsepti geleneksel pestisit formülasyonlarına benzemesine rağmen, nematodlar kendilerine has bazı zorluklara sahiptir. Yüksek oksijen ve nem ihtiyacı, ekstrem sıcaklıklara hassaslık ve infektif juvenillerin farklı davranış özellikleri formülasyon metodunun ve içeriğin seçimini kısıtlamaktadır. Nematod formülasyonları geliştirmenin ana hedefleri, kalitenin sağlanması, depolama stabilitesinin artırılması ve taşınma ve kullanım kolaylığı, taşıma ücretlerinin azaltılması ve uygulama sonrasındaki hayatta kalma süresinin artırılmasıdır [11]. Başlıca formülasyon biçimlerinde Steinernematid ve Heterorhabdit nematodların beklenen raf ömürleri Çizelge 4'de verilmiştir.

İnfektif juveniller, soğutmalı tanklarda aylarca depolanabilmelerine rağmen, yüksek fiyatlar ve her yerde eşit kaliteyi sağlamanın zorluklarından dolayı bu metod çok fazla yaygınlaşmamıştır. Yüksek oksijen ihtiyacı, bazı nematod türlerinin düşük sıcaklıklara fazla toleransları olmaması, mikrobiyal bulaşmaya karşı hassaslık ve antimikrobiyal ajanların toksisitesi su içerisinde depolanan nematodların kalitesini etkileyen faktörlerdir. Bu nedenle, nematodlar üretildikten çok kısa süre sonra genellikle yarı likit veya likit olmayan substratlar olarak formüle edilmektedirler [11].

Entomopatojen nematod preparatları günümüz teknolojisi ile, formülasyona ve nematod türüne bağlı olarak, buzdolabında 1 aydan 7 aya kadar saklanabilmektedirler. Yukarıda da belirtildiği gibi optimum saklama sıcaklığı türlere göre değişmektedir. Fakat genellikle, Steinernematidler en iyi olarak 4-8°C, heterorhabditidler ise 10-15°C arasında depolanabilmektedirler.

Entomopatojen Nematodların Biyolojik Mücadelede Kullanımları

Birçok nematod türü böceklerle ilişkilidir ve şimdiye kadar, böceklerle parazitik ilişki içerisinde olan 23 nematod familyası tanımlanmıştır. Bu familyalardan 7 tanesi böcek parazitidir ve bu familyalar: Mermithidae ve Tetradeumatidae (Takım: Stichosomida), Allantonematidae, Phaenopsitylenchida ve Sphaerulairidae (Takım: Tylenchida), Heterorhabditidae ve Steinernematidae (Takım: Rhabditida)'dir. Günümüzde, sadece Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarından nematodlar mikrobiyal insektisit olarak kullanılmaktadır ve çeşitli şirketler tarafından ticari olarak üretilip pazarlanmaktadır [18]. Diğer nematod türlerinin hem kültüre alınmalarının zor olmasından ötürü hem de virülensliklerinin kısıtlı olmasından ötürü mikrobiyal kontrolde kullanıma potansiyelleri düşüktür.

Steinernematidler ve heterorhabditler doğada zorunlu patojendirler ve dünyanın her yerinde topraktan izole edilmişlerdir ve yayılımları tamamen birincil konukçularının topraktaki varlığına bağlıdır [13]. Çizelge 5'de ticari olarak formülize edilmiş EPN'ler ve ana konukçuları görülmektedir.

Üzerlerinde çok fazla araştırma yapılmış bazı EPN türlerinin, laboratuvar koşullarında enfekte edebildikleri böceklerin çok çeşitli olduğu görülürken, EPN'ler ile enfekteli böceklerin sulanmış tarlaya salındıklarında ve birçok türün doğal konukçu çeşitliliği nematodların

Çizelge 4. Steinernematid ve Heterorhabdit nematodların beklenen raf ömürleri [12]

