BİTKİ KORUMA BİLİMİNDE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR:

HASTALIKLAR, ZARARLILAR VE BİYOLOJİK MÜCADELE

EDİTÖR
DOÇ. DR. AYŞE YEŞİLAYER





BİDGE

BİDGE Yayınları

Bitki Koruma Biliminde Güncel Yaklaşımlar: Hastalıklar, Zararlılar ve Biyolojik Mücadele

Editör: Doç. Dr. Ayşe YEŞİLAYER

ISBN: 978-625-5474-49-0

1. Baskı
Sayfa Düzeni: Gözde YÜCEL
Yayınlama Tarihi: 2026-10-25
BİDGE Yayınları

Bu eserin bütün hakları saklıdır. Kaynak gösterilerek tanıtım için yapılacak kısa alıntılar dışında yayıncının ve editörün yazılı izni olmaksızın hiçbir yolla çoğaltılamaz.

Sertifika No: 71374
Yayın hakları © BİDGE Yayınları
www.bidgeyayinlari.com.tr - bidgeyayinlari@gmail.com
Krc Bilişim Ticaret ve Organizasyon Ltd. Şti.
Güzeltepe Mahallesi Abidin Daver Sokak Sefer Apartmanı No: 7/9 Çankaya / Ankara

İÇİNDEKİLER

ISPANAKTA FUNGUS VE OOMİSETLERİN NEDEN OLDUĞU HASTALIKLARA KARŞI BİYOLOJİK MÜCADELE ÇALIŞMALARI 1

NURAY ÖZER, ÖMER ÜMİT OKÇU

CRISPR-CAS13A SİSTEMİYLE BİTKİ VİRÜS HASTALIKLARININ TEŞHİS POTANSİYELİ 30

BERNA BAŞ

MAINTAINING BIOLOGICAL QUALITY DURING LONG-TERM STORAGE OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES 50

İSMAİL ALPER SUSURLUK, ALPEREN KAAN BÜTÜNER

BÖLÜM 1

ISPANAKTA FUNGUS VE OOMİSETLERİN NEDEN OLDUĞU HASTALIKLARA KARŞI BİYOLOJİK MÜCADELE ÇALIŞMALARI

NURAY ÖZER[1]
ÖMER ÜMİT OKÇU[2]

Giriş

Ispanak (*Spinacia oleracea* L.), dünya genelinde yaygın olarak yetiştirilen ve tüketilen, besin değeri yüksek önemli bir yaprağı yenen sebzedir (Morelock & Correll, 2008). Farklı yaprak şekli ve dokusuna sahip çok sayıda çeşidi bulunan ıspanak, çevre koşulları ve fotoperiyoda bağlı olarak vejetatif ve generatif gelişim gösteren tek yıllık bir bitkidir (Van der Vossen, 2004).

Ispanak, yüksek su içeriğinin yanı sıra vitamin, mineral, karotenoid ve fenolik bileşikler bakımından zengin bir sebzedir. Özellikle A, C, E ve K vitaminleri ile lutein, zeaksantin, β-karoten ve çeşitli flavonoidleri içermesi, besinsel ve fonksiyonel değerine

[1] Prof. Dr., Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Orcid: 0000-0001-6876-7580
[2] Araş. Gör., Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Orcid: 0000-0002-4809-4398

önemli katkı sağlamaktadır (Chun et al., 2005; Bunea et al., 2008; Roberts & Moreau, 2016). Ispanakta bulunan fenolik bileşikler arasında flavonoidler, fenolik asitler ve bunların çeşitli türevleri yer almakta; patuletin, spinasetin, spinatosid, jaceidin, ferulik asit ve p-kumarik asit öne çıkan bileşikler arasında bulunmaktadır (Mattila & Hellström, 2007; Koh et al., 2012; Roberts & Moreau, 2016). Bununla birlikte, bu bileşiklerin miktarı genotip, yaprak olgunluğu, yetiştirme koşulları ve mevsim gibi faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir (Howard et al., 2002; Pandjaitan et al., 2005; Cho et al., 2008; Koh et al., 2012). Ispanağın içerdiği biyoaktif bileşikler nedeniyle antioksidan ve çeşitli fonksiyonel özellikler gösterebildiği, ayrıca tüketiminin oksidatif stresin azaltılması ve antioksidan kapasitenin artırılmasıyla ilişkili olabileceği bildirilmektedir (Chu et al., 2002; Bergman et al., 2001; Roberts & Moreau, 2016; Cao et al., 1998; Porrini et al., 2002). Bununla birlikte, yüksek oksalik asit ve nitrat içeriği de ıspanağın beslenme açısından değerlendirilmesinde dikkate alınması gereken özellikler arasındadır (Noonan & Savage, 1999; Santamaria, 2006).

Ispanağın besinsel ve fonksiyonel öneminin yanı sıra, dünya genelindeki yüksek üretim hacmi de bu türün tarımsal açıdan önemini ortaya koymaktadır. FAOSTAT'ın 2024 yılı verilerine göre dünya ıspanak üretimi yaklaşık 30.72 milyon ton olarak gerçekleşmiş; Çin 28.34 milyon ton ile ilk sırada yer alırken, Türkiye 237.216 tonluk üretimiyle dünya ıspanak üretiminde dördüncü sırada yer almıştır (FAO, 2024). Türkiye'de ise 2025 yılında 158.483 dekar alanda 256.809 ton ıspanak üretilmiştir (TÜİK, 2025). Ispanağın dünya genelindeki yüksek üretim hacmi ve Türkiye'nin başlıca üretici ülkeler arasında yer alması, verim ve kalite kayıplarına neden olabilecek hastalıkların etkin ve sürdürülebilir yönetimini önemli hale getirmektedir.

Ispanakta fungus ve oomisetler tarafından oluşturulan hastalıkların sürdürülebilir yönetimi önemli bir gereklilik olup,

kimyasal fungisitlerin yoğun kullanımına bağlı çevresel riskler, kalıntı sorunları ve patojenlerde dayanıklılık gelişimi biyolojik mücadele gibi alternatif ve çevre dostu yaklaşımlara olan ilgiyi artırmıştır. Literatürde, farklı hastalıklara karşı çeşitli mikroorganizmaların ve biyolojik mücadele uygulamalarının hastalık gelişimini azaltmada umut verici sonuçlar sağladığı bildirilmektedir. Bu derlemede, ıspanakta fungus ve oomisetlerin neden olduğu hastalıkların biyolojik mücadelesine yönelik mevcut çalışmaların bir arada değerlendirilmesi, kullanılan biyolojik mücadele etmenlerinin etkinliklerinin ortaya konulması ve gelecekteki araştırmalara yönelik bir çerçeve sunulması amaçlanmıştır.

Ispanakta Biyolojik Mücadele Çalışmalarına Konu Olan Başlıca Hastalıklar

Ispanakta biyolojik mücadele çalışmalarına konu olan hastalıklar arasında Fusarium solgunluğu, Alternaria yaprak lekesi, antraknoz, Verticillium kaynaklı solgunluk, fide çürüklüğü ve çökerten ile bazı diğer yaprak ve kök hastalıkları yer almaktadır. *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*'nin neden olduğu Fusarium solgunluğunda özellikle yaşlı yapraklarda solgunluk ve kloroz görülmekte, hastalığın ilerlemesiyle iletim dokularında koyulaşma, kazık kökte nekroz ve bitki ölümü meydana gelebilmektedir (Goode et al., 1968; Correll et al., 1994). *Alternaria alternata* ve *A. spinaciae* ile ilişkili yaprak lekelerinde ise çoğunlukla alt ve orta yapraklarda başlayan küçük, kahverengi lekeler zamanla genişleyerek konsantrik halkalar ve nekrotik alanlar oluşturmakta, şiddetli enfeksiyonlarda lekelerin birleşmesiyle yaprak yanıklığı gelişebilmektedir (Czajka et al., 2015; Gilardi et al., 2019). Ispanak antraknozunda *Colletotrichum* türleri genç ve yaşlı yapraklarda başlangıçta küçük, dairesel ve suyla ıslanmış görünümlü kahverengi lekelere neden olmakta; bu lezyonlar zamanla genişleyerek klorotik ve nekrotik alanlara dönüşebilmekte ve yüksek nem koşullarında üzerlerinde

koyu renkli aservuluslar gelişebilmektedir (Correll et al., 1994; Washington et al., 2006). Toprak ve tohum kaynaklı bir vasküler patojen olan *Verticillium dahliae* özellikle ıspanak tohumu üretiminde önem taşımakta; yapraklarda solgunluk ve iletim dokularında renk değişikliği ile karakterize edilen belirtiler çoğunlukla bitkilerin generatif döneme geçmesiyle belirginleşmektedir (du Toit et al., 2005; Maruthachalam et al., 2013). Oomisetlerden *Pythium ultimum* (güncel adıyla *Globisporangium ultimum*) ise özellikle fide gelişiminin erken dönemlerinde tohum çürüklüğü ile çıkış öncesi ve çıkış sonrası çökertene neden olmakta; genç bitkilerin kök ve gövde dokularında suyla ıslanmış görünüm, kahverengileşme ve çökme meydana getirebilmektedir (Magnée et al., 2022). Bunların yanı sıra *Phyllosticta spinaciae* ile ilişkili yaprak lekelerinde küçük nekrotik lekeler gelişebilmekte ve uygun koşullarda bu lekeler birleşerek daha geniş nekrotik alanlara dönüşebilmektedir (Correll et al., 1994); ıspanak fidelerinde *F. oxysporum, F. solani* ve *F. roseum* gibi *Fusarium* türleri izole edilmiş olup patojenisite testlerinde *F. oxysporum* ve *F. roseum*'un köklerde önemli zarara neden olabildiği belirlenmiştir (Sumner et al., 1976).

In vitro Koşullarda Yürütülen Biyolojik Mücadele Çalışmaları

Ispanakta biyolojik mücadeleye yönelik çalışmaların bir kısmı, potansiyel antagonistlerin ilk taramasını yapmak ve patojen gelişimi üzerindeki doğrudan etkilerini belirlemek amacıyla *in vitro* koşullarda yürütülmüştür. Bu çalışmalarda çoğunlukla ikili kültür testleri, miselial gelişimin engellenmesi, spor çimlenmesi ve antagonistik metabolit üretimi gibi parametreler değerlendirilmiştir.

Bhale et al. (2012), ıspanakta yaprak leke etmeni *A. spinaciae* ve solgunluk etmeni *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae*'ye karşı farklı *Trichoderma* tür ve izolatlarının antagonistik etkinliğini *in vitro* koşullarda ikili kültür yöntemiyle araştırmışlardır. Çalışmada

Marathwada bölgesinden izole edilen 12 *T. viride*, 12 *T. harzianum*, 7 *T. koningii*, 5 *T. pseudokoningii* ve 10 *T. virens* izolatı olmak üzere toplam 46 Trichoderma izolatı değerlendirilmiştir. Antagonistik etkinlik, PDA ortamında patojen ve antagonistin ikili kültür denemelerinde 27 ± 2 °C'de 7 günlük inkübasyon sonunda miselial gelişimi engelleme oranı esas alınarak belirlenmiştir. *A. spinaciae*'ye karşı en yüksek engelleme oranları *T. viride* Tv1 (%84.44), *T. harzianum* Th4 (%86.66), *T. koningii* Tk7 (%86.30), *T. pseudokoningii* Tp5 (%81.11) ve *T. virens* Tvr4 ile Tvr9 (%86.66) izolatlarında belirlenmiştir. *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae*'ye karşı ise *T. viride* Tv4 %90.00 ile en yüksek etkinliği göstermiş; bunu kendi tür grupları içerisinde *T. harzianum* Th5 (%80.64), *T. virens* Tvr4 (%78.64), *T. pseudokoningii* Tp3 (%73.33) ve *T. koningii* Tk3 (%67.50) izlemiştir. Bu sonuçlar, aynı *Trichoderma* türüne ait izolatlar arasında antagonistik etkinliğin önemli ölçüde değişebildiğini ve özellikle uygun izolat seçiminin biyolojik mücadele açısından önemli olduğunu göstermektedir.

Zhao et al. (2014), komposttan izole edilen *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 izolatının *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae*'ye karşı biyolojik mücadele potansiyelini ve antifungal etki mekanizmasını *in vitro* koşullarda değerlendirmişlerdir. Q-426'nın hücrelerden arındırılmış kültür üst sıvısı, çeşitli bitki patojeni funguslara karşı geniş spektrumlu antifungal etkinlik göstermiş ve *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae*'ye karşı 28.0 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur. Moleküler analizlerde Q-426 genomunda fengisin (fen) ve bacillomisin D (bmy) biyosentezinden sorumlu gen kümeleri ile sfp geninin bulunduğu belirlenmiş; kültür sıvısından saflaştırılan antifungal bileşiklerin fengisin A, fengisin B ve bacillomisin D olduğu LC-ESI-MS (kütle spektrometrisi) analizleriyle doğrulanmıştır. Saflaştırılan lipopeptitler arasında en bol bulunan ve düşük hemolitik aktivite gösteren fengisin A ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir. Fengisin A'nın *F. oxysporum* f. sp.

spinaciae'ye karşı en düşük engelleyici konsantrasyonu (MIC) 31.25 µg mL^{-1} olarak belirlenmiştir. Fengisin A, 50, 25 ve 12.5 µg mL^{-1} konsantrasyonlarında spor çimlenmesini sırasıyla %86.3, %65.0 ve %26.3 oranında engellemiş; 50 µg mL^{-1}'nin üzerindeki konsantrasyonlarda ise spor çimlenmesi tamamen baskılanmıştır. Fengisin A uygulaması sonucunda patojen hiflerinde kalınlaşma ve yüzey pürüzlülüğü gibi belirgin morfolojik değişiklikler gözlenmiştir. Bununla birlikte, hücre içi katyon, nükleik asit ve protein sızıntısının belirlenmemesi ve membran geçirgenliğinde anlamlı bir değişiklik saptanmaması, fungus hücre zarının fengisin A'nın birincil etki hedefi olmadığını göstermiştir. Araştırmacılar, Q-426 tarafından üretilen lipopeptitlerin, özellikle fengisin A'nın, *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae*'ye karşı biyolojik mücadelede değerlendirilme potansiyeli taşıdığını bildirmişlerdir.

Bhujbal et al. (2016), ıspanakta antraknoza neden olan *C. dematium*'a karşı farklı biyolojik mücadele etmenlerinin *in vitro* etkinliğini değerlendirmişlerdir. İkili kültür denemelerinde, biyolojik mücadele etmenleri arasında en yüksek miselial gelişim engelleme oranı %70.00 ile *T. viride* tarafından sağlanmış, bunu *Aspergillus niger* (%65.93), *T. harzianum* (%64.07), *T. hamatum* (%61.48) ve *T. longibrachiatum* (%57.78) izlemiştir. Bulgular, özellikle *T. viride*'nin *C. dematium*'a karşı yüksek antagonistik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

In vivo Koşullarda Yürütülen Biyolojik Mücadele Çalışmaları

In vitro koşullarda umut verici bulunan biyolojik mücadele etmenlerinin bir kısmı, bitkiler üzerindeki etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla sera, saksı ve tarla koşullarında değerlendirilmiştir. Bu çalışmalarda hastalık görülme sıklığı ve şiddetinin yanı sıra, biyolojik mücadele etmenlerinin uygulama şekli ve zamanı, bitki gelişimi, patojen popülasyonu ve bazı durumlarda olası etki mekanizmaları da incelenmiştir.

Katsube et al. (1994), ıspanakta *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae*'nin neden olduğu Fusarium solgunluğunun biyolojik mücadelesinde patojen olmayan *F. oxysporum*'un etkinliğini farklı inokulasyon koşullarında değerlendirmişlerdir. Hastalığın etkili biçimde baskılanabilmesi için patojen olmayan *F. oxysporum*'un spor süspansiyonunun toprağa, patojen inokulum yoğunluğunun 10 katından daha yüksek bir yoğunlukta uygulanması gerektiği belirlenmiştir. Buna karşın, patojen inokulum yoğunluğu 10^4 spor g^{-1} toprak düzeyine ulaştığında, patojen olmayan *F. oxysporum* uygulaması hastalığı anlamlı düzeyde baskılayamamıştır. Ayrıca, patojen olmayan *F. oxysporum*'un 1.7×10^6 spor g^{-1} toprak düzeyinde önceden uygulandığı fide yetiştirme ortamında 14 gün yetiştirilen fidelerin patojenle bulaşık toprağa şaşırtılması sonrasında hastalık baskılayıcı etkinin 18 gün boyunca devam ettiği bildirilmiştir.

