



Serada Yetiştirilen Domates Bitkilerinde Zararlı Kök-ur Nematodu (*Meloidogyne javanica*)'na Karşı Entomopatojen Nematodların ve Simbiyont Bakterilerinin Etkinliği

İlker KEPENEKÇİ^{1*}

¹Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü 60250 Taşlıçiftlik, Tokat
*e-posta: kepenekci@gmail.com

Alındığı tarih (Received): 07.04.2015

Kabul tarihi (Accepted): 04.04.2016

Online Baskı tarihi (Printed Online): 28.04.2016

Yazılı baskı tarihi (Printed): 16.05.2016

Öz: Çalışmada, dört entomopatojen nematod türünün (EPN) (*Steinernema carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. glaseri* ve *Heterorhabditis bacteriophora*) ve simbiyotik olarak yaşayan bakterilerinin (*Xenorhabdus bovienii* ve *Photorhabdus luminescens kayaii*), serada yetiştirilen domates (SC-2121 çeşidi) bitkilerinde zararlı kök-ur nematodu (*Meloidogyne javanica*)'nın yumurta (yumurta açılımına) ve ikinci dönem enfektif larvaları (L2)'na (larvaya toksisite) karşı etkisi araştırılmıştır. Denemeler sonunda; her bir bitki kökündeki *M. javanica*'nın oluşturduğu yumurta paketi sayısı, bitkinin boyu (cm), bitki ve kökün yaş ve kuru ağırlığı (g) parametreleri değerlendirilmiştir. Çalışmada *S. feltiae* (sulu süspansiyon ve kadavra uygulamaları) ve *X. bovienii* etkili bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kök-ur nematodları; *Meloidogyne javanica*; entomopatojen nematodlar; *Xenorhabdus*; *Photorhabdus*; enfekteli kadavra

Effect of Entomopathogenic Nematodes and Their Mutualistic Bacteria to Control of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne javanica*) on Tomato in The Greenhouses

Abstract: In this study, the effects of four entomopathogenic nematode species (EPNs) (*Steinernema carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. glaseri* and *Heterorhabditis bacteriophora*) and the supernatants of their symbiotic bacteria (*Xenorhabdus bovienii* and *Photorhabdus luminescens kayaii*) were evaluated on eggs (hatching) and second stage juveniles (J2s) (mortality) of root-knot nematodes (*Meloidogyne javanica*) on tomato plants (SC-2121 variety) grown in the greenhouse. Data were recorded included total number of egg masses caused by *M. javanica* on the tomato roots for each plant, plant height (cm), fresh and dry weight of the plant shoots and roots (g). *S. feltiae* (aqueous suspensions and infected insect cadavers) and *X. bovienii* have been found to be effective to control of root-knot nematode.

Keywords: Root-knot nematodes; *Meloidogyne javanica*; entomopathogenic nematodes; *Xenorhabdus*; *Photorhabdus*; infected cadaver

1. Giriş

Sebze ve meyve, insan beslenmesinde çok önemli olan besinlerdir. Örtü altı yetiştiriciliğinde sebzelerde ekonomik olarak ürün kayıplarına neden olan önemli zararlılardan birisi de köklerde

urlar meydana getiren kök-ur nematodları (*Meloidogyne* spp.) (KUN)'dır.

Kök-ur nematodları bütün dünyada dağılım gösteren, tarımsal ürünlerde ekonomik kayıplara yol açabilen ve geniş konukçu dizisine sahip önemli bitki paraziti nematod türlerini içeren

obligat parazitlerdir. En önemli konukçuları arasında domates, patlıcan, fasulye, hıyar, patates, şekerpancarı, pamuk, tütün, biber, havuç, ıspanak gibi sebzeler ve muz, şeftali, erik, incir, dut gibi çok yıllık meyveler yer almaktadır. Özellikle sulamanın olduğu sıcak bölgelerde, sebze ve meyve üretimi yapılan alanlarda daha zararlı olmaktadır (Whitehead, 1998). KUN'lerin sebzelerde çok önemli verim kayıplarına neden oldukları ve bu kayıpların domateslerde %42-54, patlıcanlarda %30-60 oranlarında olduğu bildirilmektedir (Netscher and Sikora, 1990). Sebzelerde sadece KUN'lerin neden olduğu ürün kaybının %50-80 arasında değiştiği bilinmektedir (Siddiqi, 1986). KUN'lerin doğrudan zararları yanında, fungal ve bakteriyel hastalıklara karşı bitkiyi hazırlamaları ve köke girerken açtıkları yerlerden mikroorganizmaların girişine imkan sağlamaları da dolaylı zararları olarak ortaya çıkmaktadır (Stirling, 1991).

