

Orijinal ara tırma (Original article)**Entomopatojen nematodların (Rhabditida: Heterorhabditidae ve Steinernematidae) depolanmı ürün zararlısı, *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae)'ye etkinli i^{1,2}**

The efficacy of entomopathogenic nematodes against *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae), a stored product pest

Ramazan CANH LAL^{3*} Fatmanur BORAZAN³ Sevim DO AN³
Yunus Emre ÖZDEM R³ Gizem E G N³

Summary

Biological efficacy of nine endemic entomopathogenic nematodes of *Heterorhabditis* and *Steinernema* obtained in a survey conducted in Adana and Kahramanmara has been compared on *Sitophilus oryzae* adults under laboratory conditions. Each dose of 200, 400 and 1000 infective juveniles (IJs)/adult was repeated four times in Petri dishes. Petri dishes containing ten *S. oryzae* adults and IJs were placed in an incubator at 25°C and 75% relative humidity, and dead adults were recorded at the end of 4, 6 and 8th days. In the 200 IJ/adult dose, the highest mortality for *H. bacteriophora* PBS-1-H strain (%79.35) and the lowest mortality for *H. bacteriophora* INC-3-H strain (%34.03); in 400 IJ/adult dose, the highest mortality for *S. carpocapsae* 076-S (%87.52) and the lowest mortality for *H. bacteriophora* INC-3-H (%41.81); in 1000 IJ/adult dose, the highest mortality for *S. carpocapsae* 076-S (%89.50) and the lowest mortality for *S. feltiae* OZV-5-S (%38.89) were calculated at the last day count. The lowest LC₅₀ value was calculated for *S. carpocapsae* 076-S with 57.96 IJs/adult followed by YHS-3-H with 73.03 IJs/adult. The highest LC₅₀ value was 922.95 IJs/adult for *S. feltiae* OZV-5-S. *S. carpocapsae* 076-S, *H. bacteriophora* YHS-3-H and PBS-1-H isolates are needed to test under similar conditions.

Key words: Biological control, entomopathogenic nematodes, *Sitophilus oryzae*, *Heterorhabditis*, *Steinernema*

Özet

Adana ve Kahramanmara 'da yapılan sörveyden elde edilen dokuz endemik nematodun biyolojik etkinli i, *Sitophilus oryzae* erginleri üzerinde laboratuvar artlarında kar ıla tırılmı tır. Üç nematod dozu (200, 400 ve 1000 enfektif juvenil (J)/ergin), petri kabı deneme ortamında *S. oryzae* erginleri üzerinde 4 kere tekrar edilmi tır. *S. oryzae* erginlerini ve J ihtiva eden petri kapları, 25°C ve %75 rutubet içeren iklim kabinlerine konulmu ve ergin ölümleri, 4, 6 ve 8. gün sonunda kaydedilmi tır. 200 J/ergin dozunda en yüksek ölüm oranı *H. bacteriophora* PBS-1-H (%79.35), en dü ük ölüm oranı *H. bacteriophora* NC-3-H izolatında (%34.03); 400 J/ergin dozunda en yüksek ölüm oranı *S. carpocapsae* 076-S (%87.52), en dü ük ölüm oranı ise *H. bacteriophora* NC-3-H izolatında (%41.81); 1000 J/ergin dozunda en yüksek ölüm oranı *S. carpocapsae* 076-S (%89.50), en dü ük ölüm oranı *S. feltiae* OZV-5-S izolatında (%38.89) belirlenmi tır. En dü ük LC₅₀ de eri, 57.96 IJ/ergin ile *S. carpocapsae* 076-S, en yüksek LC₅₀ de eri ise, 922.95 IJ/ergin ile *S. feltiae* OZV-5-S için hesaplanmı tır. *S. carpocapsae* 076-S, *H. bacteriophora* YHS-3-H ve PBS-1-H izolatlarının 1000 J/ergin dozu ve daha yüksek dozlarının, depolama artlarına benzer ortamlarda denenmesi gereklidir.