Shin & Takehara (1998), ıspanaktan izole edilen dört patojen olmayan *F. oxysporum* izolatının (NF01, NF02, NF03 ve NF04) *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae*'nin neden olduğu Fusarium solgunluğuna karşı biyolojik mücadele potansiyelini araştırmışlardır. Dört izolatın da hastalığı farklı düzeylerde baskıladığı, bunlar arasında NF01'in en yüksek etkinliği gösterdiği belirlenmiştir. Seçilen NF01 izolatının domates, salatalık, turp ve ıspanakta patojen olmadığı doğrulanmıştır. *In vitro* değerlendirmelerde NF01'in PSA ortamında patojenin gelişimini doğrudan engellemediği belirlenmiştir. Buna karşın, sera koşullarında NF01'in spor süspansiyonunun saksılara sulama yoluyla uygulanması Fusarium solgunluğunun görülme sıklığını azaltmış ve hastalık baskılanmasının patojen inokulum yoğunluğunun düşük olduğu koşullarda daha belirgin olduğu saptanmıştır. NF01'in patojen inokulasyonundan 7 gün önce, 3 gün önce veya patojenle eş zamanlı olarak uygulanmasının karşılaştırıldığı denemelerde, ön uygulamaların eş zamanlı uygulamaya göre daha yüksek hastalık baskılanması sağladığı ve en

yüksek etkinliğin patojenden 7 gün önce yapılan uygulamada elde edildiği belirlenmiştir. Çalışmada NF01'in toprak ve bitki dokularındaki varlığını izlemek amacıyla nit mutantları geliştirilmiş; yeniden izolasyonlarda NF01'in patojenden önce uygulandığı bitki ve topraklarda NF01/patojen oranının eş zamanlı uygulamaya göre daha yüksek olduğu ve bu oranın 7 gün önceki uygulamada 3 gün önceki uygulamaya göre daha yüksek bulunduğu saptanmıştır. Araştırmacılar, NF01'in hastalık baskılayıcı etkinliğinde patojenden önce kök bölgesinde yerleşmesinin ve enfeksiyon bölgesindeki rekabetin önemli rol oynayabileceğini belirtmişlerdir.

Tsuda et al. (2001b), ıspanak köklerinden izole edilen endofitik mikroorganizmalar arasından *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae*'ye karşı biyolojik mücadele potansiyeline sahip izolatları belirlemek amacıyla kapsamlı bir tarama çalışması gerçekleştirmişlerdir. Ticari seralarda yetiştirilen ıspanak bitkilerinin yüzey sterilizasyonu yapılmış köklerinden toplam 663 mikroorganizma izolatı (441 bakteri ve 222 fungus) elde edilmiştir. İlk taramada ön çimlendirilmiş ıspanak tohumları, aday izolatlarla inokule edilmiş steril ticari saksı toprağına ekilmiş ve 10 gün sonra bitkiler yaklaşık 5×10^4 konidi g^{-1} kuru toprak yoğunluğunda *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae* ile inokule edilmiştir. Bu aşamada 50 bakteri ve sekiz fungus izolatı %50'nin üzerinde hastalık baskılama potansiyeli göstermiş ve bitki gelişimi üzerinde olumsuz etki oluşturmamıştır. Seçilen 58 izolatın ikinci taramasında aynı yaklaşım kullanılmış, ancak patojen 5×10^5, 5×10^4 ve 5×10^3 konidi g^{-1} kuru toprak olmak üzere üç farklı yoğunlukta uygulanmış ve dokuz bakteri izolatı yüksek koruyucu etki göstermiştir. Daha sonra sera koşullarında patojenle bulaşık (7×10^4 konidi g^{-1} kuru toprak) parsellerde yapılan değerlendirmelerde, tohumlar seçilen bakteri izolatlarının yaklaşık 10^9 hücre mL^{-1} yoğunluğundaki süspansiyonlarında 20 °C'de 24 saat bekletilerek ekilmiş ve dört bakteri izolatının Fusarium solgunluğunu azalttığı belirlenmiştir.

Bunlar arasında SM10 izolatı hastalığı hasada kadar anlamlı düzeyde baskılayan en başarılı izolat olmuş; %44.4 koruyucu etki sağlamış ve verim hastalık kontrolüne göre %53.7 daha yüksek bulunmuştur. Fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre *Enterobacter cloacae* olarak tanımlanan SM10'un, ışık ve immünoelektron mikroskobu incelemelerinde ıspanak köklerinin ksilem iletim borularında endofitik olarak kolonize olduğu, epidermis ve kortekste veya hücrelerarası boşluklarda bulunmadığı, ayrıca kök dokusunda herhangi bir zarara neden olmadığı belirlenmiştir. Araştırmacılar, *E. cloacae* SM10'un ıspanakta Fusarium solgunluğuna karşı umut verici bir biyolojik mücadele etmeni olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, çalışmalarının devamında (Tsuda et al., 2001a), bu kez *E. cloacae* SM10'un Fusarium solgunluğunu baskılamasındaki olası mekanizmalardan biri olan indol-3-asetik asit (IAA) üretiminin rolünü araştırmışlardır. Çalışmada, rifampisine dayanıklı ebeveyn izolatı SM10R ile IAA sentezinden sorumlu ipdC geninin değiştirilmesi sonucu elde edilen IAA üretimi büyük ölçüde azaltılmış SM10RK mutantı karşılaştırılmıştır. HPLC analizlerinde SM10R'nin dört günlük inkübasyon sonunda 323.8 µg mL^{-1} IAA ürettiği, SM10RK'nin ise yalnızca 2.2 µg mL^{-1} (%0.7) IAA ürettiği belirlenmiştir. Biyolojik mücadele denemelerinde ıspanak tohumları 1×10^{11} KOB mL^{-1} bakteri süspansiyonunda 22 °C'de 24 saat bekletilmiş, 10 günlük bitkiler daha sonra yaklaşık 5×10^{3} KOB g^{-1} kuru toprak yoğunluğunda *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae* ile inokule edilmiştir. Hastalık değerlendirmeleri inokulasyondan 15 ve 20 gün sonra 0–2 skalası kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SM10R uygulaması hastalık görülme sıklığını her iki değerlendirme zamanında da anlamlı düzeyde azaltırken, hastalık şiddetinde anlamlı azalma 20. günde belirlenmiştir. Araştırmacılar, ebeveyn izolat ile IAA üretimi azaltılmış mutant arasındaki karşılaştırmaya dayanarak, SM10'un IAA üretiminin Fusarium solgunluğunu baskılamadaki etkinliği açısından önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Muslim et al. (2003), hipovirülent iki çekirdekli Rhizoctonia (HBNR) izolatlarının ıspanakta *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae*'nin neden olduğu Fusarium solgunluğuna karşı biyolojik mücadele potansiyelini sera ve tarla toprağının kullanıldığı örtü altı koşullarda araştırmışlardır. Çalışmada G1, L2, W1 ve W7 izolatları değerlendirilmiş ve karşılaştırma amacıyla patojen olmayan *F. oxysporum* F13 izolatı kullanılmıştır. HBNR ile önceden kolonize edilmiş yetiştirme ortamında 14 gün geliştirilen fideler, 10^5 spor g^{-1} toprak yoğunluğunda patojen içeren ortama aktarılmıştır. Sera denemesinde tüm HBNR izolatları hastalık şiddetini önemli ölçüde azaltmış; en yüksek baskılama W7 (%85–100) ve W1 (%81–100) izolatlarında belirlenmiştir. Örtü altı denemelerinde ise fumigasyon uygulanmış tarla toprağına patojen 10^5 spor g^{-1} toprak yoğunluğunda suni olarak bulaştırılmış ve 3 gün sonra HBNR uygulanmış ortamda 14 gün yetiştirilen fideler bu toprağa şaşırtılmıştır. Bu koşullarda G1 ve W7 izolatları hastalık şiddetini sırasıyla %56–100 ve %63–100 oranlarında azaltmıştır. Ayrıca W1 ve W7 uygulamalarında yaprak taze ağırlığı %63 artmış ve bazı denemelerde iletim dokularındaki renk değişimi tamamen baskılanmıştır. HBNR uygulamaları yaprak sapı ve köklerdeki patojen popülasyonunu önemli ölçüde azaltmış, HBNR uygulanan bitkilerden elde edilen kök ekstraktları ise patojenin spor çimlenmesini ve çim tüpü gelişimini baskılamıştır. Araştırmacılar, HBNR izolatlarının genel olarak patojen olmayan *F. oxysporum* F13'e göre daha iyi sonuçlar verdiğini; ancak hastalık baskılanmasının yalnızca kolonizasyon rekabetiyle açıklanamayacağını ve kök ekstraktlarında gözlenen antifungal etkinlik ile bitkide uyarılmış dayanıklılığın bu biyolojik mücadele etkisinde önemli rol oynayabileceğini belirtmişlerdir.

Cummings et al. (2009), organik ıspanak üretiminde farklı biyolojik ve organik tohum ve toprak uygulamalarını *P. ultimum*, *R. solani* ve *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae*'ye karşı sera koşullarında iki ayrı denemede değerlendirmişlerdir. Her patojen için ayrı olarak

yürütülen denemelerde yetiştirme ortamı patojenle inokule edilmiş (*P. ultimum*, 1×10^3 KOB g^{-1}; *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae*, 1×10^4 KOB g^{-1}; *R. solani*, birinci ve ikinci denemelerde sırasıyla 5×10^4 ve 2.5×10^4 KOB g^{-1}) ve ardından Lazio çeşidi ıspanak tohumları ekilmiştir. *P. ultimum*'a karşı en belirgin etkinlik GTG I (organik dezenfektan içeren tohum uygulaması) ve GTG II (organik dezenfektan + *T. harzianum* T-22 içeren tohum uygulaması) uygulamalarında görülmüş; GTG I ilk denemede çıkış öncesi çökerteni tamamen baskılarken, GTG II ikinci denemede aynı hastalık bileşeninde %100 baskılama sağlamıştır. İlk denemede Natural II (aktinomiset içeren tohum uygulaması) çıkış sonrası çökerteni %98.8 oranında azaltmış, ancak uygulamaların etkinliği denemeler arasında değişkenlik göstermiştir. *R. solani*'ye karşı hastalık düzeyinin yüksek olduğu ilk denemede GTG I ve Natural II çıkış öncesi çökerteni yaklaşık %60 oranında azaltmış ve standart fungisit uygulamasıyla benzer sonuç vermiştir. İkinci denemede ise kontrol grubunda hastalık düzeyinin çok düşük olması nedeniyle hesaplanan yüksek oransal azalmalar biyolojik açıdan sınırlı kalmış ve uygulamalar arasında belirgin bir hastalık baskılanması ortaya konulamamıştır. *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae*'ye karşı Prestop (*Gliocladium catenulatum*) uygulaması çıkış sonrası solgunluğu her iki denemede de anlamlı olarak azaltmış; bu azalma birinci ve ikinci denemelerde sırasıyla %37.3 ve %55.5 olarak hesaplanmıştır. Bununla birlikte, Prestop uygulamasında ikinci denemede çıkış öncesi çökerten artmıştır. Yield Shield (*B. pumilus*) yalnızca birinci denemede, kompost çayı ise yalnızca ikinci denemede çıkış sonrası solgunluğu anlamlı olarak azaltmıştır. Çıkış öncesi çökerteni anlamlı olarak azaltan bir uygulama belirlenmemiştir. Araştırmacılar, değerlendirilen tohum ve toprak uygulamalarının etkinliğinin denemeler arasında değişkenlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmada ayrıca iki farklı ticari Lazio tohum partisinde tohum uygulamalarının doğal olarak tohumla taşınan funguslar üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Birinci tohum partisinde Mycostop Mix

ve Natural II, *Stemphylium botryosum* görülme oranını %4.00'ten %0.50'ye düşürürken, GTG I uygulamasında bu oran %17.50'ye yükselmiştir. Aynı partide uygulamasız tohumlarda %49.75 olan *Verticillium* spp. görülme oranı GTG I, GTG II, Mycostop Mix, Natural II ve Natural X uygulamalarıyla anlamlı olarak azaltılmış; *Alternaria* spp. açısından da bu uygulamaların tümünde anlamlı azalmalar belirlenmiştir. İkinci tohum partisinde Mycostop Mix, *S. botryosum* görülme oranını azaltırken, GTG I ve GTG II uygulamalarında bu oran artmıştır. Bu partide *Verticillium* spp. görülme oranı düşük olmakla birlikte T-22 uygulamasında fungus saptanmamış; uygulamasız tohumlarda %96.25 oranında bulunan *Alternaria* spp. ise GTG I ve GTG II uygulamalarıyla sırasıyla %3.00 ve %2.25'e düşürülmüştür. *Fusarium* spp. açısından her iki tohum partisinde de uygulamalar arasında anlamlı farklılık belirlenmemiştir.

Horinouchi et al. (2010), bitki gelişimini teşvik eden fungus olarak tanımlanan *F. equiseti* GF183 izolatının, *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae*'nin neden olduğu ıspanak Fusarium solgunluğuna karşı biyolojik mücadele potansiyelini beş farklı denemede değerlendirmişlerdir. İlk üç denemede GF183 ekim sırasında kâğıt saksılardaki yetiştirme ortamına uygulanmış, fideler 14 gün sonra patojenle bulaştırılmış toprağa şaşırtılmıştır. Bu denemelerde hastalık şiddetindeki azalma sırasıyla %91.8, %51.5 ve %79.9 olarak belirlenmiştir. Dördüncü ve beşinci denemelerde GF183'ün ekim sırasında tek uygulaması, şaşırtmadan bir gün önce tek uygulaması ve her iki dönemde yapılan çift uygulaması karşılaştırılmış; beşinci denemede ayrıca tohumların doğrudan patojenle bulaşık toprağa ekildiği bir uygulamaya yer verilmiştir. Dördüncü denemede ekim sırasında yapılan tek uygulama ve çift uygulama hastalık şiddetini patojen kontrolüne göre sırasıyla %52.5 ve %58.1 oranında azaltırken, yalnızca şaşırtmadan bir gün önce yapılan uygulama etkili bulunmamıştır. Beşinci denemede çift uygulama hastalık

şiddetini patojen kontrolüne göre %87.3 oranında azaltmış; ayrıca doğrudan patojenle bulaşık toprağa ekim yapılan uygulama referans alındığında koruyucu etki %94.8 olarak hesaplanmıştır. GF183 uygulanmış ve patojenle inokule edilmiş bitkilerden elde edilen kök ekstraktları ise patojenin çoğalmasını 3., 5. ve 7. günlerde sırasıyla %67.9, %48.8 ve %53.8 oranında baskılamıştır. Araştırmacılar, GF183'ün kökleri kolonize etmesinin bitkide savunma tepkilerini uyarabileceğini ve uyarılmış dayanıklılığın hastalık baskılanmasında rol oynayan mekanizmalardan biri olabileceğini bildirmişlerdir.

Olesen et al. (2014), ıspanak tohumu üretiminde *Verticillium* spp. enfeksiyonunun azaltılmasına yönelik biyolojik uygulamaları 2009–2011 yılları arasında, doğal olarak *Verticillium* spp. ile bulaşık tarla toprağının kullanıldığı saksı denemelerinde değerlendirmişlerdir. Çalışmada yıllara göre *T. harzianum* (Supresivit), *G. roseum* (Prestop Mix) ve Natural II uygulamalarına yer verilmiş; bitkiler bulaşık ve bulaşık olmayan topraklarda yetiştirilerek hasat edilen tohumlarda *Verticillium* spp., *S. botryosum*, *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp. ve *A. alternata* belirlenmiştir. Uygulamaların hasat edilen tohumlardaki *Verticillium* spp. enfeksiyonu üzerine genel olarak anlamlı bir etkisi saptanmazken, toprak tipinin 2010 ve 2011 yıllarında önemli olduğu belirlenmiştir. Bulaşık olmayan toprakta yetiştirilen bitkilerden elde edilen tohumlarda *Verticillium* spp. enfeksiyonu 2010 ve 2011 yıllarında sırasıyla %1 ve %2 iken, bulaşık toprakta bu oranlar %7 ve %46 olarak belirlenmiş; 2011 yılında bulaşık toprakta Natural II uygulamasında enfeksiyon oranı %22 olarak belirlenmiştir. Ayrıca 2010 yılında *G. roseum* uygulamasıyla *A. alternata* oranı, bulaşık toprakta %40'tan %24'e, bulaşık olmayan toprakta ise %66'dan %40'a düşmüştür. Değerlendirilen diğer tohum fungusları açısından biyolojik uygulamalarla tutarlı bir baskılama elde edilmemiştir.