Entomopatojen nematod (EPN)'lar *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* cinsi bakterilerle ortak yaşamaktadır (Thomas and Poinar, 1979). EPN'ler toprak içerisinde yaşayan zorunlu böcek patojenidirler. EPN'lerin bitki paraziti nematodlara karşı etkinliği ilk olarak 1986 yılında yapılan bir çalışmada ortaya konulmuştur (Bird and Bird, 1986). KUN'lerin biyolojik mücadelesinde EPN'lerin kullanılması son yıllarda önem kazanmıştır. Pek çok sera ve tarla denemeleri sonucunda, EPN uygulamaları ile KUN'lerin kontrol edilebileceği ortaya konmuştur (Perez and Lewis, 2004).

Ülkemizde tespit edilen EPN'lerin ekonomik öneme sahip zararlı grupları üzerindeki etkileriyle ilgili çok az sayıda literatür kaydı bulunmaktadır (Kepenekci, 2014a; b). Bu çalışmaların çoğu laboratuvar koşullarında yapılmış etkinlik çalışmaları şeklindedir. Ülkemizde KUN'lere karşı EPN'lerin etkinliği ile ilgili ilk kayıt Bulun et al. (2009) tarafından *M. incognita*'ya karşı yürütülmüş çalışmadır.

Bitki paraziti nematodlara karşı halen uygulanmakta olan mücadele yöntemlerinden kimyasal mücadele kapsamında yüksek toksik etkiye sahip bitki koruma ürünleri (nematisit) kullanılmaktadır. Ülkemizde nematodlara karşı

ruhsat almış nematisitlerin büyük bir bölümü KUN'lere karşı ruhsatludur (Anonymous, 2010). Bazı nematisitler nematodların mücadelesinde etkili olmasına rağmen, özellikle geniş spekturumlu bir etkiye sahip olduklarından yasaklanmış ya da kısıtlanmışlardır. Bunun yanı sıra nematisitlerin yüksek derecede toksik etkiye sahip olması, kanserojenik etkisi ve ürünler üzerinde kalıntı problemi oluşturması özellikle fumigant etkili nematisitlerin kullanımlarını azaltmaktadır. Böylece, alternatif mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi ve bitki paraziti nematodların kontrolü için, kimyasal mücadeleyi tamamlayıcı ve bütünleyici yöntemlerin uygulamaya konulması kaçınılmaz hale gelmiştir. Bu mücadele yöntemleri içerisinde; biyolojik mücadele yöntemleri kapsamında entomopatojenlerin kullanımı önemli bir yer tutmaktadır. Dünyada son yıllarda özellikle KUN'lere karşı EPN'lerin kullanımı ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır (Khan et al., 2010; Del Valle et al., 2013). EPN'lerden *Steinernema feltiae* (S.f), *S. glaseri* (S.g) ve *Heterorhabditis bacteriophora* (H.b)'nın KUN'lere karşı etkinliği bu çalışma kapsamında ortaya konulmaya çalışılmıştır. Ayrıca EPN'ler ile simbiyotik olarak yaşayan ve konukçularının ölümüne neden olan bakterilerden *Xenorhabdus bovienii* (X.b) ve *Photorhabdus luminesces* (P.l) izole edilip üretildikten sonra KUN'lere karşı uygulanarak etkinlikleri araştırılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Sera-saksı denemelerinde kullanılacak fidelerin yetiştirilmesi, Nematod kültürlerinin devamının sağlanması ve nematodların kitle üretimi

Saf kültürün devamının sağlanması için KUN'lere hassas olduğu bilinen SC-2121 çeşidi domates (*Solanum lycopersicum* L.) tohumları kullanılmıştır. Tohumlar viyollere ekilmeden önce yüzeysel dezenfeksiyon amacıyla %3'lük çamaşır suyunda 1 dakika tutulup steril suyla yıkanmış ve kurutma kağıdı üzerinde kurutulmuştur. Bunu takiben tohumlar, içinde tohum toprağı konulmuş 45 gözlü (9×5) viyollere (en: 5 cm, derinlik: 6 cm)