Anahtar sözcükler: Biyolojik mücadele, entomopatojen nematodlar, *Sitophilus oryzae*, *Heterorhabditis*, *Steinernema*

¹ Bu çalı ma, 11-14 Eylül 2013 tarihinde Artvin'de düzenlenen 4. Uluslararası Katılımlı Entomopatojenler ve Mikrobiyal Mücadele Sempozyumu'nda poster olarak sunulmu ve özet olarak basılmı tır

² Bu çalı ma, 11O786 Nolu TUB TAK projesi kapsamında, izole edilen entomopatojen nematodların etkinliklerinin kıyaslanması amacıyla yürütölmü tür

³ Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Kayseri

*Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: ramazancanhilal@erciyes.edu.tr

Alını (Received): 15.09.2015

Kabul edili (Accepted): 09.10.2015

Giri

Depolanma ürünlere mikroorganizmalar, kemirgenler ve özellikle böcekler zarar vermektedirler. Bu zararlılar, gıda maddelerini kemirir, kırar ve yiyerek zarar verirler. Bundan dolayı ürün, ticari değeri ve tohumluk vasfını kaybedebilmektedir (Anonymous, 2013a). Yapılan araştırmalar, zararlılardan dolayı tahıllarda dünyada yılda ortalama %10 kayıp meydana geldiğini saptamıştır. Depolanan ürünlerdeki kabul edilen %10 oranındaki bu kaybın yarısının (%5), böceklerden meydana geldiği bildirilmektedir (Dizlek et al., 2008).

Depolanma ürün zararlılarıyla mücadele kapsamında, dünyada ve ülkemizde en sık kullanılan yöntemlerin başında, kimyasal bir yöntem olan fumigasyon gelmektedir. Zararlılara karşı insektisitlerin yaygın olarak kullanılması, canlılar arasında var olan doğal dengenin bozulmasına, zamanla zararlı organizmaların dayanıklılık kazanmasına, ürünlerde kalıntılara neden olmaktadır. Böylece uzun vadede çözümü zor ve pahalı yeni sorunlar ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda kimyasal mücadeleye alternatif olabilecek yeni yöntemler üzerinde durulmakta ve biyolojik mücadele, bu yöntemler içerisinde önemli bir yer tutmaktadır. Entomopatojen nematodlar (EPN), geniş konukçu yelpazesine sahip olmaları, tabii bakterilerle konukçularını 24-48 saat içinde öldürebilmeleri, yapay ortamda üretilibilmeleri, konukçularını aktif olarak arayıp bulabilmeleri, konukçularının bulunmaması halinde uzun süre canlı olarak kalabilmeleri, çevreye ve insana zarar vermemeleri, kimyasal insektisitler gibi preparatlar halinde klasik pülverizatörlerle kullanılabilmesi nedeniyle, biyolojik mücadele içerisinde önemli bir yere sahiptir (Anonymous, 2013b; Canhilal et al., 2015).

Ayrıca, geliştirilecek olan biyoteknik yöntemlerle beraber EPN'ların depolanma ürün zararlılarına karşı da kullanılma imkanları vardır (Laznik & Trdan, 2010; Ramos-Rodriguez et al., 2006, 2007). Bu proje kapsamında, sonraki çalışmalarına temel oluşturulması amacıyla, 1110786 Nolu TÜB TAK projesi çalışmalarından elde edilen endemik steinernematid ve heterorhabditid izolatların (Canhilal et al., 2014), depolanma ürünlerin önemli bir zararlısı olan *Sitophilus oryzae* (L.)'ye karşı etkinliği laboratuvar şartlarında çalışılmıştır. Bu çalışma mayla, yeni izolatların zararlı üzerinde etkinliğinin belirlenmesi yanında, birbirleriyle kıyaslanması da gerçekleştirilmiştir. Böylece, yapılacak diğer çalışmalarla beraber, etkinliği yüksek bulunan endemik izolatların ruhsatlandırılmasına alt yapı oluşturulmuştur.