Sugiyama et al. (2022), farklı organik atıkların anaerobik biyolojik arıtımı sonucunda oluşan beş sıvı organik artığın ve bu

örneklerden izole edilen bakterilerin *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae*'ye karşı biyolojik mücadele potansiyelini araştırmışlardır. *In vitro* denemelerde beş ham örneğin tamamı patojenin miselial gelişimini anlamlı düzeyde baskılarken, filtre edilmiş örneklerde bu etki görülmemiştir. Bu örneklerden izole edilen 32 bakteri izolatından sekizi antagonistik etki göstermiş ve sığır gübresi kökenli örnekten elde edilen *B. velezensis* AD-3, patojen gelişimini en fazla baskılayan izolat olarak saksı denemeleri için seçilmiştir. Saksı denemelerinde patojen toprağa 1×10^5 spor g^{-1} kuru toprak yoğunluğunda uygulanmış ve 25 °C'de karanlıkta 5 gün inkübe edilmiştir. Ardından AD-3, 1×10^6 KOB g^{-1} kuru toprak yoğunluğunda uygulanmış ve toprak aynı koşullarda 10 gün daha inkübe edildikten sonra ıspanak tohumları ekilmiştir. Aynı saksı denemesi iki kez tekrarlanmış ve AD-3 uygulaması Fusarium solgunluğu şiddetini patojen kontrolüne göre sırasıyla %64.3 ve %44.1 oranında azaltmıştır. Buna karşılık, AD-3 uygulaması topraktaki *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae* yoğunluğunda anlamlı bir azalma oluşturmamıştır. Araştırmacılar, AD-3'ün ıspanak Fusarium solgunluğunun biyolojik mücadelesinde kullanılabilecek potansiyel bir etmen olduğunu bildirmişlerdir.

Viana et al. (2024), iki mikroalg türünün (*Chlorella vulgaris* ve *Tetradesmus obliquus*), *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae*'ye karşı biyolojik mücadele potansiyelini hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda değerlendirmişlerdir. Çalışmada kurutulmuş mikroalglerden hazırlanan sulu süspansiyonlar kullanılmıştır. *In vitro* denemelerde *C. vulgaris* 3.0 g L^{-1} konsantrasyonda patojenin hif gelişimini %57.3, *T. obliquus* ise 0.75 g L^{-1}'de %64 oranında engellemiştir. Bu sonuçlara dayanarak seçilen *C. vulgaris* (2.0, 2.5 ve 3.0 g L^{-1}) ve *T. obliquus* (0.5, 0.75 ve 1.0 g L^{-1}) süspansiyonları, ısıl işlem uygulanmış ve uygulanmamış turba esaslı yetiştirme ortamlarında sera koşullarında değerlendirilmiştir. Mikroalg süspansiyonları haftada bir kez 20 mL olacak şekilde doğrudan

yetiştirme ortamına uygulanmış ve uygulamalar dört kez tekrarlanmıştır. *C. vulgaris* uygulamalarında hastalık görülme sıklığı önemli ölçüde değişmemesine rağmen, hastalık şiddeti ve hastalık gelişim eğrisi altında kalan alan (AUDPC) değerleri genel olarak azalmıştır. *T. obliquus* 0.5 g L^{-1} düzeyinde ısıl işlem uygulanmamış turbadaki hastalık görülme sıklığını %58 oranında azaltırken, 1.0 g L^{-1} uygulamasında ısıl işlem uygulanmış turbadaki hastalık görülme sıklığı %0 olarak belirlenmiştir. Ayrıca *T. obliquus* uygulamaları AUDPC değerlerini de azaltmış; ısıl işlem uygulanmamış turba substratında 0.5, 0.75 ve 1.0 g L^{-1} konsantrasyonlarının tamamında AUDPC kontrolden anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Isıl işlem uygulanmış turba substratında ise 0.5 ve 1.0 g L^{-1} uygulamalarında AUDPC kontrolden anlamlı olarak düşük bulunurken, her iki turba substratında da mikroalg konsantrasyonları arasında anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir.

Ihsan et al. (2025), ıspanakta *A. alternata*'nın neden olduğu yaprak lekesi hastalığının biyolojik mücadelesinde farklı biyolojik mücadele etmenlerinin etkinliğini hem laboratuvar hem de tarla koşullarında değerlendirmişlerdir. Çalışmada *T. harzianum*, *B. subtilis*, *Metarhizium robertsii* ve *M. anisopliae* kullanılmıştır. *In vitro* değerlendirmelerde tüm biyolojik mücadele etmenleri *A. alternata*'nın miselial gelişimini anlamlı düzeyde baskılamıştır. *B. subtilis* erken dönemde en yüksek antagonistik etkiyi göstererek patojenin miselial gelişimini 4. ve 8. günlerde sırasıyla %40.00 ve %49.97 oranında engellemiş, ancak bu oran 12. günde %22.54'e düşmüştür. Buna karşılık *T. harzianum* daha kararlı bir antagonistik etkinlik göstermiş ve 4., 8. ve 12. günlerde sırasıyla %33.33, %40.47 ve %29.67 oranında engelleme sağlamıştır. *M. robertsii* ve *M. anisopliae* de patojen gelişimini baskılamış olmakla birlikte, özellikle 12. günde *T. harzianum*'dan daha düşük etkinlik göstermişlerdir. Bu sonuçlara dayanarak *T. harzianum* ve *B. subtilis* tarla denemeleri için seçilmiştir. Tarla denemesinde bitkiler 3–4

yaprak döneminde 1×10^6 konidi mL^{-1} yoğunluğundaki *A. alternata* süspansiyonu ile inokule edilmiş, biyolojik mücadele etmenleri ise ekim sırasında uygulanmıştır. En başarılı uygulama *T. harzianum* + *B. subtilis* kombinasyonu olmuş; bu uygulamada hastalık şiddeti %12.0 olarak belirlenmiş ve yalnızca patojen uygulanan kontroldeki %35.2 hastalık şiddetine kıyasla %65.7 oranında azalmıştır. Kombinasyon uygulamasında bitki boyu, yaprak uzunluğu, yaprak genişliği, klorofil içeriği ile toplam taze ve kuru ağırlık (kök ve sürgün) değerleri de diğer uygulamalardan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Araştırmacılar, *T. harzianum* ile *B. subtilis*'in birlikte uygulanmasının tekli uygulamalardan daha başarılı olduğunu ve bu kombinasyonun ıspanakta Alternaria yaprak lekesinin biyolojik mücadelesinde umut verici bir seçenek olduğunu bildirmişlerdir.

Jangid et al. (2025), ıspanakta *A. alternata*'nın neden olduğu yaprak lekesine karşı üç *Trichoderma* türünün etkinliğini hem *in vitro* hem de tarla koşullarında değerlendirmişlerdir. *In vitro* ikili kültür denemelerinde *T. viride* %50.96 ile en yüksek miselial gelişimi engelleme oranını göstermiş, bunu *T. harzianum* (%47.26) ve *T. asperellum* (%43.71) izlemiştir. Tarla denemesinde iki haftalık ıspanak bitkilerine 1×10^6 konidi mL^{-1} yoğunluğunda *A. alternata* spor süspansiyonu püskürtülmüş, biyolojik mücadele etmenleri ise 15 gün arayla toplam üç kez uygulanmıştır. Hastalık şiddeti ekimden 45, 60 ve 75 gün sonra değerlendirilmiş ve bu üç değerlendirmenin ortalaması üzerinden *T. viride*, *T. harzianum* ve *T. asperellum* uygulamalarının hastalık şiddetini kontrole göre sırasıyla %19.4, %17.7 ve %15.7 oranında azalttığı hesaplanmıştır. Üç *Trichoderma* türünün hastalık şiddeti üzerindeki etkileri arasında anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir. Araştırmacılar, *Trichoderma* türlerinin ıspanakta Alternaria yaprak lekesinin baskılanmasında kullanılabilecek biyolojik mücadele etmenleri olduğunu bildirmişlerdir.

Mikrobiyom ve Biyolojik Toprak Dezenfeksiyonuna Dayalı Yaklaşımlar

Ispanakta hastalıkların biyolojik mücadelesine yönelik çalışmaların bir kısmında, tek bir antagonist mikroorganizmanın kullanımından farklı olarak, toprak ve tohum mikrobiyotasının hastalık baskılanmasındaki rolü ile biyolojik toprak dezenfeksiyonuna (BTD) dayalı yaklaşımlar ele alınmıştır. BTD, organik veya bitkisel materyallerin toprağa ilave edilmesi, toprağın sulanması ve üzerinin örtülerek anaerobik koşulların oluşturulması yoluyla toprak mikrobiyal topluluğunda ve mikrobiyal faaliyetler sonucunda oluşan bileşiklerde meydana gelen değişimlerden yararlanarak toprak kökenli patojenlerin baskılanmasını amaçlayan bir yöntemdir. Tohum mikrobiyomuna yönelik çalışmalarda ise doğal tohum mikrobiyotasının hastalık baskılanmasına katkısı, mikrobiyotası korunmuş ve dezenfeksiyon yoluyla azaltılmış tohumların karşılaştırılmasıyla araştırılmıştır. Bu çalışmalar, toprak veya tohumla ilişkili mikrobiyal toplulukların yapısındaki değişimlerin ve doğal olarak bulunan yararlı mikroorganizmaların bazı patojenlerin baskılanmasına katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

Mowlick et al. (2014), ıspanakta *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae*'nin neden olduğu Fusarium solgunluğunun baskılanmasında BTD kapsamında Japon turpu (*Raphanus sativus*) kalıntılarının kullanımını model saksı denemeleri ve doğal olarak hastalık görülen sera parsellerinde değerlendirmişlerdir. Model saksı denemesinde Japon turpu kökleri, kahverengi hardal (*Brassica juncea*) bitkileri ve buğday kepeği sırasıyla 10, 5 ve 2 kg m^{-2} oranlarında toprağa karıştırılmış; *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae* YSF-1 toprağa yaklaşık 1×10^4 KOB g^{-1} kuru toprak yoğunluğunda uygulanmıştır. Hazırlanan topraklar sulandıktan sonra hava geçişini sınırlandıran örtülerle kapatılarak üç hafta BTD koşullarında tutulmuş, daha sonra örtüler kaldırılarak toprak kurutulmuş ve

ıspanak ekilmiştir. Hastalık görülme oranı bitkisel materyal eklenmeyen kontrolde %100 iken Japon turpu, kahverengi hardal ve buğday kepeği uygulamalarında sırasıyla %15.4, %31.7 ve %22.7 olarak belirlenmiştir. Sera parsel denemelerinde ise Fusarium solgunluğunun doğal olarak görüldüğü toprakta Japon turpu kalıntıları parçalanarak 20 kg m^{-2} oranında toprağa karıştırılmış, 80–100 L m^{-2}'den fazla su verilerek toprak yüzeyi örtülmüş ve üç haftalık BTD uygulamasından sonra ıspanak yetiştirilmiştir. Sonraki yetiştirme dönemlerinde BTD farklı bitkisel materyallerle tekrarlanmış; ikinci uygulamada *B. juncea*, üçüncü uygulamada ise bazı parsellere yeniden Japon turpu kalıntıları toprağa karıştırılmıştır. İlk yetiştirme döneminde hastalık görülme oranı kontrol parselinde de düşük (%7.7) olduğundan uygulamanın hastalık üzerindeki etkisi belirgin olarak ortaya çıkmamıştır. Ancak sonraki yetiştirme dönemlerinde hastalık baskılanması daha belirgin olmuş; ilk BTD'de Japon turpu uygulanan ve ikinci BTD'de kahverengi hardalın toprağa karıştırıldığı parselde hastalık görülme oranı kontroldeki %44.5'e karşı %3.4 olarak belirlenmiş ve hastalık %92.3 oranında azalmıştır. Üçüncü BTD'de aynı parsele yeniden Japon turpu kalıntısı uygulandığında ise hastalık görülme oranı kontroldeki %58.5'e karşı %6.0 olmuş ve %89.7 oranında azalma sağlanmıştır. Bu uygulamalarda hastalığın baskılanmasına paralel olarak ıspanak veriminin de arttığı belirlenmiştir. Buna karşılık, yeni bitkisel materyal eklenmeden yalnızca sulama ve örtme işlemlerinin tekrarlanması hastalığın etkili biçimde baskılanmasını sağlamamıştır. BTD uygulanmış topraklarda, kontrol uygulamasında bulunmayan başta asetat olmak üzere bütirat ve propiyonat gibi bileşiklerin varlığı saptanmıştır. Bakteri topluluğunun incelenmesi sonucunda BTD uygulanan topraklarda Firmicutes şubesine ait Clostridia ve Bacilli sınıflarının baskın gruplar arasında yer aldığı belirlenmiştir. Araştırmacılar, hastalığın baskılanmasında anaerobik koşullar altında uçucu yağ asitlerinin oluşumu ve anaerobik bakterilerin çoğalmasının rol oynayabileceğini ve etkili hastalık

baskılamasının sürdürülebilmesi için BTD'nin bitkisel materyal ilavesiyle tekrarlanmasının gerekli olduğunu belirtmişlerdir.

Ueki et al. (2017), BTD uygulanmış topraklardan izole edilen *Clostridium beijerinckii* H110 ve TB8 izolatlarının *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae* üzerindeki etkilerini anaerobik koşullarda araştırmışlardır. H110 ve TB8 izolatları sırasıyla daha önce buğday kepeği ve *B. juncea* kullanılarak BTD uygulanmış topraklardan elde edilmiştir. Hazırlanan patojen süspansiyonu PY veya glukoz içeren PYG sıvı besi ortamına aktarılmış ve hemen ardından 24 saatlik H110 veya TB8 kültürü aynı ortama eklenerek 30 °C'de anaerobik koşullarda birlikte inkübe edilmiştir. Yalnızca patojen içeren ortamlar kontrol olarak kullanılmıştır. On sekiz günlük inkübasyon sonunda H110 bulunan ortamlarda canlı patojen saptanmazken, TB8 ile birlikte inkübe edilen ortamlarda patojen canlılığı çok düşük düzeye inmiştir. H110 ile yürütülen zaman serisi denemesinde patojen yoğunluğu 3. günde başlangıç düzeyinin %0.57'sine düşmüş ve 14. günde canlı patojen belirlenmemiştir. Patojenin miselle kaplı PDA parçalarının H110 veya TB8 ile ayrı olarak birlikte inkübe edildiği denemelerde yapılan mikroskobik incelemelerde de patojen hiflerinde belirgin yapısal bozulmalar gözlenmiştir. Ayrıca H110 ve TB8 izolatlarının kitosan ile β-1,3-glukanları parçalayabildiği ve doğrudan patojenden hazırlanan hücre duvarı materyalini de bozabildiği belirlenmiştir. Araştırmacılar, bu anaerobik bakterilerin fungus hücre duvarını bozma özelliklerinin BTD sırasında *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae*'nin baskılanmasına katkıda bulunabileceğini belirtmişlerdir.