Formülasyon	Nematod türü	İrk	Raf Ömrü (Ay)	
			22-25°C	2-10°C
Aktif hareket eden nematodlar				
Sünger ^a	<i>S. carpocapse</i>	All	0.03-0.1	2.0-3.0
	<i>H. bacteriophora</i>	HP88	0	1.0-2.0
	<i>S. carpocapse</i>	All	0.1-0.2	5.0-6.0
Vermikülit ^a	<i>S. feltiae</i>	UK	0.03-0.01	4.0-5.0
	<i>H. megidis</i>	UK	0	2.0-3.0
Ağır hareketli nematodlar				
Aljinat jeller	<i>S. carpocapse</i>	All	3.0-4.0	6.0-9.0
	<i>S. feltiae</i>	SN	0.5-1.0	4.0-5.0
	<i>S. carpocapse</i>	All	1.0-1.5	3.0-5.0
Akışkan jeller	<i>S. glaseri</i>	NJ43	0.03-0.06	1.0-1.5
	<i>S. scapterisci</i>	Colon	1.0-1.05	3.0-4.0
Likit konsantre ^a	<i>S. carpocapse</i>	All	0.16-0.2	0.4-0.5
	<i>S. riobrave</i>	RGV	0.1-0.13	0.23-0.3
Anhidrobiyotik nematodlar				
Islanabilir toz	<i>S. carpocapse</i>	All	2.0-3.5	6.0-8.0
	<i>S. feltiae</i>	UK	2.5-3.0	5.0-6.0
	<i>H. megidis</i>	UK	2.0-3.0	4.0-5.0
	<i>H. zealandica</i>	X1	1.0-2.0	3.0-4.0
Suda çözünabilir granüller ^a	<i>S. carpocapse</i>	All	4.0-5.0	9.0-12.0
	<i>S. feltiae</i>	SN	1.5-2.0	5.0-7.0
	<i>S. riobrave</i>	RGV	2.0-3.0	4.0-5.0

^aTicari olarak erişilebilir formülasyonlar

Çizelge 5. Başlıca hedef konukçular ve EPN'lerin ticari formülasyonları (*Steinernema* spp. ve *Heterorhabditis* spp.) [11]

Bilimsel Adı	Hayat Dönemi ^a	Nematod Türü	Formülasyon ^b
<i>Sphenophorus parvulus</i>	L, E	<i>S. carpocapse</i>	WP, WG
		<i>H. bacteriophora</i>	Sünger
<i>Otiorynchus sulcatus</i>	L	<i>H. bacteriophora</i>	Sünger
		<i>H. marelata</i>	Sünger
		<i>H. megidis</i>	WP
<i>Agrotis ipsilon</i>	L, P	<i>S. carpocapse</i>	WP, WG
<i>Parapediasia teterrella</i>	L	<i>S. carpocapse</i>	WP, WG
		<i>H. bacteriophora</i>	Sünger
<i>Ctenocephalides felis felis</i>	L, P	<i>S. carpocapse</i>	WP, WG
<i>Diaprepes abbreviatus</i>	L	<i>H. bacteriophora</i>	Sünger
		<i>S. riobrave</i>	WG, LC
<i>Chrysoteuchia topiaria</i>	L	<i>S. carpocapse</i>	WP, WG
		<i>H. bacteriophora</i>	Sünger
		<i>H. marelata</i>	Sünger
<i>Rhabopterus picipes</i>	L	<i>H. bacteriophora</i>	Sünger
<i>Spodoptera frugiperda</i>	L	<i>S. carpocapse</i>	WP, WG
<i>Bradysia spp.</i>	L	<i>S. feltiae</i>	Vermikülit
<i>Popillia japonica</i>	L	<i>H. bacteriophora</i>	Sünger
		<i>H. zealandica</i>	WP
<i>Fumibotrys fumalis</i>	L	<i>S. carpocapse</i>	WP, WG
<i>Longitarsus waterhousei</i>	L, E	<i>H. bacteriophora</i>	Sünger
		<i>S. carpocapse</i>	WG, WP
<i>Cyclocephala borealis</i>	L	<i>H. bacteriophora</i>	Sünger
		<i>H. zealandica</i>	WP
<i>Lycoriella app.</i>	L	<i>S. feltiae</i>	Vermikülit
<i>Otiorynchus ovatus</i>	L	<i>H. bacteriophora</i>	Sünger
<i>Scapteriscus vicinus</i>	N, E	<i>S. scapterisci</i>	WP
		<i>S. riobrave</i>	WG