Yöntem

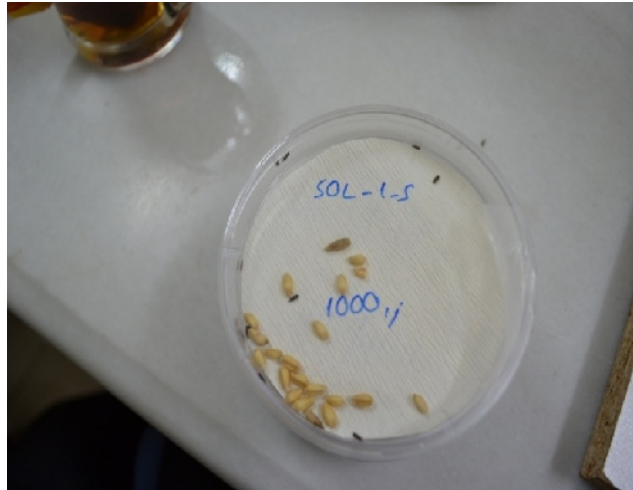
Çalışmada kullanılan entomopatojen nematodlar (*Heterorhabditis bacteriophora* YHS-3-H, *H. bacteriophora* KMP-2-H, *H. bacteriophora* PBS-1-H, *H. bacteriophora* FLH-3-H, *H. bacteriophora* NC-3-H, *H. Steinernema feltiae* KCS-4-S, *S. feltiae* OZV-5-S, *S. carpocapsae* 076-S ve *S. bicornutum* MGZ-4-S), daha önce yürütülen 110786 Nolu TÜB TAK projesi kapsamında Adana ve Kahramanmaraş illerinden (Canhilal et al., 2014), *S. oryzae* ise, Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'ne ait stok kültürlerinden elde edilmiştir.

Sitophilus oryzae erginleri, 1/3 oranında buğday doldurulan, ağzları paket lastiği yardımıyla tülle kapatılmış 1 litrelik cam kavanozlarda, 25 °C sıcaklıkta karanlık iklim odasında üretilmiştir. Nematodlar, kepek, soya unu, mısır unu, süt tozu, bal, gliserin ve toz mayadan oluşan bir yetiştirme ortamında, 1 litrelik cam kavanozlarda, 30±2°C'de yetiştirilen *Galleria mellonella* (L.) larvalarında Woodring & Kaya (1988)'nin metoduna göre kültüre alınmıştır. EPN'lar tarafından enfekte edilmiş *Galleria* larvaları, uyarılmadan önce bir White Tuzağına (ekil 1) (Canhilal & Carner, 2006) yerleştirilerek, buradan hasat edilen larvalar, deneme öncesi kültür flasklarında 7-8 °C'deki buzdolabında 15-20 gün depolanmıştır (Kung et al., 1990).

Yirmi gün önce *S. oryzae* erginleri, içinde kurutma kabı bulunan 90 mm'lik Petri kaplarına 10' adet konulmuştur. İnkübasyon süresince beslenmeleri için her Petri kabına 20 adet buğday tanesi ilave edilmiştir (ekil 2).



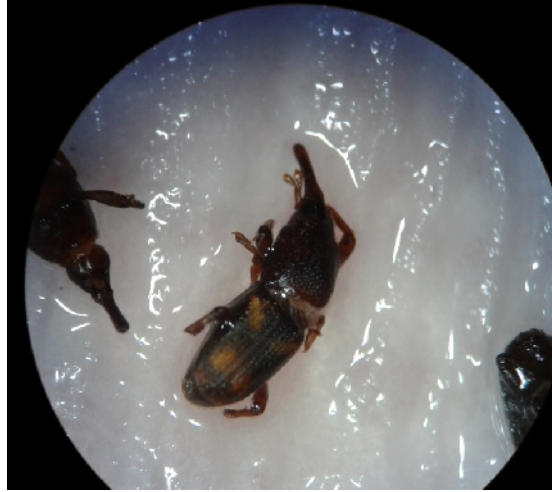
ekil 1. White Tuza 'ında EPN'un hastalandırıcı *Galleria mellonella* larvaları



ekil 2. Petri kabı deneme ortamı

Biyolojik mücadele ajanı, EPN'lar, 200, 400 ve 1000 IJ/ml dozlarında (Shahina & Salma, 2010) sayım slaytında sayılarak, her Petriye inoküle edilmiştir. Nem kaybını ve böceklerin kaçmasını önlemek için Petri kaplarının kenarları parafilm ile kapatılmıştır. Kontrolde ise sadece saf su kullanılmıştır. Denemeler, 4 tekerrürlü olarak, $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'deki inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Sayımlar 4, 6 ve 8. günde yapılarak (Ramos-Rodríguez et al., 2006) sayım sonuçlarının ortalaması alınıp yüzde (%) ölüm oranları hesaplanmıştır. *S. oryzae* ergin ölümlerinin nematodtan kaynaklandığını kanıtlamak için ölü erginler 'White Tuza 'ına alınmıştır (ekil 3) ve 7 gün sonra nematod çıkışı gözlemlenmiştir.