her göze bir tohum olacak şekilde dikilmiştir. Viyoller 23°C (±2)'de 16 saat aydınlık 8 saat karanlık olarak ayarlanan iklim odalarına yerleştirilerek düzenli olarak sulanmıştır. Gerçek 2-4 yapraklı döneme (yaklaşık 10 cm boy) gelen domates fideleri saksılara şaşırtılarak seraya aktarılmıştır. Şaşırtma işleminde saksılarda %80 kum %15 toprak ve %5 kil toprak karışımı kullanılmıştır. Kullanılan saksılar 10×10 cm boyutlarında ve 800 cm³ toprak karışımı almaktadır. Toprak karışımları saksılara konulmadan önce alt kısımlarına köklerin dışarı çıkmasını ve karışımların dökülmesini önlemek amacıyla kâğıt tela yerleştirilmiştir. Tohumların şaşırtılacağı saksılarda kullanılan kum ve toprak karışımı iki kere 121°C de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiş ve iki işlem arasında 24 saat bekletilmiştir (Smith and Onions, 1994). Stok kültür olarak bulunan ve +4°C'de muhafaza edilen *M. javanica* yumurtaları saksılardaki domates fidelerinin kökleri etrafına açılan deliklere verilmiştir. Stok kültür olarak bulunan ve +4°C'de muhafaza edilen *M. javanica* yumurtaları saksılardaki domates fidelerinin kökleri etrafına açılan deliklere bombeli pipet yardımıyla 3000 yumurta bitki⁻¹ olacak şekilde bulaştırılarak nematod kültürlerinin devamı sağlanmış ve kitle üretimi yapılmıştır (Melakeberhan, 1997).

2.2. Denemelerde kullanılacak nematod yumurtalarının ve larvalarının elde edilmesi

Meloidogyne javanica'ya ait yumurtalar ve 2. dönem larvalar (L2 veya J2); serada yetiştirilen domates bitkileri (SC-2121 çeşidi)'nin urlu köklerinden elde edilmiştir. Bu amaçla urlu kökler tazyikli olmayan musluk suyu altında iyice yıkanarak 1 cm boyunda kesilmiş ve %0.525 yoğunlukta NaOCl (sodyum hipoklorit) (çamaşır suyu) çözeltisi içinde 3.0-3.5 dakika çalkalanmıştır. Daha sonra bu çözelti 200 mesh (delik genişliği 75µm) ve 500 mesh (delik genişliği 25µm)'lik eleklerden geçirilerek 500 mesh'lik elek üzerinde kalan nematod yumurtaları toplanmıştır (Hussey and Barker, 1973). Bu yumurtaların bir kısmı denemelerde kullanmak amacıyla, mikroskop altında sayım yapılarak 1 ml içinde 3000 yumurta olması sağlanmıştır. Elde edilen nematod yumurtaları gerektiğinde

kullanılmak üzere buzdolabında +4°C'de muhafaza edilmiştir. Daha sonra elde edilen nematod yumurtaları inkübasyona bırakılmış ve yumurtadan çıkan L2'ler toplanmıştır. Mikroskop altında sayım yapılarak 1 ml içinde 1000 L2 olması sağlanmıştır. Elde edilen larvalar aynı gün denemelerde kullanılmıştır.

2.3. *Galleria mellonella* larvalarının yetiştirilmesi

EPN'lerin canlılıklarını devam ettirebilmesi amacıyla kültürlerin yenilenmesine yönelik olarak sürekli *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) üretilmiştir. *G. mellonella* larvaların yetiştirilmesi için özel besin ortamı hazırlanmıştır (Haydak, 1936; Mohammed and Coppel, 1983). Kapaklarına alüminyum tel geçirilmiş 300 ml'lik cam kavanozlara hazırlanan besin ortamından 1 cm yüksekliğinde konularak üzerine *G. mellonella* yumurta kümesi yerleştirilmiştir. Bu yumurtalardan larvaların çıkışı ve gelişmesi için kavanozlar 23-24°C'ye ayarlı 16/8 saat aydınlatmalı böcek yetiştirme dolaplarına yerleştirilmiştir.

2.4. Entomopatojen nematodların yenilenmesi ve kitle üretimi

Bu kapsamda Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Zooloji Ana Bilim Dalı (Aydın) ve Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü (Ankara) laboratuvarlarında bulunan EPN'ler (*Steinernema feltiae*, *S. glaseri* ve *Heterorhabditis bacteriophora*) kullanılmıştır.