^aE: Ergin, L: Larva, n: Nimf, P: Pupa

^bLC: Likit konsantre, WG: Suda çözünabilir granül, WP: Islanabilir toz

ekolojilerinin yanı sıra, ekolojik faktörlerin de doğal konukçuları belirlemesinden ötürü ne yazık ki laboratuvarındaki daha kısıtlıdır [28]. Sulama ile birlikte yapılan EPN uygulamalarının hedef olmayan organizmalar üzerindeki etkisi çok önemsizdir ve bu yüzden güvenilir biyokontrol ajanları içerisinde değerlendirilmektedirler [18]. Bazı bilinen türler ise dar bir konukçu yelpazesine sahiptirler. Mesela *S. scapterisci* danaburunlarına, *S. kushdai* ve *S. scarabei* ise scarabeid larvalarına adapte olmuşlardır [19].

Nematodların konukçu aralığını kısıtlayan etkenlerden birisi de IJ tarafından sergilenen besin arama davranışlarının farklılığıdır. Bundan ötürü *S. carpocapse* ve *S. scapterisci* gibi bazı türler, hareketli olan konukçularını etkili bir şekilde enfekte etmelerini kolaylaştıran toprak yüzeyine yakın yerlerde kaldıkları otur-bekle stratejisi olarak tanımlanmaktadır [20,21]. *S. glaseri* ve *H. bacteriophora* türleri, hareketsiz veya daha az hareketli konukçu türlerine iyi adapte olmuş ve tüm toprak profillerine yayılabilen besin arayıcılarıdır. *S. riobrave* ve *S. feltiae* gibi bazı türler ise bazı yerlerde bu iki ekstrem duruma da adapte olmayı başarmış entomopatojen nematodlardır [20].

Daha önce de belirtildiği gibi entomopatojen nematodların biyolojik mücadele uygulamalarındaki başarılarını etkileyen çok sayıda faktör bulunmaktadır. Başarısızlıkların birçoğunun altında yatan ana neden olarak nematod ekolojisinin iyi anlaşılabilmesi verilebilir. Etkili bir biyolojik mücadele için, hem nematodun hem de konukçusunun biyoloji ve ekolojilerinin çok iyi anlaşılabilmesinin önemi de çok büyüktür. Nematod türlerinin besin arama davranışları ve sıcaklık gereksinimleri de, en az konukçunun ulaşılabilirliği ve nematod türüne uygunluğu kadar dikkate alınması gereken faktörlerdendir [18].

EPN'ler zararlı böceklerle karşı, toprak ve kriptik habitatlarda, hayvan gübresi içerisinde, sucul habitatlarda ve yapraklarda uygulanmaktadır. Bu uygulamalar içerisinde en yaygın olanı ise, toprak uygulamalarıdır [16]. Toprak, yapısı itibarıyla uygulanan parazitoid ve predatörlerin penetrasyonlarını engelleyen bir bariyer özelliği göstermektedir. Toprak entomopatojen nematodların doğal yaşam ortamı olmasından ötürü toprağın entomopatojen nematodlar için böyle bir engelleyici özelliği bulunmamaktadır [15]. Bazı kriptik habitatlarda ise, EPNler ile en etkin ve tutarlı sonuçlar elde edilmiştir. Bu habitatlar da tıpkı toprak gibi, ekstrem çevresel koşullara karşı dengeleyici özelliğe sahiptirler. Aynı zamanda kriptik habitatlar, topraktan daha az kısıtlayıcı faktöre sahiptirler ve çok kolay bir şekilde nematodun lehine olacak şekilde değişebilmektedirler. Hayvan gübresi, IJ'ler için tampon etkisi olan diğer bir habitatır, fakat hayvan besleme tesislerindeki yüksek sıcaklıklar ve gübre içeriklerinin toksik etkileri IJ'lerin hayatta kalma başarılarını sınırlandırmaktadır. Sucul habitatlar, IJ'lerin hayatta kalmaları için mükemmel koşullar sunmakla birlikte, nematodlar bu çevre tarafından yönetilen bir hareketliliğe adapte olamamaktadırlar. En son olarak, yaprak yüzeyine EPN uygulaması ve buna benzer habitatlar IJ'ler için oldukça elverişsiz habitatlardır [18].