Diakaki et al. (2022), farklı bitki–patojen sistemlerinde tohum mikrobiyomunun hastalık baskılayıcı rolünü geniş kapsamlı bir tarama çalışmasıyla değerlendirmişlerdir. Tohum mikrobiyotasının etkisini belirlemek amacıyla, tohumların bir kısmına vakum altında buharla dezenfeksiyon uygulanarak mikrobiyota kısmen azaltılmış ve bu tohumlar doğal mikrobiyotası

korunmuş tohumlarla karşılaştırılmıştır. Ispanakta *P. ultimum* ile yürütülen denemelerde, dezenfeksiyonun çimlenmeyi etkilemediği 28 tohum partisinin 23'ünde, doğal tohum mikrobiyotasının korunduğu dezenfekte edilmemiş tohumların çıkış öncesi çökertene karşı daha düşük duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. Buna karşılık, *F. oxysporum* f. sp. spinaciae ile yürütülen denemelerde 28 tohum partisinin hiçbirinde doğal tohum mikrobiyotasının hastalık şiddetini azalttığını gösteren bir etki saptanmamıştır. Araştırmacılar, tohum mikrobiyomunun hastalık baskılayıcı etkisinin patosisteme bağlı olduğunu ve özellikle çimlenmenin erken döneminde enfeksiyon oluşturan patojenlere karşı daha belirgin olabileceğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar daha sonraki çalışmalarında (Diakaki et al., 2025), *G. ultimum* (= *P. ultimum*)'a karşı gözlenen baskılayıcı etkinliği daha ayrıntılı olarak incelemişlerdir. Önceki çalışmada değerlendirilen tohum partilerinden farklı hastalık baskılama düzeylerini temsil eden sekiz ıspanak tohumu partisi seçilmiştir. Hastalık baskılama potansiyelinin belirlenmesinde, doğal mikrobiyotası korunmuş ve vakum altında buhar uygulamasıyla mikrobiyotası kısmen azaltılmış tohumlar *G. ultimum* ile doğal olarak bulaşık tarla toprağına ekilmiş ve çökerten gelişimi değerlendirilmiştir. Yüksek baskılama potansiyeline sahip partilerde hastalık baskılanması %39–66 arasında değişirken, düşük baskılama potansiyeline sahip partilerde bu oran %4–11 düzeyinde kalmıştır. Tohum mikrobiyotasının incelenmesi, bakteri ve fungus topluluklarının tohum partilerine göre farklılık gösterdiğini ve bu toplulukların yapısındaki değişimin bir bölümünün hastalık baskılanmasıyla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle *Massilia* cinsi bakteriler ile *Vishniacozyma*, *Filobasidium* ve *Papiliotrema* cinslerine ait mayaların yüksek göreceli bolluğunun, hastalık baskılayıcı tohum mikrobiyomlarının önemli bir özelliği olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık, funguslardan *Neoascochyta* ve *Didymella* cinslerinin göreceli bolluğunun düşük baskılama gösteren tohum partilerinde daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Araştırmacılar, özellikle Massilia, Vishniacozyma, Filobasidium ve Papiliotrema'nın yüksek hastalık baskılama potansiyeline sahip tohum partilerinin, Neoascochyta'nın ise düşük hastalık baskılama potansiyeline sahip tohum partilerinin belirlenmesinde potansiyel gösterge olarak kullanılabileceğini ve yararlı tohum mikrobiyotasının korunmasının fide hastalıklarının sürdürülebilir yönetimine katkı sağlayabileceğini belirtmişlerdir.

Sonuç ve Öneriler

Bu derlemede, ıspanakta fungus ve oomisetlerin oluşturduğu hastalıkların yönetiminde kullanılan farklı biyolojik mücadele yaklaşımları değerlendirilmiştir. Literatürde yer alan çalışmalar; *Trichoderma* ve *Bacillus* türleri, endofitik bakteriler, patojen olmayan *Fusarium* izolatları, hipovirülent funguslar, mikroalgler ve doğal tohum mikrobiyotası gibi farklı biyolojik kaynakların çeşitli hastalık etmenlerine karşı hastalık gelişimini, bazı çalışmalarda ise patojen popülasyonunu azaltabildiğini göstermektedir. Özellikle *Trichoderma* ve *Bacillus* türlerinin antagonistik etkinliklerinin yanı sıra bitki gelişimini destekleyebilmeleri, bu mikroorganizmaların sürdürülebilir hastalık yönetimi açısından önemli adaylar olduğunu ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, biyolojik mücadele etkinliğinin tür ve izolata, uygulama yöntemine ve zamanına, antagonist/patojen oranına, toprak özelliklerine ve çevresel koşullara bağlı olarak önemli ölçüde değişebildiği görülmektedir.

Mevcut çalışmalar biyolojik mücadelenin ıspanakta hastalık yönetimi açısından önemli bir potansiyel taşıdığını ortaya koymakla birlikte, çalışmaların önemli bir bölümünün laboratuvar ve kontrollü sera koşullarında yürütülmüş olması, sonuçların farklı çevre ve yetiştirme koşullarına aktarılabilirliğini sınırlamaktadır. Bu nedenle, başarılı bulunan biyolojik mücadele etmenlerinin farklı ıspanak genotipleri ve çevre koşullarında uzun süreli tarla denemeleriyle doğrulanması; etki mekanizmalarının moleküler ve biyokimyasal

düzeyde aydınlatılması ve uygun formülasyonların geliştirilmesi önem taşımaktadır. Bunun yanında, farklı biyolojik mücadele etmenlerinin birlikte kullanımının ve fungisitlerle uyumluluklarının araştırılması, bu uygulamaların entegre hastalık yönetimindeki yerini güçlendirebilir. Özellikle ıspanak tohum ve kök mikrobiyotasının hastalık baskılanmasındaki rolünün ileri moleküler yöntemlerle daha ayrıntılı incelenmesi, doğal olarak hastalık baskılayıcı mikrobiyal toplulukların belirlenmesine ve yeni biyolojik mücadele adaylarının geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Böylece biyolojik mücadele, tek başına bir alternatif olmaktan ziyade, ıspanakta sürdürülebilir ve entegre hastalık yönetiminin etkili bir bileşeni haline getirilebilir.

Kaynakça

Bergman, M., Varshavsky, L., Gottlieb, H. E., & Grossman, S. (2001). The antioxidant activity of aqueous spinach extract: Chemical identification of active fractions. Phytochemistry, 58(1), 143–152. https://doi.org/10.1016/s0031-9422(01)00137-6

Bhale, U. N., Ambuse, M. G., Chatage, V. S., & Rajkonda, J. N. (2012). Bioefficacy of *Trichoderma* isolates against pathogenic fungi inciting spinach (*Spinacea oleracea* L.*). Journal of Biopesticides, 5*(2), 222–227. https://doi.org/10.57182/jbiopestic.5.2.222-227

Bhujbal, V. B., Suryawanshi, A. P., Somwanshi, S. D., & Nikam, P. S. (2016). Bioefficacy of bioagents and botanicals against *Colletotrichum dematium* causing anthracnose of spinach. *Indian Phytopathology, 69*(4S), 525–528.

Bunea, A., Andjelkovic, M., Socaciu, C., Bobis, O., Neacsu, M., Verhé, R., & Van Camp, J. (2008). Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Food Chemistry, 108*(2), 649–656. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.056

Cao, G., Russell, R. M., Lischner, N., & Prior, R. L. (1998). Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *The Journal of Nutrition, 128*(12), 2383–2390. https://doi.org/10.1093/jn/128.12.2383

Cho, M. J., Howard, L. R., Prior, R. L., & Morelock, T. (2008). Flavonoid content and antioxidant capacity of spinach genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 88*(6), 1099–1106. https://doi.org/10.1002/jsfa.3206

Chu, Y. F., Sun, J. I. E., Wu, X., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*(23), 6910–6916. https://doi.org/10.1021/jf020665f

Chun, O. K., Kim, D. O., Smith, N., Schroeder, D., Han, J. T., & Lee, C. Y. (2005). Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 85*(10), 1715–1724. https://doi.org/10.1002/jsfa.2176

Correll, J. C., Morelock, T. E., Black, M. C., Koike, S. T., Brandenberger, L. P., & Dainello, F. J. (1994). Economically important diseases of spinach. *Plant Disease, 78*, 653–660. https://doi.org/10.1094/PD-78-0653

Cummings, J. A., Miles, C. A., & du Toit, L. J. (2009). Greenhouse evaluation of seed and drench treatments for organic management of soilborne pathogens of spinach. *Plant Disease, 93*(12), 1281–1292. https://doi.org/10.1094/PDIS-93-12-1281

Czajka, A., Czubatka, A., Sobolewski, J., & Robak, J. (2015). First report of Alternaria leaf spot caused by *Alternaria alternata* on spinach in Poland. *Plant Disease, 99*(5), 729. https://doi.org/10.1094/PDIS-10-14-1090-PDN

Diakaki, M., Andreo Jimenez, B., de Lange, E., Butterbach, P., van Der Heijden, L., Köhl, J., de Boer, W., & Postma, J. (2025). Spinach seed microbiome characteristics linked to suppressiveness against *Globisporangium ultimum* damping-off. *FEMS Microbiology Ecology, 101*(2), fiaf004. https://doi.org/10.1093/femsec/fiaf004

Diakaki, M., Van Der Heijden, L., Lopez-Reyes, J. G., Van Nieuwenhoven, A., Notten, M., Storcken, M., Butterbach, P., Köhl, J., de Boer, W., & Postma, J. (2022). Beetroot and spinach seed microbiomes can suppress *Pythium ultimum* infection: results from

a large-scale screening. *Seed Science Research, 32*(4), 274–282. https://doi.org/10.1017/S0960258522000186

du Toit, L. J., Derie, M. L., & Hernandez-Perez, P. (2005). Verticillium wilt in spinach seed production. *Plant Disease, 89*, 4–8. https://doi.org/10.1094/PD-89-0004

Food and Agriculture Organization (2024). FAO statistical databases. Erişim adresi http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC. Erişim tarihi: Ağustos 2026.

Gilardi, G., Matic, S., Gullino, M. L., & Garibaldi, A. (2019). First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot on spinach (*Spinacia oleracea*) in Italy. *Plant Disease, 103*(8), 2133. https://doi.org/10.1094/PDIS-01-19-0086-PDN

Goode, M. J., Fulton, J. P., & Scott, H. A. (1968). Fusarium decline: A new disease of spinach in Arkansas. *Arkansas Farm Research, 17*(2), 16.

Horinouchi, H., Muslim, A., & Hyakumachi, M. (2010). Biocontrol of Fusarium wilt of spinach by the plant growth promoting fungus *Fusarium equiseti* GF183. *Journal of Plant Pathology, 92* (1), 249–254. https://doi.org/10.4454/jpp.v92i1.39

Howard, L. R., Pandjaitan, N., Morelock, T., & Gil, M. I. (2002). Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and growing season. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*(21), 5891–5896. https://doi.org/10.1021/jf020507o

Ihsan, N., Usman, M., Ehetisham-Ul-Haq, M., Abbas, H., & Abbas, A. (2025). Integrated biological control of Alternaria leaf spot in spinach through *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* mediated disease suppression and growth promotion. *Integrative Plant Biotechnology, 3*(4), 395–401. https://doi.org/10.55627/pbiotech.003.04.1763

Jangid, A., Shringi, A., Chakma, M., Srivastava, S., & Rana, M. (2025). Evaluation of biocontrol agents and fungicides against Alternaria leaf spot of spinach. *Agricultural Science Digest, 45*(2), 312–316. https://doi.org/10.18805/ag.D-5657.

Katsube, K., Akasaka, Y., & Nakatani, F. (1994). Biocontrol of Fusarium wilt of spinach by using nonpathogenic Fusarium oxysporum. 2. Investigation of inoculation methods. *Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan. 45*, 72–75.

Koh, E., Charoenprasert, S., & Mitchell, A. E. (2012). Effect of organic and conventional cropping systems on ascorbic acid, vitamin C, flavonoids, nitrate, and oxalate in 27 varieties of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60*(12), 3144–3150. https://doi.org/10.1021/jf300051f

Magnée, K. J. H., Postma, J., Groot, S. P. C., Gort, G., Lammerts van Bueren, E. T., & Scholten, O. E. (2022). Evaluation of damping-off tolerance in spinach cultivars in field soils and in a standardized lab assay with *Pythium ultimum*. *Plant Health Progress, 23*(2), 174–187. https://doi.org/10.1094/PHP-07-21-0107-RS

Maruthachalam, K., Klosterman, S. J., Anchieta, A., Mou, B., & Subbarao, K. V. (2013). Colonization of spinach by *Verticillium dahliae* and effects of pathogen localization on the efficacy of seed treatments. *Phytopathology*, *103*(3), 268–280. https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-12-0104-R

Mattila, P., & Hellström, J. (2007). Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis, 20*(3-4), 152–160. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.05.007

Morelock, T. E., & Correll, J. C. (2008). Spinach. In J. Prohens & F. Nuez (Eds.), Vegetables I: Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodicaceae, and Cucurbitaceae (pp. 189–218). Springer.

Mowlick, S., Inoue, T., Takehara, T., Tonouchi, A., Kaku, N., Ueki, K., & Ueki, A. (2014). Usefulness of Japanese-radish residue in biological soil disinfestation to suppress spinach wilt disease accompanying with proliferation of soil bacteria in the Firmicutes. *Crop Protection, 61*, 64–73. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.03.010

Muslim, A., Horinouchi, H., & Hyakumachi, M. (2003). Suppression of Fusarium wilt of spinach with hypovirulent binucleate Rhizoctonia. *Journal of General Plant Pathology, 69*(2), 143–150. https://doi.org/10.1007/s10327-002-0024-9

Noonan, S. C., & Savage, G. P. (1999). Oxalate content of foods and its effect on humans. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 8*(1), 64–74. https://doi.org/10.1046/j.1440-6047.1999.00038.x

Olesen, M. H., Deleuran, L. C., Gislum, R., & Boelt, B. (2014). Preventing an increase in Verticillium wilt incidence in spinach seed production. *Crop Protection, 66*, 107–113. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.09.005

Pandjaitan, N., Howard, L. R., Morelock, T., & Gil, M. I. (2005). Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*(22), 8618–8623. https://doi.org/10.1021/jf052077i

Porrini, M., Riso, P., & Oriani, G. (2002). Spinach and tomato consumption increases lymphocyte DNA resistance to oxidative stress but this is not related to cell carotenoid concentrations. *European Journal of Nutrition, 41*(3), 95–100. https://doi.org/10.1007/s003940200014

Roberts, J. L., & Moreau, R. (2016). Functional properties of spinach (*Spinacia oleracea* L.) phytochemicals and bioactives. *Food and Function, 7*(8), 3337–3353. https://doi.org/10.1039/c6fo00051g

Santamaria, P. (2006). Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 86*(1), 10–17. https://doi.org/10.1002/jsfa.2351

Shin, D. B., & Takehara, T. (1998). Biological control of Fusarium wilt of spinach by nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. *Korean Journal of Plant Pathology (Korea Republic), 14*(2), 145–149.

Sugiyama, T., Natsuaki, K. T., Tanaka, N., Shiwa, Y., & Irie, M. (2022). Antagonism of *Bacillus velezensis* isolate from anaerobically digested dairy slurry against Fusarium wilt of spinach. *Agronomy, 12*(5), 1058. https://doi.org/10.3390/agronomy12051058.

Sumner, D. R., Kays, S. J., & Johnson, A. W. (1976). Etiology and control of root diseases of spinach. *Phytopathology, 66*, 1267–1273. https://doi.org/10.1094/Phyto-66-1267

Tsuda, K., Kosaka, Y., & Horino, O. (2001a). Effects of indole-3-acetic acid production in the endophyte *Enterobacter cloacae* SM10 on biological control against fusarium wilt of spinach. *Journal of the Japanese Society of Agricultural Technology Management, 8*(2), 23–28.

Tsuda, K., Kosaka, Y., Tsuge, S., Kubo, Y., & Horino, O. (2001b). Evaluation of the endophyte *Enterobacter cloacae* SM10 isolated from spinach roots for biological control against Fusarium wilt of spinach. *Journal of General Plant Pathology, 67*(1), 78–84. https://doi.org/10.1007/PL00012993

Türkiye İstatistik Kurumu (2025). TÜİK İstatistik Veri Tabanı. https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr. Erişim tarihi: Ağustos, 2026.