EPN'lerin sürekli üretilmesi ve bakımı: EPN'lerin üretilmesi için *G. mellonella*'nın son dönem larvaları kullanılmıştır. Bu larvalar kokon örmelerini engellemek için 55°C'deki suda 15-20 saniye bekletilip 30 saniye çeşme suyu altında yıkanarak hareketsiz duruma getirilmiştir (Woodring and Kaya, 1988). EPN'ler tarafından enfekte olan *G. mellonella* larvalarından "White tuzak" metodu (White, 1927) kullanılarak EPN'lere ait enfektif larvalar (EL veya IJ) elde edilmiştir. Yaklaşık iki hafta sonra IJ'ler White tuzak sisteminden alınarak tetrapak kutuları içerisinde 10°C'lik inkübatörde saklanmışlardır (Gulcu and Hazır, 2012). Nematodların aktivitelerini kaybetmemeleri için 1-2 ayda bir

yeni *G. mellonella* larvalarına verilerek aynı işlem tekrarlanarak kültürler yenilenmiş ve tazeliği muhafaza edilmiştir.

EPN'lerin kitle üretim çalışmaları: Bu aşamada *in vivo* yöntemle stok kültürlerimizde bulunan EPN'lere ait IJ'ler kullanılarak kitle üretimi yapılmıştır. Yapay besi ortamında üretilen *G. mellonella* larvalarının son dönemleri seçilerek EPN'lere ait IJ'ler ile enfekte edilmiştir. Büyük boy (15 cm çaplı) petriyeler kullanılarak hazırlanacak olan White tuzak düzeneklerinin her biri üzerine 30 adet enfekte edilmiş *G. mellonella* larvaları (kadavralar) yerleştirilmiştir. Oda sıcaklığında (23-24°C) bekletilerek kadavralardan yaklaşık iki hafta sonra dışarı çıkan yeni nesil IJ'ler toplanmış ve tetrapak kutuları içerisinde 10°C'de saklanmıştır. Depolanan IJ'ler 2 haftalık süreç içerisinde çalışmalarda kullanılmıştır.

2.5. Enfekteli kadavraların elde edilmesi

EPN ile enfekteli kadavraları elde etmek için, içinde son dönem *G. mellonella* larvaları bulunan tabanı filtre kağıdı ile kaplı 90 mm çaplı plastik petrilere 500 IJ larva⁻¹ olacak şekilde oda sıcaklığında inoküle edilmiştir (Shapiro-Ilan et al., 2006).

2.6. Entomopatojen nematodların simbiyot bakterilerinin elde edilmesi ve üretimi

Yaklaşık 500 *S. feltiae* veya *H. bacteriophora* IJ'leri %0.4'lük hyamine çözeltisinde 3-4 dakika bekletilerek yüzey sterilizasyonu yapılmış ve 3 kez steril distile su ile yıkanmıştır. IJ'ler 2 ml'lik steril eppendorf tüp içinde el homojenizatörü kullanılarak parçalanmıştır (Somvanshi et al., 2006). Oluşan bu süspansiyondan steril öze yardımı ile bir damla alınarak NBTA (içerisinde %0.004 triphenyltetrazolium chloride ve %0.0025 bromthymol blue bulunan nutrient agar) besi ortamına ekimi yapılmış ve 28°C'de inkübe edilmiştir (Akhurst, 1982). Bakterilerin gelişimi ve koloni morfolojileri 48 saat inkübasyon sonrasında kontrol edilmiş ve kontaminasyon olmadığından emin olunmuştur. *P. lum. kayaii* veya *X. bovienii*'a ait tek koloni seçilerek Tryptic Soy Broth (TSB) (Sigma-Aldrich, İstanbul, Turkey) besi ortamına aktarılmış ve çalkalamalı inkübatöre yerleştirilerek 28°C'de 180 rpm hızda 192 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hücreden

arındırılmış supernatant elde etmek için bakteri kültürü 20000 g ve 4°C sıcaklıkta 15 dakika santrifüj edilmiştir (SIGMA model 3 K-30, Osterode am Harz, Germany) (Gulcu et al., 2012). 8 günlük *P. lum. kayaii* veya *X. bovienii* bakteri kültürlerinden elde edilen supernatantlar denemelerde kullanılmıştır.

2.7. Sera-Saksı denemeleri (*Meloidogyne javanica* yumurtalarının açılımına etki ve larvalarına karşı olan toksisite denemeleri)

Meloidogyne javanica (*M.j*) uygulamalarında; 3000 yumurta ml⁻¹ (yumurta açılımına etki) (I) veya 1000 L2 ml⁻¹ (larvalara karşı olan toksisite) (II) olacak şekilde 2 uygulama yapılmıştır. Kurulan tüm denemelerde pozitif (+) kontrol (sadece nematod yumurtası veya L2'sinin uygulandığı) (I) ve negatif (-) kontrol (sadece su uygulanan, *M.j* uygulaması yapılmayan) (II) olmak üzere 2 kontrol grubu bulunmaktadır. Çalışmalarda kullanılan konsantrasyonlar bitki/saksı başına ayarlanmış ve uygulamalardan sonra her bir saksıya 100 ml su verilmiştir. Saksı yüzeyindeki alan hesaplanarak cm²'ye yapılacak uygulamalar belirlenmiştir.