Bazı zararlı böcekler, IJ'lerin normal girişlerini yapabilecekleri noktaları kolay ulaşılabilir olmadığı için, nematodlar tarafından enfekte edilememektedir [4]. Birçok böcek türünde segmentler arası membranlar, ön ve art bağırsak kutikular astarları veya peritrofik matriks, bu bölgelerden giriş için çok kalın veya yoğun olabilmektedir. Sosyal böcekler, belki bireysel olarak nematod enfeksiyonuna hassas olabilirler fakat patojenlere davranışsal tepkileri koloniyi kaydedeğer etkilerden önemli ölçüde korumaktadır [17]. EPN'ler böceklerin vücut boşluklarından içeriye girdikleri zaman, böceklerin savunma davranışları da hem böceğin hem de nematodun türün göre

farklılaşmaktadır [36]. Bir zararlı böcek türünün herhangi bir yaşam dönemine, bir nematod türü uygulaması yapılacağı zaman, yukarıda bahsedilmiş olan bütün faktörlerin dikkate alınması gerekmektedir.

SONUÇ

Bakteri-nematod komplekslerinin virülenslerinin doğası ile ilgili birçok soru henüz cevaplanmayı beklemektedir. Aynı şekilde kaç tane toksinin belirli bir ırk tarafından üretildiği, mide ve hemosölde farklı toksinlerin var olup olmadığı, farklı ırkların toksinlerinin çeşitliliği veya konukçuya özelleşme durumları da henüz tam olarak açıklanabilmiş değildir.

Entomopatojen nematodlar, çok çeşitli çevresel koşullar altında zararlı böcek popülasyonlarının kontrol altına alınabilmesinde kilit bir role sahiptirler. Bu önemli görevlerini ise vücutlarında taşıdıkları simbiyotik bakterileri kullanarak gerçekleştirebilmektedirler. Bu nedenle, entomopatojen nematodların biyolojik mücadele çalışmalarında daha etkin bir şekilde kullanılabilmesi için hem nematodların fizyolojilerinin hem de simbiyotik bakterileri ile olan ilişkilerinin çok iyi anlaşılabilmesi gerekmektedir. Bu ilişkilerin daha iyi ifade edilmesi ile birlikte mücadeledeki kullanımları daha da güçlenecektir.

Bununla birlikte, entomopatojen nematodlar Kuzey Amerika, Avrupa, Asya ve Avustralya'da ticari olarak satılmaktadır. Diğer birçok ülkede ise çeşitli tarımsal zararlıların biyolojik kontrolünde kullanılmaya devam etmektedir. Bu nematodların Türkiye'de de özellikle toprak zararlılarına karşı kullanım olanakları çok güçlüdür. Fakat Türkiye'de bu konuda çalışan araştırmacıların karşılaşacağı çeşitli zorluklar vardır. Bunlar genel olarak, yeni nematod türlerinin izole edilmesi, yerli entomopatojen nematod türlerinin ve bunların simbiyotik bakterilerinin karakterize edilmesi ve konukçu böceklerin araştırılması, hedef zararlılar için en iyi uygulama yöntemlerinin belirlenmesi, ticari üretim için en uygun olan nematod-bakteri, kompleksinin belirlenmesi, üreticiler için en ekonomik olacak nematod üretiminin yapılması olarak sıralanabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Boemare, N.E., R.J. Akhurst & R.G. Mourant, 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.
- [2] Ciche T.A., D. Creg, E. Ralf-Udo, S. Forst & H. Goodrich-Blair, 2006. Dangerous liasions: The symbiosis of entomopathogenic nematodes and bacteria. *Biological Control*, 38: 22-46.
- [3] Ciche, T.A. & J.C. Ensign, 2003. For the insect pathogen, *Photorhabdus luminescences*, which end of a nematode is out? *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 1890-1897.
- [4] Eidith, D.C. & G.S. Thusrtun, 1995. Physical deterrents to infection by entomopathogenic nematodes in wireworms (Coleoptera: Elateridae) and other soil insects. *The Canadian Entomologist*, 127, 423-429.
- [5] El-Borai, F.E., J.D. Zellers & L.W. Duncan, 2007. Suppression of *Diaprepes abbreviatus* in potted citrus by combinations of entomopathogenic nematodes with different lifespans. *Nematopica*, 37: 33-41.
- [6] Forst, S. & D. Clarke, 2002. Bacteria-Nematode Symbiosis. In: Gaugler, 2002. *Entomopathogenic nematology*. CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK. 59-60 pp.