Hesaplanan ölüm oranları, Abbott'un (1925) formülü kullanılarak yeniden düzenlenmiştir. Verilere varyans analizi uygulanmıştır ve ortalamalar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Duncan testi kullanılmıştır. Letal konsantrasyon (LC_{50}) de erleri probit analizi ile hesaplanmıştır (SPSS, 2003).



ekil 3. White Tuza'na alınan *S. oryzae* erginleri

Ara tırma Sonuçları ve Tartı ma

Çalı ma sonucunda tüm EPN tür ve ırklarının, *S. oryzae* erginlerini hastalandırarak öldürdü ü ve üzerinde ço aldıkları görülmü tür. Kontroldeki ölüm oranı 8. gün sayımı sonunda %17.5 olmu tur. Genellikle doz artı na paralel olarak ve sayım günleri ilerledikçe ölüm oranları artmı tır. 4. günde; 200 J/ergin ve 400 J/ergin dozlarında en yüksek ölüm oranı 076-S izolatında (%69.03-80.42) ve en dü ük ölüm oranı ise NC-3-H izolatında (%30.56-33.47), 1000 J/ergin dozunda en yüksek ölüm oranı 076-S (%87.22) ve en dü ük ölüm oranı ise PBS-1-H izolatında (%37.22) gerçekte mi tir. 6. gün sayımlarında; 200 J/ergin ve 400 J/ergin dozlarında en yüksek ölüm oranını 076-S izolatı (%71.53-83.06) ve en dü ük ölüm oranını ise NC-3-H izolatı (%34.03-41.81), 1000 J/ergin dozunda en yüksek ölüm oranını 076-S (%88.48) ve en dü ük ölüm oranını ise OZV-5-S izolatı (%38.89) olu turmu tur. Son sayımlarda ise; 200 J/ergin dozunda en yüksek ölüm oranı PBS-1-H izolatında (%79.35) en dü ük ölüm oranı NC-3-H izolatında (%34.03), 400 J/ergin dozunda en yüksek ölüm oranı 076-S izolatında (%87.52) en dü ük ölüm oranı ise NC-3-H izolatında (%41.81), 1000 J/ergin dozunda en yüksek ölüm oranı 076-S (%89.5) en dü ük ölüm oranı OZV-5-S izolatında (%38.89) hesaplanmı tır (Çizelge 1).

Sekizinci gün sayım sonuçlarına uygulanan istatistikî analiz sonucunda; 200 J/ergin dozunda NC-3-H ve OZV-5-S kontrolden farklı bulunmazken, en yüksek etkiyi gösteren PBS-1-H, YHS-3-H, KMP-2-H ve 076-S ile aynı grupta yer almı tır. 400 J/ergin dozunda, en yüksek ölüm oranını olu turan 076-S, istatistikî olarak FLH-3-H ve YHS-3-H ile benzerlik göstermi tir. 100 J/ergin dozunda da en yüksek etkiyi 076-S vermi tir (Çizelge 1).

LC₅₀ de eri EPN'nin etkinli ini göstermedeki en önemli parametrelerden biridir. Çalı mamızda, en dü ük LC₅₀ de eri, 57.96 IJ/ergin ile *S. carpocapsae* 076-S izolatı için hesaplanmı olup, bunu 73.03 J/ergin ile *H. bacteriophora* YHS-3-H takip etmi tir. En yüksek LC₅₀ de eri ise, 922.95 J/ergin ile *S. feltiae* OZV-5-S ırkı için hesaplanmı tır (Çizelge 2).