Fideler şaşırtıldıktan sonra fidelerinin kökleri etrafına açılan 2 cm derinliğinde olan deliğe pipet yardımıyla üç farklı konuda uygulamalar yapılmıştır. 1. EPN'ler iki farklı konsantrasyonda, 25 ve 125 IJ cm⁻² (1225±25 ve 6125±25 IJ saksı⁻¹) uygulama yapılmıştır. 2. Kadavra uygulamalarında *S.f*'nin bulunduğu *G. mellonella* larvaları kullanılmıştır [*S.f* (kadavra)]. *S.f* (kadavra) uygulamalarında iki farklı yöntem kullanılmıştır. Fideler saksılara şaşırtılırken fidenin dip kısmına [*S.f* (kadavra-dip)] (I) ve fideler şaşırtıldıktan sonra toprak yüzeyinin 1 cm altına gömülerek [*S.f* (kadavra-1 cm)] (II) uygulamalar yapılmıştır. 3. Bakteri; *X.b* ve *P.l* uygulamaları da iki farklı şekilde yapılmıştır. Fideler saksılara şaşırtılırken fideler bakteri süspansiyonlarına bandırıldıktan sonra saksılara şaşırtılmış [*X.b* (bandırma) ve *P.l* (bandırma)] (I) ve fideler şaşırtıldıktan sonra fidelerinin kökleri etrafına açılan 2 cm derinliğinde olan deliğe pipet yardımıyla 10 ml bitki⁻¹ olacak şekilde bakteri süspansiyonları verilmiştir [*X.b* (şırınga) ve *P.l*

(şırınga)] (II). EPN ve bakteri süspansiyonları nematodlarla birlikte aynı anda uygulanmıştır.

Denemeler boyunca sera içi sıcaklık ve nem değerleri HOB0 (sıcaklık ve nem kaydedici) kullanılarak kaydedilmiş, Ekim-Aralık 2012 [13.32-33.59 °C (22.02 ±4.14 °C) ve %23.40-77.10 (%36.34±9.25)] ve Aralık-Mayıs 2013 [16.7-39.6 °C (25.04±4.18 °C) ve %23.4-72.6 (%30.14±10.00)] dönemlerinde tesadüf parselleri deneme desenine göre 5 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Denemelerde 7×7 cm (yaklaşık 340 ml veya 320 g toprak alan) ebatlarında içinde toprak kum karışımı (%80 kum, %15 toprak ve %5 kil) bulunan plastik saksılar kullanılmıştır. Hazırlanan toprak kum karışımı iki kere 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiş ve iki işlem arasında 24 saat beklenmiştir (Nakasone et al., 2004). İklim odasında viyollerde yetiştirilen domates fideleri (SC-2121 domates çeşidi), 2-4 yapraklı döneme gelince (yaklaşık 10 cm boyda), her saksıya bir fide olacak şekilde şaşırtılmıştır. Şaşırtılan fideler kök sistemlerinin gelişmesi için 5 gün düzenli olarak kontrolleri yapılarak sulanmıştır. Gelişme geriliği görülen veya genele oranla büyük olan fideler denemeye alınmamıştır. Uygulamalardan 9 hafta sonra bitkiler saksılardan toprakları ile birlikte çıkarılarak fazla tazyikli olmayan musluk suyu altında kök sisteminin topraktan tam arındırılması için yıkanmışlardır. Yıkama işleminden sonra kökler phloxine B (0.15 g L su⁻¹) ile 15-20 dakika boyanmış (Daykin and Hussey, 1985) ve büyüteç altında yumurta paketleri sayılmıştır. Her bir bitkiye ait üst aksam ölçülmüştür. Daha sonra hassas terazide kökler ve bitki üst aksamı tartılarak kaydedilmiştir. Aynı işlem 70°C'de 48 saat kurutma (Mohammad et al., 2007) işlemi yapıldıktan sonra tekrarlanmıştır. Denemeleri sonunda; her bir bitki kökündeki kök-ur nematodlarına ait yumurta paketi sayısı (I), bitkinin boyu (cm) (II), bitkinin yaş (III) ve kuru ağırlığı (g) (IV), kök yaş (V) ve kuru ağırlığı (g) (VI) parametreleri (Molina et al., 2007) değerlendirilmiştir.