Ueki, A., Takehara, T., Ishioka, G., Kaku, N., & Ueki, K. (2017). Degradation of the fungal cell wall by clostridial strains isolated

from soil subjected to biological soil disinfestation and biocontrol of Fusarium wilt disease of spinach. *Applied Microbiology and Biotechnology, 101*(22), 8267–8277. https://doi.org/10.1007/s00253-017-8543-7

Van der Vossen, H. A. M. (2004). *Spinacia oleracea*. In G. J. H. Grubben & O. A. Denton (Eds.), Plant resources of tropical Africa 2: Vegetables (pp. 513–515). Backhuys Publishers.

Viana, C., Genevace, M., Gama, F., Coelho, L., Pereira, H., Varela, J., & Reis, M. (2024). *Chlorella vulgaris* and *Tetradesmus obliquus* protect spinach (*Spinacia oleracea* L.) against *Fusarium oxysporum. Plants, 13*(12), 1697. https://doi.org/10.3390/plants13121697

Washington, W. S., Irvine, G., Aldaoud, R., De Alwis, S., Edwards, J., & Pascoe, I. G. (2006). First record of anthracnose of spinach caused by *Colletotrichum dematium* in Australia. *Australasian Plant Pathology, 35*, 89–91. https://doi.org/10.1071/AP05095

Zhao, P., Quan, C., Wang, Y., Wang, J., & Fan, S. (2014). *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae. Journal of Basic Microbiology*, *54*(5), 448–456. https://doi.org/10.1002/jobm.201200414

BÖLÜM 2

CRISPR-Cas13a SİSTEMİYLE BİTKİ VİRÜS HASTALIKLARININ TEŞHİS POTANSİYELİ

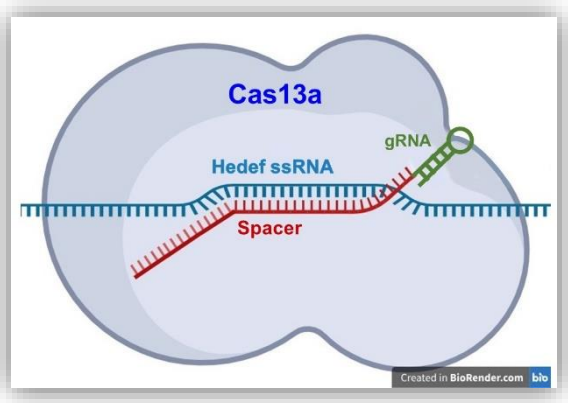
BERNA BAŞ[1]

Giriş

Kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar dizisi olan CRISPR ve Cas proteinleri yabancı nükleik asitlere ve viral infeksiyonlara karşı prokaryotik organizmaları koruyan ve indüksiyonla harekete geçebilen bir bağışıklık sistem mekanizmasıdır (Barrangou, 2015). Her biri farklı fonksiyon ve yapısal özelliklere sahip olan bütün CRISPR-Cas sistemleri CRISPR crRNA 'larına bağlı olarak işlev yapmaktadırlar (Brouns & ark., 2008). crRNA 'lar bir navigasyon sistemi gibi çalışmakta ve Cas proteinlerine rehberlik etmektedirler. Yabancı nükleik asitler üzerindeki tam hedef bölgenin sekans dizilerinin tamamlayıcısı olan crRNA ile yabancı RNA bağlandıktan sonra Cas proteini belirlenen bu rotaya bağlanmaktadır (Şekil 1). Böylece Cas proteinlerinin nükleaz aktivitesiyle yabancı nükleik asitler parçalanmaktadır.

[1] Doktor Öğretim Üyesi, Gaziantep Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Orcid: 0000-0003-2455-2849

Şekil 1. CRISPR Cas13a 'nın modüler şeması



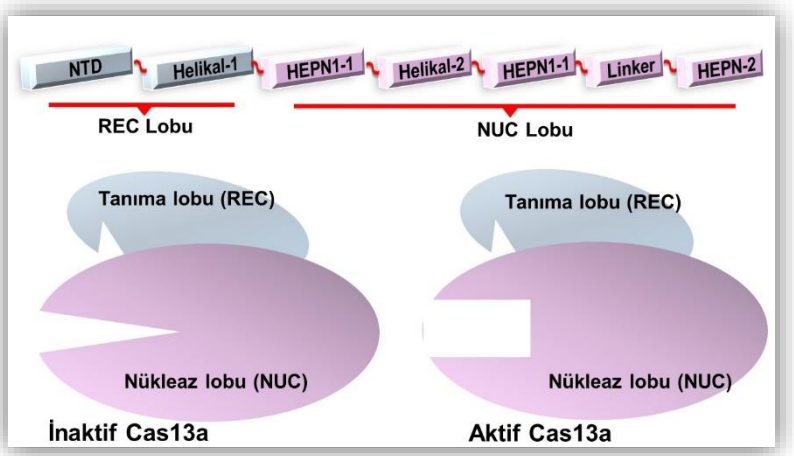
Kaynak: Şekil yazar tarafından BioRender programı kullanılarak yaratılmıştır

CRISPR Cas13a sistemi ribonükleaz aktivitesine sahip iki adet HEPN (higher eukaryotic and prokaryotic nucleotide-binding) domain bölgeye sahip olan lob ile Rec lob olarak bilinen programlanabilen bir crRNA segmentinden ibaret olup tek parça şeklinde bir bileşik bütündür (Abudayyeh & ark., 2016), (Şekil 2).

Canlı hücrelerin hayati fonksiyonlarını etkilemeden RNA düzeyinde gen transkriptlerinin ifadesini azaltarak veya artırarak hücresel faaliyetleri düzenleyici roller oynayan CRISPR-Cas13a gen fonksiyonlarının analizinde önemli bir yaklaşım geliştirilmesine öncülük etmiştir. Çeşitli deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, Cas13a ribonükleazın katalitik bölgesi hedef üzerindeki ssRNA (single-strand RNA) 'ya bağlandıktan sonra hedefi tamamen parçalamakta ve ardından yakın çevredeki hedef dışında kalan çeşitli mRNA 'larda parçalanmaktadır (Liu & ark., 2017). İşte özgül olmayan bu RNAz aktivite özelliği viral teşhis analizlerinde raportör moleküllerin geliştirilmesini sağlamıştır.

Cas13a proteini, hedef RNA ’nın 3′ PFS (protospacer flanking sequence) bölgesi içinde guanin dışındaki diğer nükleotitlerle substratı tanıma özelliğine sahiptir (Liu & ark., 2017). Ancak Cas13a ’nın hedef dışı diğer RNA ’ları parçalama özelliği hücrenin hayati öneme sahip diğer mRNA ’ları da etkileyebileceği için bu durum istenmeyen komplikasyonların gelişmesine de neden olabilme ihtimali taşımaktadır. RNA transkriptlerinin ifade seviyelerini düzenlemek amacıyla çalışma yapılacaksa Cas13a sisteminin crRNA molekülleri hairpin-spacer bölgeleri eklenecek şekilde tasarlanmalıdır ki böylece crRNA ’nın oluşturacağı saç tokası şeklindeki ilmek yapı sayesinde Cas13a ile hedef dışı diğer RNA ’ların bağlanma ilgisi önlenebilir (Ke & ark., 2021).

Şekil 2. Cas13a iki alt birimden meydana gelmiştir



Kaynak: Şekil yazar tarafından oluşturulmuştur

Tarımsal ürünlerde önemli ekonomik kayıplara neden olan virüslerin biyolojisiyle ilgili önemli ilerlemeler kaydedilse de bitki – virüs dinamiklerinin değişken doğası nedeniyle kalıcı olarak

uygulanabilir bir mücadelenin geliştirilmesi hem çiftçileri hem de araştırıcıları zorlamaktadır (Alexander & ark., 2014). Bakteri, fungus, nematod gibi organizmaların mücadelesinde kimyasal yaklaşımlar geçici veya kalıcı olarak hastalığı kontrol altına alabilmektedir. Ancak kimyasallar viral hastalıkların kontrolünde etkisiz olup virüsle infekteli bitkilerin yerinde eradikasyonu en sağlıklı virüsle mücadele yöntemidir. Virüsle-bulaşık üretim materyalleriyle ve aracı vektörlerle mekanik olarak yayılan virüslerin çeşitli önleyici tedbirlerle yayılması engellenebilir (Tatineni & Hein, 2023). Önleyici tedbirleri hızla uygulamak için yüksek derecede duyarlı ve özgül teşhis metotlarına ihtiyaç vardır. Teknolojik inovasyonlar yeni viral teşhis yöntemlerinin de gelişmesine katkı sağlamıştır. Uzun yıllardan beri kullanılan klasik virüs tanı yöntemleri genellikle semptomlara dayalı teşhis, konukçu dizi araştırmaları, elektron mikroskop çalışmaları, ELİSA ve Western blotting gibi serolojik testler, PCR, RT-PCR gibi nükleik asitlere dayalı tekniklerden ibaret olup bunlar pahalı ve sonuçlandırılması uzun zaman almakta, deneyim gerektirmekte, düşük yoğunluktaki virüsleri teşhis edememekte, yeni ortaya çıkan varyantların teşhisine uygun çalışmamaktadırlar (Singh & ark., 2025). Bazen bir konukçu bitki farklı virüs türleri veya ırklarıyla infekte edilebilmektedir. Bu durumda aynı bitki içindeki farklı virüslerin aynı anda teşhisi, tanı yöntemlerinin kullanımını zorlaştırmaktadır. Bitki RNA virüslerinin hiper değişken bölgeleri ve yüksek mutasyon olasılıklarının genetik varyasyona neden olması teşhis çalışmalarını karmaşık hale getirmektedir (Massart & ark., 2019; Bwalya & Kim, 2023). Bu nedenlerden dolayı çeşitli virüsleri teşhis edebilecek ileri tanı-teşhis yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. CRISPR-Cas sistemi mikroorganizmaların tanı-teşhis yöntemleri içindeki en önemli teknolojik yeniliklerden birisidir. Özellikle bitki RNA virüslerinin hızlı ve duyarlı tanısında alternatif sunan CRISPR yaklaşımı, Cas13a proteinlerinin viral RNA genom içindeki özel nükleik asit baz dizilerinin tamamlayıcısı

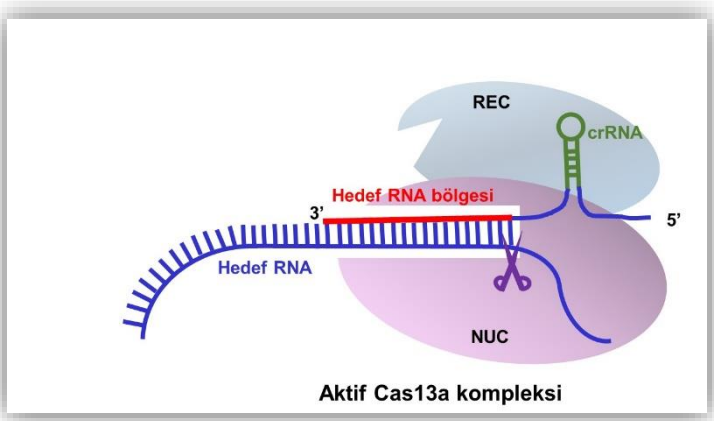
crRNA ile çalışmaktadır. Cas13 ile standart metot geliştirmek yaklaşık bir haftada %99 'dan daha yüksek bir özgüllükle ve %95 'den daha yüksek bir duyarlılıkla sonuca ulaşmak mümkün görünmektedir (Zhang & ark., 2021). Ele alınan bu bölümde CRISPR-Cas13a 'nın yapısal özellikleri, işlevleri ve tarımda viral patojenlerin teşhis potansiyeliyle ilgili yapılan bazı uygulamalar kısaca tanıtılmaya çalışılmıştır.

CRISPR-Cas13a Siteminin Yapısal ve Fonksiyonel Özellikleri

Cas protein efektörlerinin özelliklerine göre CRISPR sistemleri iki ana sınıfa ayrılmaktadır (Koonin & Makarova, 2019). Birinci sınıfta yer alan Cas proteinleri son derece karmaşık, farklı proteinlerle birçok alt ünitelerden meydana gelmiştir ve crRNA ile hedef sekans interaksiyona girince konformasyonel değişim geçirerek enzimatik özellik kazanmaktadırlar (Pattharaprachayakul & ark., 2020). İkinci sınıfta yer alan enzim proteinleri ise tek bir protein ünitesinden ibaret olup bağımsız birçok domain alanına sahip olup daha basit yapılı ve daha fazla çeşitliliğe sahiptir (Murugan & ark., 2017). Bu özelliklerinden dolayı da teşhislerde ve gen ifade düzeylerinin modülasyonunda geniş bir uygulama alanı bulmuştur (Murugan & ark., 2017). En güncel evrimsel sınıflandırma çalışmalarına göre Cas9, Cas12, Cas13 gibi farklı çeşitleri bulunan ikinci sınıf Cas proteinlerinin her bir alt grubunun farklı fonksiyonel özellikleri bulunmaktadır (Makarova & ark., 2025). Cas13 efektörleri yalnıza ssRNA (single strand RNA) üzerinde etki göstermekte ve tek bir uyumsuz nükleotit polimorfizmini tanıyabilecek düzeyde güçlü bir RNA teşhis yöntemi olarak kullanılmaktadır (Larsen & ark., 2025), (Şekil 3). Cas13a sistemi ilk olarak Leptotrichia cinsi bakterilerde keşfedilmiştir (Shmakov & ark., 2015). Bütün CRISPR alt grupları içinde kollateral kesim aktivitesine sahip olan grup Cas12 ve Cas13 enzimleridir. Cas13 enzim proteini üzerinde bulunan HEPN domain bölge yardımıyla RNA üzerindeki hedef bölgelerde enzimatik parçalama (cis-kesim

aktivitesi) gerçekleştikten sonra bu molekülleri terk etmeden önce hedef dışı özgül olmayan diğer ilgisiz RNA sekansları üzerinde de kesim yapabilmektedir ki bu aktivite kollateral kesim veya trans-kesim aktivitesi olarak isimlendirilmektedir (Ali & ark., 2020; Granados-Riveron & Aquino-Jarquin, 2021; Tripathi, Ntui & Tripathi, 2021; Bot & ark., 2022). Bu yegane kollateral aktivite özelliklerinden dolayı nükleik asitlere dayalı teşhislerde değerlendirilmek üzere Cas12 sistemi DNA 'ya dayalı teşhisler için Cas13 ise RNA 'ya dayalı mikrobiyel teşhisler için hızla ele alınmaya başlamıştır (Li & ark., 2019).