- [7] Forst, S., B. Dowds, N. Boemare & E. Stackebrandt, 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabd*
- Goodrich-Blair, H., & D.J. Clarke, 2007. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. *Mol. Microbiol.*, 64: 260–268.
- [9] Götz, P., A. Boman, & H.G. Boman, 1981. Interactions between insect immunity and an insect pathogenic nematode with symbiotic bacteria. *Proceedings of the Royal Society*, B 212, 333-350.
- [10] Grewal, P.S. & R. Georgis, 1998. Entomopathogenic Nematodes. In “*Methods in Biotechnology, Vol 5: Biopesticides: Use and Delivery*”. F.R. Hall & J. Menn, eds. Humana Press: 271-299, Totowa, N.J.
- [11] Grewal, P.S., 2002. Formulation and Application Technology In: “*Entomopathogenic nematology*”. Gaugler, R. Ed., CAB International Publishing, 266-279, Wallingford, Oxon, UK.
- [12] Grewal, P.S., & A. Peters, 2005. Formulation and Quality. In “*Nematodes as biocontrol agents.*” Grewal, P.S., R.U. Ehlers & D. Shapiro-Ilan eds. CABI Publishing, 81, Wallingford, UK.
- [13] Hominick, W.R., 2002. Biogeography. In “*Entomopathogenic Nematology*”, Gaugler, R., ed., CABI Publishing, 115-144, Wallingford, UK.
- [14] Jarozs, J., M. Stefaniak & P. Jablonski, 1996. Virulence factors in entomogenous rhabditid nematodes: protective immunity against *Xenorhabdus nematophilus* and antibacterial activity in immunologically responsible host, *Galleria mellonella*. *Bull. Intern. Org. Biol. Integr. Control Noxious Anim. Plant*, 19: 118-123.
- [15] Kaya, H.K. & R. Gaugler, 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology*, 38, 181-206.
- [16] Klein, M.G., 1990 Efficacy against soil-inhabiting insect pests. In “*Entomopathogenic nematodes in biological control.*” Gaugler R. & H. K. Kaya, eds, CRC Press, 195–214, Boca Raton.
- [17] Klein, M.G., 1993. Biological control of scarabs with entomopathogenic nematodes. In “*Nematodes and the Biological Control of Insects.*” Bedding, R., R. Akhurst & H. Kaya, eds., 49-57, CSIRO, East Melbourne, Australia.
- [18] Koppenhöfer, A.M., 2007. *Nematodes*. In “*Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests*” Lawrence A.L. & H.K. Kaya, eds., Springer, 249, P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands.
- [19] Koppenhöfer, A.M. & E.M. Fuzy 2003. Ecological characterization of *Steinernema* scarabei: a natural pathogen of scarab larvae, *Journal of Invertebrate Pathology*, 83, 139-148.
- [20] Lewis, E.E., 2002. Behavioural Ecology. In: “*Entomopathogenic nematology*”. Gaugler R., ed., CAB International Publishing, 206, Wallingford, Oxon, UK.
- [21] Lewis, E.E., J. Campbell, C. Griffin, H. Kaya & A. Peters, 2006. Behavioral ecology of EPNs. *Biological Control*, 38, 66-79.
- [22] Liu, J., G.O. Poinar & R.E. Berry, 2000. Control of insect pest with entomopathogenic nematodes: The impact of molecular biology and phylogenetic reconstruction. *Annu. Rev. Entomol.*, 45: 287-306.
- [23] Long, S.J., P.N. Richardson, D.M. Willmott & G.J. Keane, 2000. Use of a monoclonal antibody in a field evaluation of the persistence and infectivity of *Steinernema* n. Sp. D1 (Nematoda: Steinernematidae). *Nematology*, 4, 425-434.