2.8. İstatistiksel analiz

Elde edilen verilere varyans analizi uygulanmıştır. Uygulamaların *M. javanica*'ya karşı etkileri kontrol gruplarına kıyaslanarak bulunmuştur. Gruplar arasındaki ayırım için Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır (SPSS, 1999).

3. Bulgular ve Tartışma

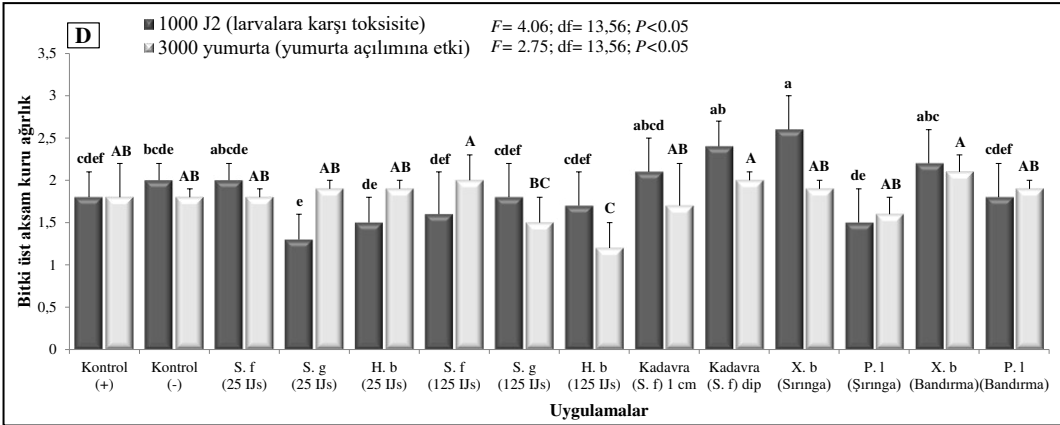
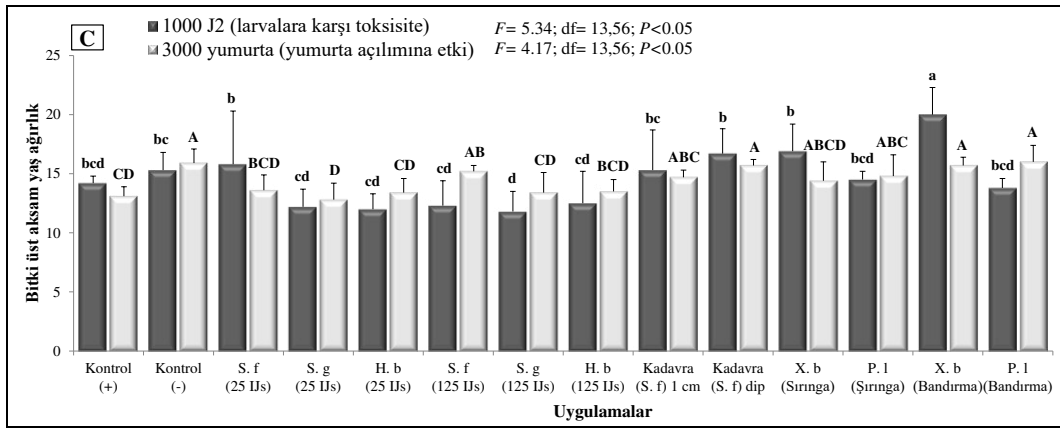
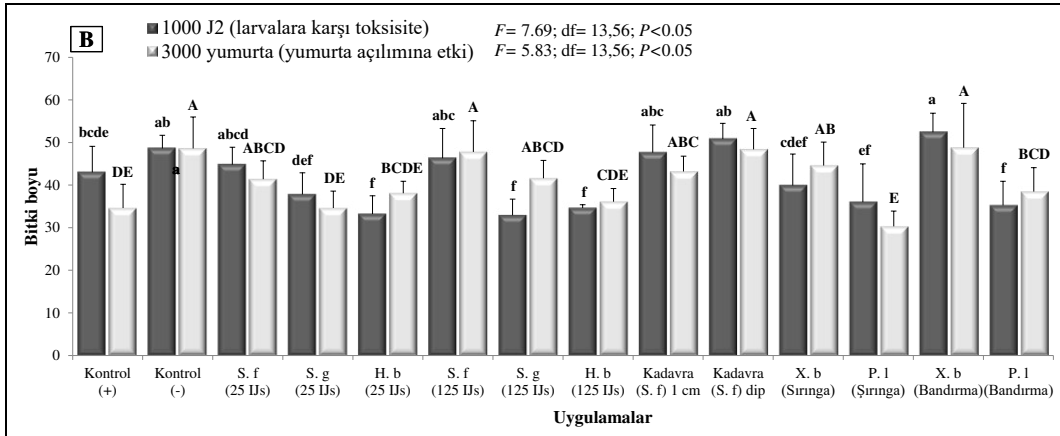
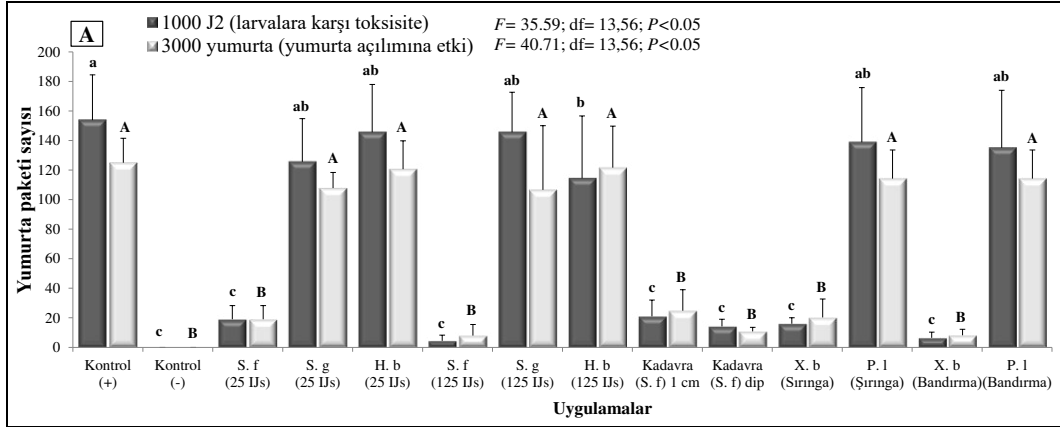
3.1. Bulgular