Şekil 3. Aktif bir Cas13a crRNA 'sı ssRNA üzerinde işlem yapmaktadır. Rec bölgesi RNA substratını tanıma bölgesidir, NUC ise ribonükleaz aktivitesini gerçekleştirmektedir



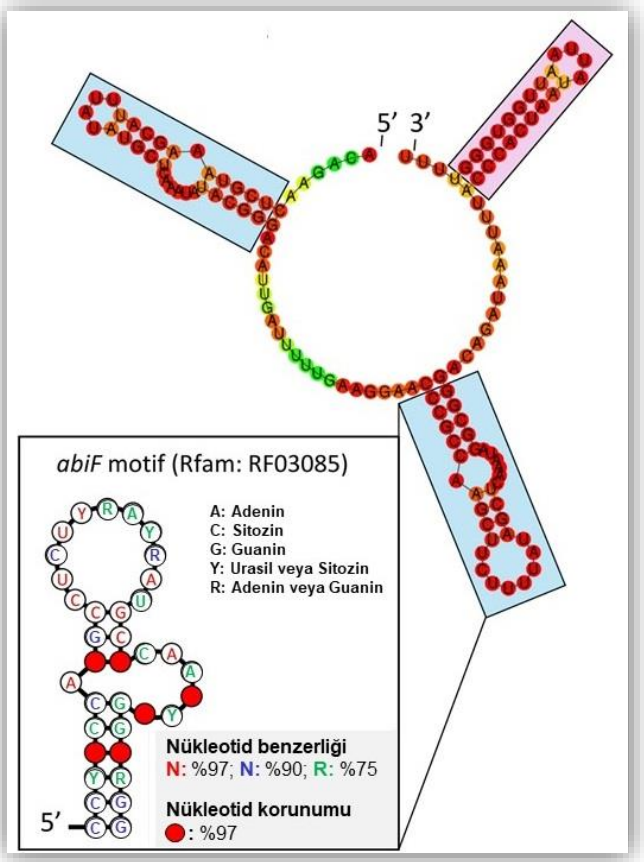
Kaynak: Şekil yazar tarafından oluşturulmuştur

Önemli fonksiyonel özelliklere sahip olan HEPN domain bölge enzim proteinleri üzerinde yer alan evrimsel olarak korunmuş bir bölgedir ve çeşitli RNA moleküllerinin parçalanma süreçlerinin

yönlendirilmesinde rol oynayan endoribonükleazların evrensel bir özelliğidir (Pillon & ark., 2021). HEPN dimerleşmesi RNAz aktivitesi için gereklidir ancak dimerleşmenin organizasyon şekli önemli yapısal farklılıklar gösterdiği için çeşitli özel fonksiyonların ortaya çıkışına neden olmaktadır (Pillon & ark., 2021). Cas13 grubu proteinler AbiFs kladistik grubu proteinlerle evrimsel olarak yakın bağlantılıdır ve bütün Cas13 proteinleri hedef RNA dışında işlevsel olan kollateral aktivitesini atasal köklerinden gelen AbiFs 'den almaktadır (Zilberzwige-Tal & ark., 2025). Non-coding RNA sınıfında yer alan bakteriyel AbiF RNA motifi korunmuş olup sRNA olarak ve antitoksin olarak işlev yapmakta ve HEPN-benzeri domain üst ailesinin üyesi olan toksik AbiF proteinini nötralize etmekte, bakteriyostatik engeli kaldırmakta ve hücre homeostazını korumaktadır (Weinberg & ark., 2017; Saunier & ark., 2025). Şekil 4 'de görüldüğü gibi yapısı sRNA 'ya benzeyen AbiF RNA motifinde bulunan ilmek yapı, eşleşmeyen baz bölgeleri gibi korumalı olmayan bölgelerde sekans varyasyonları göstermekte olup bu kor gövde-ilmek yapı molekülün abortif infeksiyon sistemlerinde görev yapması için önemli ve gereklidir (Zilberzwige-Tal & ark., 2025). İlmek yapı içindeki bu varyasyonlar baz eşleşme stabilitesini bozmadan ilgili bölgelere esneklik sağlamaktadır ve pürinlerin veya primidinlerin baskın olduğu yerlerde ikame mutasyonları (base substitution) meydana gelmektedir (Weinberg & ark., 2017). Kor gövde yapısının nükleotitleri %90 'dan daha yüksek oranda korunmuştur (Weinberg & ark., 2017). Kor gövde nükleotitlerinde herhangi bir mutasyon geliştiği zaman örneğin G-S eşleşmesinde gerçekleşen mutasyonda yapıya A veya U yerleşmişse hücre A-U eşleşmesini sağlayacak şekilde bu mutasyonu düzeltmekte ve böylece yapısal bütünlük korunarak bir tek baz polimorfizmi telafi edilmektedir (Weinberg & ark., 2017). Böylece mutasyona rağmen AbiF RNA 'nın kor gövde helikal yapısının stabilitesi için baz eşleşmesi korunurken ilmek yapının baz eşleşmesi de etkilenmemektedir. HEPN proteinleri evrimsel olarak korunmuş

olan Rx4–6H katalitik motife sahiptir ve Cas13a 'nın cis-RNAz ve trans-RNAz aktivitesinden Rx4–6H bölgesi sorumludur (Yang & Patel, 2024).

Şekil 4. Cas13a crRNA 'sı AbiF motifine benzerdir. Motifin iki önemli yapısı 1)kor ilmek yapı baz eşleşmesi olmayan bölge ve 2)gövde yapısı karşılıklı eşleşen tamamlayıcı bazlardan ibarettir



Kaynak: Saunier & ark., (2025) 'den alınmıştır

HEPN domainlerindeki Rx4–6H bölgesinin konformasyonel elastikiyeti çeşitli substratlara bağlanmasının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Anantharaman & ark., 2013; Jia & ark., 2018; Shi & Wu, 2024; Yang & Patel, 2024). Böylece Cas13a hedefi parçaladıktan sonra yakın çevredeki ilgisiz hedef dışı diğer RNA substratlarına uygun bağlanma gerçekleşecek şekilde konformasyonel değişim geçirerek kollateral kesim gerçekleştirmektedir. Birçok farklı HEPN proteinlerinin domainleri evrimsel yönden korunan iki farklı elemente sahip olup, bunlardan biri Rx4–6H motifi, diğeri ise Ex3 [KR] 'dır. Rx4–6H motifini dikkate almaksızın HEPN ailesinin birçok üyelerinde, Ex3 [KR] motifine ait evrimsel olarak korunan diğer bir asidik amino asit bulunmakta olup bu iki öğenin dışında diğer HEPN ailesi üyelerinin birçoğunun HEPN domain sekanslarının evrimsel benzerliği uzaktır (Anantharaman & ark., 2013).

Çeşitli Bitkilerde Cas13a ile Yapılan Viral Tanı-Teşhis Çalışmaları

Bakteriyel CRISPR-Cas mekanizması keşfedildiğinden beri gelişen teknolojilerle beraber diğer eukaryotik organizmaların genom düzenlenmesi ve patojenlerin teşhisi için moleküler biyolojik yöntemlere dayalı uygulama alanları araştırılmaya başlanmıştır. CRISPR-Cas metodolojisiyle oldukça hızlı ve duyarlı bir şekilde patojen mikroorganizmaların teşhisi yapılabilmektedir (Aman, Mahas & Mahfouz, 2020). CRISPR-Cas proteinlerinden Cas13a sisteminin RNA-yönelimli RNA-hedefli nükleaz enzimi son derece duyarlı bir şekilde RNA hedeflerini belirleme ve parçalama özelliğine sahip olan güçlü bir tekniktir (Abudayyeh & ark., 2017). Son derece duyarlı, özgül, kolaylıkla yönlendirilebilen, portatif ve nispeten uygun bedelli olan Cas13a 'nın bu kapasitesi sayesinde RNA 'ya dayalı teşhis çalışmaları geliştirilmiştir. CRISPR crRNA 'larının üzerindeki nükleik asit şifreleri Cas proteinlerini hedef bölgenin komplementeri olan bölgelere yönlendirmekte ve crRNA-

hedef RNA interaksiyonu sağlandıktan sonra herhangi ilgisiz bir RNA molekülü üzerinde Cas13a kompleksinin kollateral kesim aktivitesi teşvik edilmekte olup böylece bu ilgisiz moleküller raportör amaçlı kullanılmaktadır (Gootenberg & ark., 2017; Kellner & ark., 2019). Teşhisin başarısındaki kritik konu ise crRNA (veya gRNA) 'nın tasarımıdır. gRNA tasarımında hedef bölge dışında bağlanmaları minimuma indirmek için bilgisayar temelli otomasyon sistemlerinin geliştirilmesi gereklidir. Teşhis amaçlı CRISPR-Cas13a için oluşturulacak gRNA 'nın etkin çalışması için gen bankalarının veri tabanlarından viral organizmanın sekans dizilerinin elde edilmesi, çeşitli benzer sekans dizilerinin karşılaştırılması ve konsensüs dizilerinin oluşturulması, homopolimer dizileri ve yapısal özelliklerinin belirlenmesi, GS içeriğine göre potansiyel gRNA 'ların ortaya çıkarılması, viral ırklar arasında yüksek derecede korunmuş bölgeleri belirlemek ve konukçu genomunda özgül olmayan bağlantı bölgelerini minimuma indirmek için hedef dışı tarama analizlerinin yapılması hata eğilimini azaltacaktır (Leski & ark., 2023; Asmamaw & ark., 2024; Molina Vargas & ark., 2024; Niu & ark., 2025; Tan & ark., 2025; Villegas & ark., 2025). Bu zorlukları aşmak amacıyla yapılan bir araştırmada son derece virülent bir patojen olan ve domates verimini etkileyen domates kahverengi buruşuk meyve virüsü (ToBRFV) 'nün Cas13a ile teşhisinde kullanılmak üzere yapay zeka destekli crRNA tasarlanmıştır (Karimi & ark., 2025). Bilgisayar destekli bu ön çalışma da dizi değişkenliğinin en az olduğu korumalı bölge sekanslarından crRNA oluşturmak için NCBI nükleotit veri tabanından viral sekanslar ile ToBRFV sekansları karşılaştırılmış ve algoritmik hizalamada en çok eşleşen nükleotitlerden konsensüs diziler elde edilmiştir. ToBRFV viral genomun korumalı bölgelerinin diğer viral genom eşleştirmelerine göre benzerliğin %70 'in altında olan bölgeler hariç tutulmuştur. Sekans stabilitesi için N (N; bilinmeyen, tanımlanamayan) ile sembolize edilen baz dizilerini içeren sekanslarda elemine edilerek final konsensüs bazları

crRNA tasarımında referans olarak kullanılmak üzere selekte edilmiştir. Bilgisayar verilerine göre elde edilen bu referans sekanslar arasında GS içeriği %40 - %60 arasında olan diziler daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere bir kez daha selekte edilmişlerdir. gRNA 'nın GS içeriği önemlidir, çünkü AT baz eşleşmesine göre GS eşleşmesi termodinamik olarak daha stabildir ve Cas enziminin optimal aktivitesi, özgül ve hassas hibridizasyonu için gereklidir (Molina Vargas & ark., 2024; Vercauteren & ark., 2024; Okemo & Henry, 2026). Homopolimer dizi taraması yapılarak ardışık identik 4 veya daha fazla nükleotit içeren sekanslar (AAAA, SSSS gibi diziler) elenmiş ve viral teşhiste kullanılacak crRNA tasarımına esas teşkil edecek en hassas 11–18 nükleotit uzunluğundaki segmentler ana bölge olarak seçilmiştir. Bu bölgeler ayrıca hedef dışı analizlere tabi tutulmuşlardır. CRISPR kılavuz RNA tasarımında genel kabul gören standart ölçülere göre hedef dışı taramalarda üç 'e kadar uyumsuz eşleşme gösteren diziler seçilmiştir. Biyoinformatik verilere dayanarak son derece duyarlı ve verimli bir şekilde tasarlanan crRNA kullanılarak ToBRFV ile infekteli bitkilerden izole edilen ToBRFV-RNA 'sı başarılı bir şekilde teşhis edilmiştir. ELİSA testi, yakın akraba virüslerle teşhiste pozitif sonuçlar verirken CRISPR ile geliştirilen bu yeni sistemle ToBRFV yakın akraba virüslerle çapraz reaksiyon gelişmediği bildirilmiştir. Biyoinformatik veri destekli elde edilen bu sonuçlar göstermektedir ki, CRISPR-Cas13a diğer bitki RNA viral hastalıkların tanısında önemli bir kılavuz olarak kullanım olanağı sunmaktadır.

Diğer bir araştırmada çeşitli ticari seralarda yine ToBRFV virüsünün tanısı amacıyla bir protokol geliştirilmiştir (Hak & ark., 2025). Denemede domateste ToBRFV veya ToMV virüsleri, salatalıkta CGMMV virüsü, tütünde TMV ve kolzada TuMV virüsleri Cas13a ile başarılı bir şekilde teşhis edilmişlerdir. İlgili virüsler bitki fideciklerinin yapraklarına karborandum tozuyla

ovalanarak mekanik yolla veya agroinfiltrasyonla inokule edilmişlerdir. ToBRFV teşhisi için 3 ayrı ss-crRNA tasarlanmış ve bunlardan yalnızca TB-crRNA1 çok güçlü, TB-crRNA3 zayıf floresan ışık vermiş, TB-crRNA2 ise TMV ve/veya ToBRFV 'yi ayırt edici herhangi bir reaksiyon vermemiştir. Salatalıkta CGMMV için tasarlanan crRNA 'lar virüs tayininde etkili olurken, kolza TuMV için tasarlanan crRNA 'lar mükemmel bir duyarlılıkla teşhis edilmişlerdir. Başka bir çalışmada pamukta ürün kayıplarına neden olan CLRDV virüsünün Cas13a ile teşhis araştırması yapılmış ve araziden toplanan infekteli örneklerden elde edilen ham ekstraktlar RNA saflaştırması yapılmadan doğrudan kullanılmıştır (Sheri & ark. 2025). Teşhiste CLRDV 'nin evrimsel olarak korunan 3 farklı ORF bölgesi (ORF3, ORF2, ORF3a) seçilmiştir. Kontrol örnekler negatif sonuçlar verirken virüsün varlığını kanıtlayan her 3 ORF bölgesinden ise pozitif sonuçlar alınmıştır. Her 3 bölge için ayrı olarak tasarlanan crRNA 'lar hem tek olarak hem de karışım halinde kombine kullanıldığında yine pozitif sonuçlar elde edilmiş ve böylece kombine örneklerde çapraz reaksiyon gelişmediği belirlenmiştir.

Negatif yönlü bir RNA virüsü olan domates solgunluk benekli virüsü (TSWV) geniş bir konukçu dizisine sahiptir ve vektörü bir trips olan *Frankliniella occidentalis* ile yayılmakta olup Cas13a 'ya dayalı teşhis amaçlı bir deneysel araştırma yapılmıştır (Zhang & ark., 2021). Domates ekili arazilerden TSWV semptomu gösteren infekteli domates yaprakları ile semptom göstermeyen domates örnekleri ve infekteli domatesle beslenen *Frankliniella occidentalis* trips 'i toplanmış ve RNA analizleri yapılmıştır. Tipik semptom gösteren bütün örnekler, sağlıklı görünen semptomsuz bitki örneklerinin bazıları ve bazı vektör tripsler pozitif sonuç vermiştir. Sağlıklı görünen semptomsuz örneklerin pozitif reaksiyon vermesi inokulasyonun çok başlangıç aşamasında olduğu için henüz semptom gelişmediği rapor edilmiştir. Böylece infeksiyonun çok

erken aşamasında henüz semptomlar gelişmeden de Cas13a sistemiyle virüs teşhisinin mümkün olduğu gösterilmiştir. Kontrol amaçlı kullanılan TZSV, TMV, CMV ve PVY virüsleriyle çapraz reaksiyonlara karşı test edilmişler ve sonuç negatif çıkmıştır. Yine kontrol amaçlı RT-PCR denemelerinden de paralel sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca virüs titerini ölçmek amacıyla RNA 'ya kalıp olarak kullanılmak üzere DNA konsantrasyonu ölçülmüştür. Viral infeksiyon başlangıcında virüs yoğunluğu düşük olmasına rağmen PCR testinden 10 kat daha duyarlı ve daha az miktarla teşhis yapıldığı bildirilmiştir.

Programlanabilir olması ve yüksek bir doğrulukla hedeflenen nükleik asitleri tanıma özelliği sayesinde biyobelirteç geliştirilmenin dışında Cas13a sistemi genetik mutasyonların ve epigenetik değişimlerin ortaya çıkarılmasında da uygulama olanakları sunmaktadır (Ali, Bhat & Shafique, 2026).

Sonuç Değerlendirme

Çeşitli araştırma denemelerinin sonuçları göstermiştir ki, CRISPR-Cas13a sistemi bitki RNA virüslerini hızlı ve duyarlı teşhis edebilmektedir. Hedefi yakalayabilecek crRNA sekans dizilerinin tasarımı, geliştirilmesi, stabilitesi testin başarısında en kritik konulardır. İnsan emeği ve insan eliyle crRNA tasarımının hem hata eğilimi yüksek olabilir, hem yoğun iş-gücü gerektirir ve dolaysıyla zaman kaybı yaratabilir. Bu nedenlerle özellikle belirlenen hedefe uygun crRNA 'ların türetilmesinde bilgisayar destekli biyoinformatik verilere dayalı sekonder yapı varsayımları, termodinamik stabilite, hedef dışı bölgelerin eleminasyonu gibi parametrelerin oluşturulması son derece özgül ve güvenilir bir teşhis platformu sunacaktır. PCR, ELISA testi gibi klasik yöntemlere nazaran Cas13a sistemi uygulama kolaylığı, hızı, tek bir nükleik asit polimorfizmini bile tespit edebilecek hassasiyeti ve daha uygun bedel ile üstün nitelikler sergilemektedir. RNA virüsleri dışında diğer

bitki DNA virüsleri, viroidler gibi organizmaları da içerecek şekilde geniş kapsamlı, ölçeklendirilebilecek özellikte olan ve bilinen tüm viral hastalık etmenlerinin de kolaylıkla teşhis edilebileceği bir düzenin oluşturulması beklentiler arasındadır.