- [24] Maneesakorn, P., R. An, D. Hannah, T.Kara, X. Bai, B.J. Adams, P.S. Grewal & A. Chandrapatya, 2011. Phylogenetic and cophylogenetic relationship of entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis*: Rhabditida) and their symbiotic bacteria (*Photorhabdus*: Enterobacteriaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59: 271-280.
- [25] Martens, E.C., K. Heungens & H. Goodrich-Blair, 2003. Early colonization events in the mutualistic association between *Steinernema carpocapse* nematodes and *Xenorhabdus nematophila* bacteria. *J. Bacteriol.*, 185:3147-3154.
- [26] Martens, E.C., E.I. Vivas, K. Heungens, C.E. Cowles & H. Goodrich-Blair, 2004. Investigating mutualism between entomopathogenic bacteria and nematodes. Nematology monographs and perspectives (2). *Proc. Fourth Intl. Cong. Nematol.*, 2: 447-462.
- [27] Oestergaard, J., C. Belau, O. Strauch, A. Ester, K. Van-Rozen & R.U. Ehlers, 2006. Biological control of *Tipula paludosa* (Diptera: Nematocera) using entomopathogenic nematodes (*Steinernema* spp.) and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biological Control*, 39: 525-531.
- [28] Peters, A., 1996. The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations, *Biocontrol Sci. Technol*, 6, 389-402.
- [29] Poinar Jr. G.O., 1976. Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid. *Heterorhabditis bacteriophoran*. gen., n. sp. (Heterorhabditidae, n. fam.) (Rhabditida Oerley). *Nematologica*, 21: 463–470.
- [30] Poinar Jr., G.O. & G.M. Thomas, 1966. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteriaceae: Eubacteriales) in the development of the nematode DD-136. (*Neoplactana* sp. Steinernematidae). *Parasitology*, 56: 385-390.
- [31] Poinar Jr., G.O. & G.M. Thomas, R. Hess, 1977. Characteristics of the specific bacterium associated with *Heterorhabditis bacteriophora* (Heterorhabditidae: Rhabditida) *Nematologica*, 23: 97-102.
- [32] Poinar Jr., G.O. & R. Leutenegger, 1968. Anatomy of the infective and normal third stage juveniles of *Neoplectana carpocapsae* Weiser. *Journal of Parasitology*, 54: 340–350.
- [33] Poinar G.O. & P.S. Grewal, 2012. History of entomopathogenic nematology. *Journal of Nematology*, 44: 153–161.
- [34] Stock, S.P. & H.G. Blair, 2008. Entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts: The inside out of a mutualistic association. *Symbiosis*, 46: 65-75.
- [35] Thomas, G.M. & G.O. Poinar Jr., 1979. *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 29: 352–360.
- [36] Wang, J., J.F. Campbell, R. Gaugler, 1995. Infection of entomopathogenic nematodes *Steinernema glaseri* and *Heterorhabditis bacteriophora* against *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 66, 178-184.
- [37] Yokoo, S. & S. Tojo, N. Ishibashi, 1997. Suppression of prophenoloxidase cascade in the larval haemolymph of the turnip moth, *Agrotis segetum*, by and entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapse* and its symbiotic bacterium. *J. Insect Physiol*, 38: 915-924.