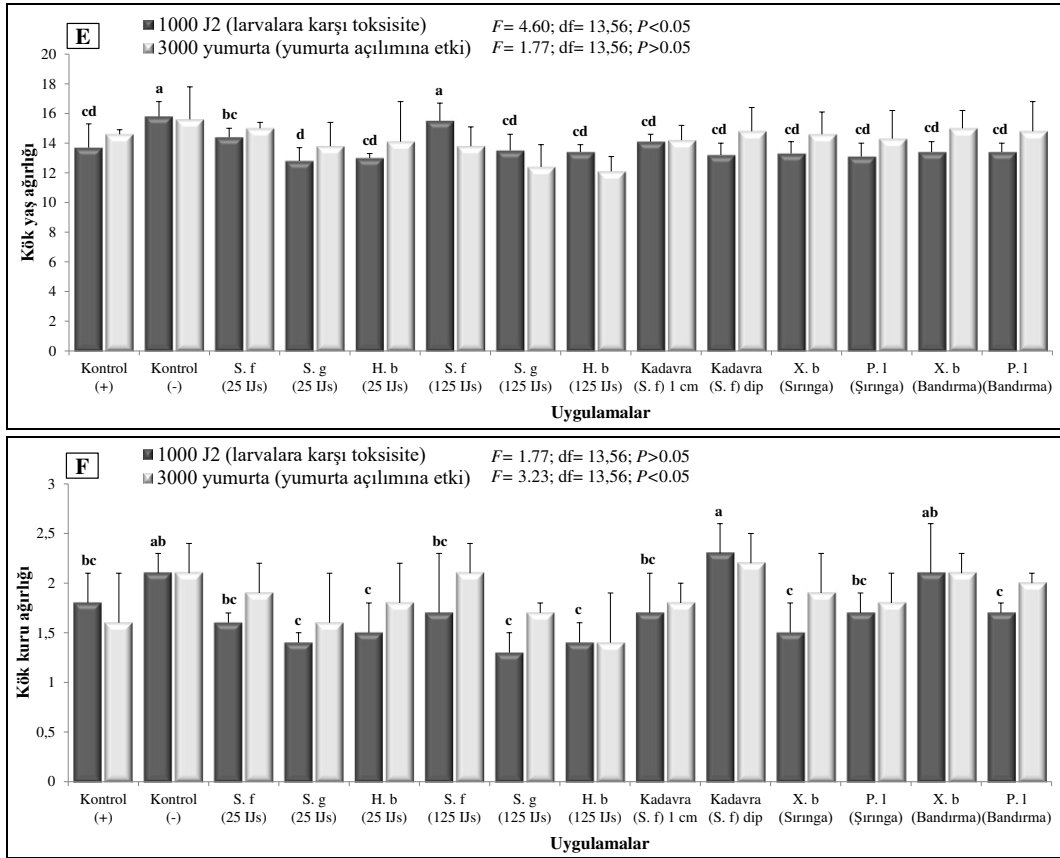
Çalışmalar, yumurta açılımına ve larvaya toksisite açısından değerlendirildiğinde.