Çizelge 1. EPN'ların 200, 400 ve 1000 J/ergin dozunda, 4, 6 ve 8. günde *Sitophilus oryzae* erginleri üzerinde olu turdu u ölüm oranı

Nematod*	4. GÜN			6. GÜN			8. GÜN**		
	200 J	400 J	1000 J	200 J	400 J	1000 J	200 J	400 J	1000 J
H.b.YHS-3-H	34.31	47.92	50.28	60.97	69.72	62.36	75.38c	76.76cd	62.36bc
H.b.KMP-2-H	41.67	47.64	65.28	52.22	65.56	68.06	71.41c	71.33c	81.31c
H.b.PBS-1-H	34.03	49.31	37.22	65.28	56.11	43.75	79.35c	62.58bc	54.23bc
H.b.FLH-3-H	48.34	66.11	62.36	57.37	72.78	67.36	57.36bc	72.24cd	62.84bc
H.b. NC-3-H	30.56	33.47	46.67	34.03	41.81	46.95	34.03ab	41.81ab	60.74bc
S.f.KCS-4-S	39.72	48.20	55.14	45.14	53.47	57.92	63.47bc	56.63bc	67.24bcd
S.f.OZV-5-S	36.81	43.19	38.75	36.81	43.47	38.89	36.81a	43.47a	38.89a
S.c.076-S	69.03	80.42	87.22	71.53	83.06	88.48	71.53c	87.52d	89.50d
S.b.MGZ-4-S	42.50	54.03	78.20	50.28	55.56	83.20	50.31b	57.54b	84.68c
KONTROL	3.75	3.75	3.75	10.00	10.00	10.00	17.50a	17.50a	17.50a

*H.b.YHS-3-H: *Heterorhabditis bacteriophora* YHS-3-H izolatu, H.b.KMP-2-H: *H. bacteriophora* KMP-2-H izolatu, H.b.PBS-1-H: *H. bacteriophora* PBS-1-H izolatu, H.b. FLH-3-H: *H. bacteriophora* FLH-3-H izolatu, H.b. NC-3-H: *H. bacteriophora* NC-3-H izolatu, S.f.KCS-4-S: *Steinernema feltiae* KCS-4-S izolatu, S.f.OZV-5-S: *S. feltiae* OZV-5-S izolatu, S.c.076-S: *S. carpocapsae* 076-S izolatu, S.b.MGZ-4-S: *S.bicornutum* MGZ-4-S izolatu.

**Aynı sütün içerisinde aynı harfi alan ortalamalar, istatistikî olarak farklı de ildir.

Çizelge 2. Entomopatojen nematod ve izolatlarının *Sitophilus oryzae* erginleri üzerindeki LC₅₀ değerleri

Nematod	izolat	Ergin sayısı	LC ₅₀ *	χ ²	P
<i>H.bacteriophora</i>	YHS-3-H	80	73.03	64.25	0.000
<i>H. bacteriophora</i>	KMP-2-H	80	191.92	35.56	0.000
<i>H. bacteriophora</i>	PBS-1-H	80	102.92	63.55	0.000
<i>H. bacteriophora</i>	FLH-3-H	80	204.30	41.55	0.000
<i>H. bacteriophora</i>	NC-3-H	80	457.55	22.24	0.000
<i>S. feltiae</i>	KCS-4-S	80	281.83	31.29	0.000
<i>S. feltiae</i>	OZV-5-S	80	922.95	20.42	0.000
<i>S. carpocapsae</i>	076-S	80	57.96	47.81	0.000
<i>S. bicornutum</i>	MGZ-4-S	80	266.42	14.76	0.001

*LC₅₀ değerleri 3 farklı konsantrasyon uygulanarak hesaplanmıştır ve larva başına düşen nematod sayısı olarak ifade edilmiştir.