HEPN domain bölgesinin evrimi, biyolojik fonksiyonları ve biyokimyasının evrensel özelliklerinin analizi crRNAz enziminin cis parçalama ve kollateral aktivitesinin nasıl geliştiğinin anlaşılması, RNA 'ya dayalı yeni uygulamaların geliştirilmesi ve Cas13a 'nın uygulama potansiyeli için önem taşımaktadır. Cas13a mekanizmasını kullanarak bitki RNA virüslerinin teşhisiyle ilgili deneysel sonuçlara ait literatürde büyük bir bilgi boşluğu bulunmaktadır. RNA biyolojisinin temel araştırmalarını aydınlatacak olan bu tarz çalışmalar RNA 'a dayalı ileri teşhis yöntemlerinin gelişimini de hızlandıracaktır.

Kaynakça

Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, I. M., Cox, D. B., ... & Zhang, F. (2016). C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, *353*(6299), aaf5573.

Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Essletzbichler, P., Han, S., Joung, J., Belanto, J. J., ... & Zhang, F. (2017). RNA targeting with CRISPR–Cas13. *Nature*, *550*(7675 80-284.

Alexander, H. M., Mauck, K. E., Whitfield, A. E., Garrett, K. A. & Malmstrom, C. M. (2014). Plant-virus interactions and the agro-ecological interface. *European Journal of Plant Pathology*, *138*(3), 529-547.

Ali, Z., Aman, R., Mahas, A., Rao, G. S., Tehseen, M., Marsic, T., ... & Mahfouz, M. M. (2020). iSCAN: An RT-LAMP-coupled CRISPR-Cas12 module for rapid, sensitive detection of SARS-CoV-2. *Virus Research*, *288*, 198129.

Ali, A., Bhat, J. I. A., & Shafique, F. (2026). CRISPR-Cas Systems in the Diagnosis of Infectious and Non-Infectious Diseases. In *Gene Editing by CRISPR-Cas* (pp. 157-182). CRC Press.

Aman, R., Mahas, A. & Mahfouz, M. (2020). Nucleic acid detection using CRISPR/Cas biosensing technologies. *ACS Synthetic Biology*, *9*(6), 1226-1233.

Anantharaman, V., Makarova, K. S., Burroughs, A. M., Koonin, E. V. & Aravind, L. J. B. D. (2013). Comprehensive analysis of the HEPN superfamily: identification of novel roles in intra-genomic conflicts, defense, pathogenesis and RNA processing. *Biology Direct*, *8*(1), 15.

Asmamaw Mengstie, M., Teshome Azezew, M., Asmamaw Dejenie, T., Teshome, A. A., Tadele Admasu, F., Behaile Teklemariam, A., ... & Abebe, E. C. (2024). Recent advancements in reducing the off-target effect of CRISPR-Cas9 genome editing. *Biologics: Targets and Therapy*, 21-28.

Barrangou R. (2015). The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond. *Current Opinion in Immunology*, *32*, 36–41.

Bot, J. F., van der Oost, J. & Geijsen, N. (2022). The double life of CRISPR–Cas13. *Current Opinion in Biotechnology*, *78*, 102789.

Brouns, S. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J., Snijders, A. P., Dickman, M. J., Makarova, K. S., Koonin, E. V. & van der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, *321*(5891), 960–964.

Bwalya, J. & Kim, K. H. (2023). The crucial role of chloroplast-related proteins in viral genome replication and host

defense against positive-sense single-stranded RNA viruses. *The Plant Pathology Journal*, *39*(1), 28.

Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Lee, J. W., Essletzbichler, P., Dy, A. J., Joung, J., ... & Zhang, F. (2017). Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, *356*(6336), 438-442.

Granados-Riveron, J. T. & Aquino-Jarquin, G. (2021). CRISPR/Cas13-based approaches for ultrasensitive and specific detection of microRNAs. *Cells*, *10*(7), 1655.

Hak, H., Ostendorp, S., Reza, A., Ishgur Greenberg, S., Pines, G., Kehr, J. & Spiegelman, Z. (2025). Rapid on-site detection of crop RNA viruses using CRISPR/Cas13a. *Journal of Experimental Botany*, *76*(21), 6335-6346.

Jia, X., Yao, J., Gao, Z., Liu, G., Dong, Y. H., Wang, X. & Zhang, H. (2018). Structure–function analyses reveal the molecular architecture and neutralization mechanism of a bacterial HEPN–MNT toxin–antitoxin system. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(18), 6812-6823.

Karimi, M., Ghorbani, A., Niazi, A., Rostami, M. & Tahmasebi, A. (2025). Integrating AI and CRISPR Cas13a for rapid detection of tomato brown rugose fruit virus. *Scientific Reports*, *15*(1), 25422.

Ke, Y., Huang, S., Ghalandari, B., Li, S., Warden, A. R., Dang, J., ... & Ding, X. (2021). Hairpin-spacer crRNA-enhanced CRISPR/Cas13a system promotes the specificity of single nucleotide polymorphism (SNP) identification. *Advanced Science*, *8*(6), 2003611.

Kellner, M. J., Koob, J. G., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O. & Zhang, F. (2019). SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nature Protocols*, *14*(10), 2986-3012.

Koonin, E. V. & Makarova, K. S. (2019). Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, *374*(1772), 20180087.

Larsen, B. B., Kimchi, O., Dunkley, O. R., Grimm, M. S., Siegers, J. Y., Huang, Y., ... & Myhrvold, C. (2025). RNA structure modulates Cas13 activity and enables mismatch detection. *Nature Biotechnology*, 1-9.

Leski, T. A., Spangler, J. R., Wang, Z., Schultzhaus, Z., Taitt, C. R., Dean, S. N. & Stenger, D. A. (2023). Machine learning for design of degenerate Cas13a crRNAs using lassa virus as a model of highly variable RNA target. *Scientific Reports*, *13*(1), 6506.

Li, Y., Li, S., Wang, J. & Liu, G. (2019). CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing. *Trends in Biotechnology*, *37*(7), 730-743.

Liu, L., Chen, P., Wang, M., Li, X., Wang, J., Yin, M. & Wang, Y. (2017). C2c1-sgRNA complex structure reveals RNA-guided DNA cleavage mechanism. *Molecular Cell*, *65*(2), 310-322.

Makarova, K. S., Shmakov, S. A., Wolf, Y. I., Mutz, P., Altae-Tran, H., Beisel, C. L., ... & Koonin, E. V. (2025). An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems including rare variants. *Nature Microbiology*, 1-16.

Massart, S., Chiumenti, M., De Jonghe, K., Glover, R., Haegeman, A., Koloniuk, I., ... & Candresse, T. (2019). Virus detection by high-throughput sequencing of small RNAs: Large-scale performance testing of sequence analysis strategies. *Phytopathology*, *109*(3), 488-497.

Molina Vargas, A. M., Sinha, S., Osborn, R., Arantes, P. R., Patel, A., Dewhurst, S., Hardy, D. J., Cameron, A., Palermo, G. & O'Connell, M. R. (2024). New design strategies for ultra-specific

CRISPR-Cas13a-based RNA detection with single-nucleotide mismatch sensitivity. *Nucleic Acids Research*, *52*(2), 921–939.

Murugan, K., Babu, K., Sundaresan, R., Rajan, R. & Sashital, D. G. (2017). The revolution continues: newly discovered systems expand the CRISPR-Cas toolkit. *Molecular Cell*, *68*(1), 15-25.

Niu, M., Dong, Z., Yu, L., Dong, X., An, J., Han, Y., ... & Li, H. (2025). Anti-RNA virus crRNA targets efficient screening platform based on bioinformatics and CRISPR detection. *Molecular Therapy Nucleic Acids*.

Okemo, P. & Henry, R. (2026). Designing of guide RNA for CRISPR gene editing: A web-based foundational approach. In *Harnessing Genomic Tools for Crop Improvement* (pp. 373-392). Academic Press.

Pattharaprachayakul, N., Lee, M., Incharoensakdi, A. & Woo, H. M. (2020). Current understanding of the cyanobacterial CRISPR-Cas systems and development of the synthetic CRISPR-Cas systems for cyanobacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, *140*, 109619.

Pillon, M. C., Gordon, J., Frazier, M. N. & Stanley, R. E. (2021). HEPN RNases - an emerging class of functionally distinct RNA processing and degradation enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *56*(1), 88–108.

Saunier, M., Humbert, A., Kreis, V., Peltier, J., Tisba, A., Auxilien, S., ... & Soutourina, O. (2025). Deciphering the RNA-based regulation mechanism of the phage-encoded AbiF system in *Clostridioides difficile*. *PLoS Genetics*, *21*(8), e1011831.

Sheri, V., Verma, P. K., Lekkala, S., & Janga, M. R. (2025). Application of Digital PCR and CRISPR/Cas13a-Based Fluorescent Assay for Accurate and On-Site Detection of Cotton Leafroll Dwarf Virus. *Journal of Virological Methods*, 115332.

Shi, P. & Wu, X. (2024). Programmable RNA targeting with CRISPR-Cas13. *RNA Biology*, *21*(1), 1–9.

Shmakov, S., Abudayyeh, O. O., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Gootenberg, J. S., Semenova, E., ... & Koonin, E. V. (2015). Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems. *Molecular Cell*, *60*(3), 385-397.

Singh, A., Yasheshwar, Kaushik, N. K., Kala, D., Nagraik, R., Gupta, S., Kaushal, A., Walia, Y., Dhir, S. & Noorani, M. S. (2025). Conventional and cutting-edge advances in plant virus detection: emerging trends and techniques. *3 Biotech*, *15*(4), 100.

Tan, X., Li, J., Cui, B., Wu, J., Toischer, K., Hasenfuß, G. & Xu, X. (2025). CRISPR/Cas13-Based Anti-RNA Viral Approaches. *Genes*, *16*(8), 875.

Tatineni, S. & Hein, G. L. (2023). Plant viruses of agricultural importance: Current and future perspectives of virüs disease management strategies. *Phytopathology®*, *113*(2), 117-141.

Tripathi, L., Ntui, V. O., Tripathi, J. N. & Kumar, P. L. (2021). Application of CRISPR/Cas for diagnosis and management of viral diseases of banana. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 609784.

Vercauteren, S., Fiesack, S., Maroc, L., Verstraeten, N., Dewachter, L., Michiels, J. & Vonesch, S. C. (2024). The rise and future of CRISPR-based approaches for high-throughput genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, *48*(5), fuae020.

Villegas, N. K., Gaudreault, Y. R., Keller, A., Kearns, P., Stapleton, J. A. & Plesa, C. (2025). Optimizing in vitro transcribed CRISPR-Cas9 single-guide RNA libraries for improved uniformity and affordability. *bioRxiv*, 2025-03.

Weinberg, Z., Lünse, C. E., Corbino, K. A., Ames, T. D., Nelson, J. W., Roth, A., Perkins, K. R., Sherlock, M. E. & Breaker, R. R. (2017). Detection of 224 candidate structured RNAs by

comparative analysis of specific subsets of intergenic regions. *Nucleic Acids Research*, *45*(18), 10811–10823.

Yang, H. & Patel, D. J. (2024). Structures, mechanisms and applications of RNA-centric CRISPR-Cas13. *Nature Chemical Biology*, *20*(6), 673–688.

Zhang, W., Jiao, Y., Ding, C., Shen, L., Li, Y., Yu, Y., ... & Yang, J. (2021). Rapid detection of tomato spotted wilt virus with Cas13a in tomato and *Frankliniella occidentalis*. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 745173.

Zilberzwige-Tal, S., Altae-Tran, H., Kannan, S., Wilkinson, M. E., Vo, S. C. D. T., Strebinger, D., ... & Zhang, F. (2025). Reprogrammable RNA-targeting CRISPR systems evolved from RNA toxin-antitoxins. *Cell*, *188*(7), 1925-1940.

BÖLÜM 3

Maintaining Biological Quality During Long-Term Storage of Entomopathogenic Nematodes

İsmail Alper SUSURLUK[1]
Alperen Kaan BÜTÜNER[2]

Introduction

Growing concerns regarding the detrimental effects of synthetic pesticides on non-target organisms, their contribution to environmental pollution, and the widespread development of pesticide resistance resulting from the prolonged use of the same active ingredients have prompted the European Union (EU) to impose increasingly stringent restrictions on their use (Pereira et al., 2009; Sánchez-Bayo, 2012; Villaverde et al., 2014; Wan et al., 2025). These regulatory measures have accelerated the search for sustainable alternatives to conventional chemical control, leading to the increasing adoption of environmentally friendly pest management strategies (Pereira et al., 2009; Villaverde et al., 2014; Zaller & Brühl, 2019). Among these alternatives, biological control has emerged as one of the most effective and widely adopted

[1] Prof. Dr., Bursa Uludağ University, Plant Protection Department, Orcid: 0000-0002-0699-1752
[2] Res. Assist, Bursa Uludağ University, Plant Protection Department, Orcid: 0000-0002-2121-3529

approaches and has gained a prominent position within the global biopesticide market (Bale et al., 2007; Elnahal et al., 2022; Erdoğan & Ulu, 2024). In the biological control agents currently available, entomopathogenic nematodes (EPNs) are recognised as one of the most important biological control organisms due to their broad host range, environmental safety, sustainability, suitability for mass production and compatibility with integrated pest management (IPM) programmes (Lacey & Georgis, 2012; Gozel & Gozel, 2016; Abd-Elgawad, 2017).

Entomopathogenic nematodes are obligate endoparasitic organisms belonging to the phylum Nematoda, order Rhabditida, and the families Steinernematidae and Heterorhabditidae. Their life cycle consists of an egg stage, four juvenile stages, and an adult stage (Smart Jr, 1995; Grewal & Georgis, 1999; Ehlers, 2001). Among these developmental stages, only the third-stage juvenile, commonly referred to as the Infective Juvenile (IJ), is capable of locating and infecting susceptible insect hosts (Koppenhöfer & Fuzy, 2004; Dillman & Sternberg, 2012; Trejo-Meléndez et al., 2024). The pathogenicity of the EPNs relies on their mutualistic association with gram-negative bacteria belonging to the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*. Members of the family Steinernematidae harbour symbiotic bacteria of the genus *Xenorhabdus*, whereas species belonging to the family Heterorhabditidae are associated with *Photorhabdus* (Burnell & Stock, 2000; Boemare, 2002; Ferreira & Malan, 2014; Susurluk & Bütüner, 2024).

Upon encountering a suitable host, IJs penetrate the insect body primarily through natural openings, such as the mouth, anus, and spiracles. In addition, species belonging to the genus Heterorhabditis possess the ability to penetrate directly through the insect cuticle (Gaugler et al., 1997; Grewal & Georgis, 1999; Koppenhöfer et al., 2020; Bütüner & Susurluk, 2023). Once inside the host haemocoel, the IJs release their symbiotic bacteria, which

rapidly proliferate and produce a diverse array of toxins, extracellular enzymes. These bacterial metabolites induce septicaemia, resulting in host death within approximately 24–72 hours (Smart Jr, 1995; Dillman et al., 2012; Santhi et al., 2015; Susurluk & Bütüner, 2024). The nematodes subsequently feed on the multiplying bacteria and degraded host tissues, complete two or three generations within the insect cadaver, and eventually produce a new generation of IJs that emerge into the soil to locate new hosts (Smart Jr, 1995; Dillman et al., 2012; Tarasco et al., 2023).