Laznik & Trdan (2010)'ın *S. feltiae* B30 izolatları için *S. oryzae* erginleri üzerinde 25°C'de 1000 J/ergin dozunda hesapladığı %20.45 ölüm oranı, bizim *S. feltiae* izolatlarımız için hesapladığımız %56.63 ve %43.47'lik ölüm oranlarımızla farklılık gösterirken; B49 ve 3162 izolatları için buldukları %48.88 ve %40.90 değerleri bizim sonuçlarımızla benzerlik göstermiştir. Burada dikkati çeken diğer bir husus, aynı nematod türünün farklı izolatlarının çok farklı etki gösterebilmesidir. Laznik & Trdan (2010)'ın *S. feltiae*'nin farklı izolatlarında elde ettiği farklı ölüm oranları (%48.88-20.45) bizim çalışmamızda *H. bacteriophora* izolatları için (%81.31-54.22) gerçekleştirmiştir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre; elde edilen veriler ümit vericidir. Ölüm oranı yüksek ve LC₅₀ değerleri düşük bulunan 076-S, YHS-3-H, PBS-1-H, KMP-2-H ve FLH-3-H izolatlarının 1000 J/ergin dozu ve daha yüksek dozlarının, depolama ortamlarına benzer ortamlarda denenmesi gereklidir. Bu uygulamalara, "Feromonlarla zararlı nematodların yoğun olarak bulunduğu belirli alanlara çekerek zararlı ile nematodu buluşturma uygulaması" da (Plarre, 1996; Mabbett, 2003) eklenebilir.

Yararlanılan Kaynaklar

- Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.
- Anonymous, 2013a. Ambar Zararlıları. (Web sayfası: <http://www.zmmae.gov.tr>), (Erişim tarihi: Mayıs 2015).
- Anonymous, 2013b. Nematoloji. (Web sayfası: <http://www.zmmae.gov.tr>), (Erişim tarihi: Mayıs 2015).
- Canhilal, R. & G.R. Carner, 2006. Efficacy of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) against the squash vine borer, *Melittia cucurbitae* (Lepidoptera: Sesiidae) in South Carolina. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, 23: 27-39.
- Canhilal, R., M. mren, H. Toktay, R. Bozbuğa, R. Çetintaş, H. Kütük, Y.E. Özdemir & S. Doğan, 2014. Adana ve Kahramanmaraş İllerinde Entomopatojen Nematodların Belirlenmesi, Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi, Antalya, s350.
- Canhilal, R., M. mren, L. Waeyenberge, H. Toktay, Y. Deniz, Y.E. Özdemir, S. Doğan & I.H. Elekcioglu, 2015. Occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Kayseri province, Turkey, XVIII. International Plant Protection Congress, Berlin, s302.
- Dizlek, H., H. Gül & R. Kılıçdağı, 2008. Tahılların depolanmasında en sık karşılaşılan sorunlar ve bu sorunların çözüm önerileri. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs 2008, Erzurum, s391-394.
- Kung, S.P., R. Gaugler & H.K. Kaya, 1990. Soil type and entomopathogenic nematode persistence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 55: 401-406.
- Laznik, Z. & S. Trdan, 2010. Intraspecific variability of *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Rhabditida: Steinernematidae) as biological control agent of rice weevil (*Sitophilus oryzae* (L.), Coleoptera: Curculionidae) adults. *Acta Agriculturae Slovenica*, 95 (1): 51 – 59.
- Mabbett, T., 2003. Multi-species attractant for insect monitoring in stored grain. *Int. Pest Control*, 45: 199-201.
- Plarre, R., 1996. Three-dimensional distribution of *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) in wheat influenced by the synthetic aggregation pheromone. *Journal of Stored Products Research*, 32: 275-283.
- Ramos-Rodríguez, O., J.F. Campbell & S. Ramaswamy, 2006. Pathogenicity of three species of entomopathogenic nematodes to some major stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*, 42, 241–252.
- Ramos-Rodríguez, O., J.F. Campbell & S. Ramaswamy, 2007. Efficacy of the entomopathogenic nematode *Steinernema riobrave* against the stored-product insect pests *Tribolium castaneum* and *Plodia interpunctella*. *Biological Control*, 40: 15-21
- Shahina, F. & J. Salma, 2010. Laboratory evaluation of seven pakistani strains of entomopathogenic nematode against stored grain insect pest *Sitophilus oryzae* (L.). *Pakistan Journal of Nematology*, 28(2): 295-305.
- SPSS, 2003. A simple Guide and Reference. 11.0 Update. Pearson Education Inc., Boston.
- Woodring, J.L. & H.K. Kaya, 1988. Steinernematid and heterorhabditid nematodes: A hand book of biology and techniques. Southern Cooperative Series. Bulletin 331. Southern Cooperative, Fayetteville, AR, USA.