Despite their numerous advantages, including environmental safety, sustainability, a broad host range, and compatibility with IPM programmes, the successful commercialisation of EPNs depends not only on their efficacy following field application but also on their ability to maintain biological quality throughout production, storage, transportation, and distribution (Grewal, 2000a, 2000b; Strauch et al., 2000; Askary & Ahmad, 2017; Susurluk & Bütüner, 2024). Unlike chemical pesticides, EPNs are living organisms whose physiological condition is continuously influenced by external environmental factors during storage (Grewal, 2000a, 2000b; Strauch et al., 2000; Susurluk & Bütüner, 2024). Consequently, preserving both their viability and biological performance over extended storage periods remains one of the major challenges limiting their large-scale commercial utilisation. The ability to maintain IJs without substantial deterioration directly determines product shelf life, marketability, and field performance (Grewal, 2000a; Kagimu et al., 2017; Sharghi et al., 2025). Previous studies investigating storage performance have primarily focused on survival rate as the principal indicator of storage success (Smits, 1996; Chen & Glazer, 2005). However, survival alone does not adequately reflect the biological quality of stored IJs. Other biological characteristics, including infectivity, reproductive capacity, and behavioural competence, are equally important in

determining their effectiveness as biological control agents following storage (Andaló et al., 2011; Lalramliana & Yadav, 2016; Lalitha et al., 2023; Susurluk & Bütüner, 2024; Li et al., 2026). Increasing evidence indicates that prolonged storage affects a much broader range of biological attributes than survival alone. Even when survival rates remain relatively high, IJs may experience progressive depletion of lipid reserves, reduced mobility, impaired host-seeking behaviour, diminished reproductive capacity, and physiological ageing. Although these alterations are generally sublethal, they can substantially compromise the ability of IJs to locate, infect, and reproduce within susceptible insect hosts, ultimately reducing their biological control efficacy under field conditions (Andaló et al., 2011; Susurluk & Bütüner, 2024; Li et al., 2026).

This chapter reviews the current knowledge regarding the long-term storage of EPNs, with particular emphasis on the physiological and biological changes that occur during storage. Furthermore, it discusses how these alterations influence the survival, infectivity, host-seeking behaviour, reproductive capacity, and overall biological control performance of IJs, while highlighting current challenges and future research directions for improving storage stability and commercial application.

Storage Conditions and Their Influences on the Biological Quality of Entomopathogenic Nematodes

Several formulation strategies, including water-dispersible granules, hydrogel matrices, alginate encapsulation, and polymer-based delivery systems, have been developed to improve the storage stability of EPNs. These approaches primarily aim to reduce metabolic activity, conserve endogenous energy reserves, and maintain IJ viability during prolonged storage. Although significant improvements in shelf life have been achieved under different storage conditions, extending survival alone does not necessarily

ensure the preservation of biological quality following storage (Georgis & Kaya, 1998; Grewal, 2000a, 2000b; Chen & Glazer, 2005; Ganguly et al., 2008; Kagimu et al., 2017; Lalitha et al., 2022; Sharghi et al., 2025).

Survival represents only one component of the overall biological quality of IJs. The practical success of EPNs following storage depends equally on their ability to locate and infect susceptible hosts, reproduce efficiently, and maintain their biological control potential under field conditions (Susurluk & Ehlers, 2008). Consequently, evaluating post-storage performance requires consideration of multiple biological traits rather than survival alone. Accumulating evidence indicates that both storage duration and storage conditions play fundamental roles in determining the biological quality of IJs. Lalramliana & Yadav (2015) demonstrated that storage temperature markedly influenced both the survival and establishment of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae), *Steinernema thermophilum* (Rhabditida: Steinernematidae), and *S. glaseri*, with infectivity progressively declining as storage duration increased regardless of temperature. Similarly, Akı et al. (2023) reported that storage temperature, storage media, and IJ density collectively affected survival and infectivity, with IJs stored in Ringer solution at 9°C maintaining superior biological performance compared with those maintained under less favourable conditions. Likewise, Bütüner & Susurluk (2024) demonstrated that prolonged storage significantly reduced both the efficacy and reproductive capacity of several *H. bacteriophora* and *S. feltiae* isolates, indicating that storage-induced deterioration extends beyond survival and progressively compromises the functional competence of IJs. Collectively, these studies demonstrate that biological deterioration during storage is a progressive process, whereby IJs gradually lose their functional competence despite remaining alive. Consequently, survival alone should not be

regarded as a reliable indicator of post-storage quality, as infectivity, reproductive capacity, and host establishment may decline long before substantial mortality becomes evident. Nevertheless, the effects of prolonged storage are not universally consistent across all EPN species or biological traits. While the majority of studies have reported a gradual decline in biological performance with increasing storage duration, exceptions have also been documented.

For example, Yadav & Eleftherianos (2018) demonstrated that *S. carpocapsae* IJs stored for three months exhibited significantly greater virulence against *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) larvae than those stored for only three weeks. Interestingly, this enhanced virulence was independent of the presence of the mutualistic bacterium *Xenorhabdus nematophila*, suggesting that storage duration alone may alter nematode pathogenicity. Although the physiological basis of this response remains unclear, these findings indicate that prolonged storage may induce complex biological changes that do not necessarily result in a uniform decline in performance. Therefore, the consequences of storage should be interpreted with caution, as they may vary depending on the nematode species, storage conditions, and the biological trait being evaluated. The contrasting findings reported in previous studies suggest that storage-induced changes cannot be explained solely by storage duration or survival rates. Instead, the biological responses of IJs appear to be governed by a series of physiological processes that develop progressively during storage. Alterations in energy metabolism, depletion of endogenous lipid reserves, reduced metabolic efficiency, and physiological ageing are considered among the principal mechanisms underlying the gradual decline in biological quality. Consequently, understanding the physiological basis of storage-induced deterioration is essential for explaining subsequent changes in infectivity, virulence, reproductive

capacity, host-seeking behaviour, and ultimately the biological control efficacy of EPNs.

Conclusion

Prolonged storage of EPNs may induce a series of physiological and biological alterations, including changes in energy metabolism, depletion of endogenous energy reserves, reduced infectivity, and diminished reproductive capacity. Collectively, these changes may substantially compromise the field performance of infective juveniles, even when high levels of apparent viability are maintained.

Therefore, the commercial success of EPNs should not be judged solely by their ability to survive extended storage periods. Rather, it depends also on their capacity to retain the biological characteristics required for effective pest suppression after application, including host infection, reproduction, and persistence within the soil environment. Preserving these functional attributes is essential for maintaining population establishment and ensuring long-term biological control efficacy under field conditions. Consequently, future research should focus not only on extending shelf life but also on developing storage strategies that preserve the biological quality of IJs throughout storage. Such advances will contribute significantly to the sustainable and effective utilisation of EPNs in IPM.

References

Abd-Elgawad, M. M. (2017). Status of entomopathogenic nematodes in integrated pest management strategies in Egypt. In Biocontrol agents: entomopathogenic and slug parasitic nematodes (pp. 473-501). Wallingford UK: CABI. https://doi.org/10.1079/9781786390004.0473

Akı, O., Yüksel, E., İmren, M., Bozbuğa, R., & Canhilal, R. (2023). The role of storage duration and conditions on the survival and pathogenicity of entomopathogenic nematodes. Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi, 9(2), 176-185. https://doi.org/10.24180/ijaws.1297111

Andaló, V., Moino Jr, A., Maximiniano, C., Campos, V. P., & Mendonça, L. A. (2011). Influence of temperature and duration of storage on the lipid reserves of entomopathogenic nematodes. Revista Colombiana de entomología, 37(2), 203-209. https://doi.org/10.25100/socolen.v37i2.9075

Askary, T. H., & Ahmad, M. J. (2017). Entomopathogenic nematodes: mass production, formulation and application. In Biocontrol agents: entomopathogenic and slug parasitic nematodes (pp. 261-286). Wallingford UK: CABI. https://doi.org/10.1079/9781786390004.0261

Bale, J. S., Van Lenteren, J. C., & Bigler, F. (2007). Biological control and sustainable food production. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 363(1492), 761. https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2182

Boemare, N. (2002). Interactions between the partners of the entomopathogenic bacterium nematode complexes, *Steinernema-Xenorhabdus* and *Heterorhabditis-Photorhabdus*. Nematology, 4(5), 601-603. https://doi.org/10.1163/15685410260438863

Burnell, A., & Stock, S. P. (2000). *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts—lethal pathogens of insects. Nematology, 2(1), 31-42. https://doi.org/10.1163/156854100508872

Bütüner, A. K., & Susurluk, A. (2023). Efficiency of temperature and storage duration on some morphological measurements and reproductive capacity of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae)'s Turkish HBH hybrid strain. Turkish Journal of Entomology, 47(4), 469-476. https://doi.org/10.16970/entoted.1331987

Chen, S., & Glazer, I. (2005). A novel method for long-term storage of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* at room temperature. Biological Control, 32(1), 104-110. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.08.006

Dillman, A. R., & Sternberg, P. W. (2012). Entomopathogenic nematodes. Current Biology, 22(11), R430-R431. https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822(12)00334-X

Dillman, A. R., Chaston, J. M., Adams, B. J., Ciche, T. A., Goodrich-Blair, H., Stock, S. P., & Sternberg, P. W. (2012). An entomopathogenic nematode by any other name. PLoS Pathogens, 8(3), e1002527. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002527

Ehlers, R. U. (2001). Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. Applied microbiology and biotechnology, 56(5), 623-633. https://doi.org/10.1007/s002530100711

Elnahal, A. S., El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Desoky, E. S. M., El-Tahan, A. M., Rady, M. M., ... & El-Tarabily, K. A. (2022). The use of microbial inoculants for biological control, plant growth

promotion, and sustainable agriculture: A review. European Journal of Plant Pathology, 162(4), 759-792. https://doi.org/10.1007/s10658-021-02393-7

Erdoğan, H., & Ulu, T. C. (2024). Evaluating a portable method and two irrigation drippers for field application of entomopathogenic nematodes. Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences, 34(1), 138-150. https://doi.org/10.29133/yyutbd.1389512

Ferreira, T., & Malan, A. P. (2014). *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, bacterial symbionts of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* and *Heterorhabditis* and their *in vitro* liquid mass culture: a review. African Entomology, 22(1), 1-14. https://hdl.handle.net/10520/EJC150979

Ganguly, S., Kumar, A., & Parmar, B. S. (2008). Nemagel-a formulation of the entomopathogenic nematode *Steinernema thermophilum* mitigating the shelf-life constraint of the tropics. Nematologia Mediterranea, 36: 125-130. https://journals.flvc.org/nemamedi/article/view/86965

Gaugler, R., Lewis, E., & Stuart, R. J. (1997). Ecology in the service of biological control: the case of entomopathogenic nematodes. Oecologia, 109(4), 483-489. https://doi.org/10.1007/s004420050108

Georgis, R., & Kaya, H. K. (1998). Formulation of entomopathogenic nematodes. In Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments (pp. 289-308). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4926-6_9

Gozel, U., & Gozel, C. (2016). Entomopathogenic nematodes in pest management. Integrated pest management (IPM):

environmentally sound pest management, 55. https://doi.org/10.5772/63894

Grewal, P., & Georgis, R. (1999). Entomopathogenic nematodes. In Biopesticides: use and delivery (pp. 271-299). Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1385/0-89603-515-8:271

Grewal, P. S. (2000a). Enhanced ambient storage stability of an entomopathogenic nematode through anhydrobiosis. Pest Management Science: formerly Pesticide Science, 56(5), 401-406. https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-4998(200005)56:5%3C401::AID-PS137%3E3.0.CO;2-4

Grewal, P. S. (2000b). Anhydrobiotic potential and long-term storage of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). International journal for parasitology, 30(9), 995-1000. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00080-1

Kagimu, N., Ferreira, T., & Malan, A. P. (2017). The attributes of survival in the formulation of entomopathogenic nematodes utilised as insect biocontrol agents. African Entomology, 25(2), 275-291. https://hdl.handle.net/10520/EJC-9e1e16147

Koppenhöfer, A. M., & Fuzy, E. M. (2004). Effect of white grub developmental stage on susceptibility to entomopathogenic nematodes. Journal of economic entomology, 97(6), 1842-1849. https://doi.org/10.1093/jee/97.6.1842

Koppenhöfer, A. M., Shapiro-Ilan, D. I., & Hiltpold, I. (2020). Entomopathogenic nematodes in sustainable food production. Frontiers in Sustainable Food Systems, 4, 125. https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00125

Lacey, L. A., & Georgis, R. (2012). Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with

comments on commercial production. Journal of Nematology, 44(2), 218. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3578470/

Lalitha, K., Nithya, K., Bharathi, B. G., Venkatesan, S., & Shivakumar, M. S. (2023). Long-term storage does not affect the infectivity of entomopathogenic nematodes on insect hosts. Applied Microbiology and Biotechnology, 107(1), 419-431. https://doi.org/10.1007/s00253-022-12309-y

Lalramliana, & Yadav, A. K. (2016). Effects of storage temperature on survival and infectivity of three indigenous entomopathogenic nematodes strains (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Meghalaya, India. Journal of parasitic diseases, 40(4), 1150-1154. https://doi.org/10.1007/s12639-014-0639-8

Li, H., Zhang, K., Zhang, T., & Qian, X. (2026). Effects of Temperature-Moisture Interactions on Storage Survival and Virulence in Two Entomopathogenic Nematode Species. Insects, 17(7), 723. https://doi.org/10.3390/insects17070723

Pereira, J. L., Antunes, S. C., Castro, B. B., Marques, C. R., Gonçalves, A. M., Gonçalves, F., & Pereira, R. (2009). Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. Ecotoxicology, 18(4), 455-463. https://doi.org/10.1007/s10646-009-0300-y

Sánchez-Bayo, F. (2012). Insecticides mode of action in relation to their toxicity to non-target organisms. Journal of Environmental and Analytical Toxicology, S, 4, S4-002.

Santhi, V. S., Salame, L., Nakache, Y., Koltai, H., Soroker, V., & Glazer, I. (2015). Attraction of entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* to the

red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*). Biological control, 83, 75-81. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.01.003

Sharghi, H., Kary, N. E., & Mohammadi, D. (2025). Enhancing the shelf life of entomopathogenic nematodes formulation: The impact of super absorbent polymer and infective juveniles concentration. Crop Protection, 190, 107091. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2024.107091

Smart Jr, G. C. (1995). Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects. Journal of nematology, 27(4S), 529.

Smits, P. H. (1996). Post-application persistence of entomopathogenic nematodes. Biocontrol Science and Technology, 6(3), 379-388. https://doi.org/10.1080/09583159631352

Strauch, O., Niemann, I., Neumann, A., Schmidt, A. J., Peters, A., & Ehlers, R. U. (2000). Storage and formulation of the entomopathogenicnematodes *Heterorhabditis indica* and *H. bacteriophora.* BioControl, 45(4), 483-500. https://doi.org/10.1023/A:1026528727365

Susurluk, A., & Ehlers, R. U. (2008). Field persistence of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* in different crops. BioControl, 53(4), 627-641. https://doi.org/10.1007/s10526-007-9104-2

Susurluk, A., & Bütüner, A. K. (2024). Physiological reactions of some entomopathogenic nematodes to long-term storage. Turkish Journal of Entomology, 48(3), 261-268. https://doi.org/10.16970/entoted.1475414

Tarasco, E., Fanelli, E., Salvemini, C., El-Khoury, Y., Troccoli, A., Vovlas, A., & De Luca, F. (2023). Entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria: from genes to field uses. Frontiers in Insect Science, 3, 1195254. https://doi.org/10.3389/finsc.2023.1195254

Trejo-Meléndez, V. J., Ibarra-Rendón, J., & Contreras-Garduño, J. (2024). The evolution of entomopathogeny in nematodes. Ecology and Evolution, 14(2), e10966. https://doi.org/10.1002/ece3.10966

Villaverde, J. J., Sevilla-Morán, B., Sandín-España, P., López-Goti, C., & Alonso-Prados, J. L. (2014). Biopesticides in the framework of the European Pesticide Regulation (EC) No. 1107/2009. Pest management science, 70(1), 2-5. https://doi.org/10.1002/ps.3663

Wan, N. F., Fu, L., Dainese, M., Kiær, L. P., Hu, Y. Q., Xin, F., ... & Scherber, C. (2025). Pesticides have negative effects on non-target organisms. Nature Communications, 16(1), 1360. https://doi.org/10.1038/s41467-025-56732-x

Yadav, S., & Eleftherianos, I. (2018). Prolonged storage increases virulence of Steinernema entomopathogenic nematodes toward Drosophila larvae. The Journal of Parasitology, 104(6), 722-725. https://doi.org/10.1645/18-91

Zaller, J. G., & Brühl, C. A. (2019). Non-target effects of pesticides on organisms inhabiting agroecosystems. Frontiers in Environmental Science, 7, 75.


BİDGE