Yumurta paketi sayısı yönüyle deneme sonuçları değerlendirildiğinde; özellikle +kontrol'e baktığımızda yumurta açılımına etki çalışmalarında, larvaya toksisite çalışmalarına göre daha az yumurta paketi oluşumu gözlenmiştir (215.8'e karşın 96.6 yumurta paketi bitki⁻¹). **Yumurtaya etki** çalışmaları kapsamında yapılan bütün uygulamalar sonucu bitkilerde oluşan yumurta paketi sayısı +kontrol (96.6 yumurta paketi bitki⁻¹)'ün altında bulunmuştur.

S.f 25, *H.b* 25, *S.g* 25 IJ cm⁻², *X.b* (şırınga), ve *P.l* (bandırma) uygulamaları hariç tüm uygulamalarda yumurta paketi sayısı 20'nin altındadır. En düşük yumurta paketi sayısı *X.b* (bandırma) ile *S.f* (kadavra-dip)'de görülmüştür (7.6 ve 9.2 yumurta paketi bitki⁻¹) (F= 14.16; df= 12.51; P<0.05). **Larvaya toksisite** denemelerinde ise; en yüksek etkiyi *S.f* (kadavra-dip), *S.f* 125, 25 IJ cm⁻² ve *X.b* (bandırma) uygulamaları göstermiştir (16.6, 18.6, 26 ve 26.2 yumurta paketi bitki⁻¹) (F= 14.16; df= 12.51; P<0.05) (Şekil 1 A).

Bu denemelerde elde edilen sonuçlar, yumurta açılımına etki denemelerinde elde edilen sonuçlarla uyum içerisinde bulunmuştur. Tüm denemeler birlikte değerlendirildiğinde *X.b* (bandırma), *S.f* (kadavra-dip), *S.f* 25 ve 125 IJ cm⁻² uygulamaları etkili bulunmuştur.





Şekil 1. Dört entomopatojen nematod türünün [*Steinernema carpocapsae* (S.c), *S. feltiae* (S.f), *S. glaseri* (S.g), *Heterorhabditis bacteriophora* (H.b)] ve simbiyont bakterilerinin [*Xenorhabdus bovienii* (X.b), *Photorhabdus luminescens kayaii* (P.l)] *Meloidogyne javanica*'ya karşı etkinliği (yumurta açılımına etki, 3000 yumurta ml^{-1} ve larvaya toksisite, 1000 L2 ml^{-1}) [(-) Kontrol (sadece su uygulanan), (+) Kontrol (sadece nematod uygulanan)]. (A) bitki kökündeki kök-ur nematodlarına ait yumurta paketi sayısı, (B) bitkinin boyu (cm), (C) bitki üst aksam yaş ve (D) kuru ağırlığı (g) ve (E) kök yaş ve (F) kuru ağırlığı (g).

Figure 1. Effect of four entomopathogenic nematodes [*Steinernema carpocapsae* (S.c), *S. feltiae* (S.f), *S. glaseri* (S.g), *Heterorhabditis bacteriophora* (H.b)] and bacterial supernatant [*Xenorhabdus bovienii* (X.b), *Photorhabdus luminescens kayaii* (P.l)] on *Meloidogyne javanica* reproduction (egg hatching test, 3000 eggs ml^{-1} were applied and mortality test, 1000 J2s ml^{-1} were applied) [(-) Control (water only), (+) Control (nematodes only)]. (A) total number of egg masses, (B) plant height (cm), (C) fresh and (D) dry weight of plant shoots (g) and (E) fresh and (F) dry weight of plant roots (g). Different letters above bars indicate statistical differences ($P < 0.05$, based on Duncan test).

Bitki boyuna etki yönüyle deneme sonuçları değerlendirildiğinde; **yumurtaya etki** çalışmaları kapsamında kurulan denemelerde *X.b* (bandırma) uygulamaları (66.2 cm) hariç diğer tüm uygulamalara ait bitkiler -kontrol (64.8 cm) bitkilerinin boyundan kısa bulunmuştur. +kontrole göre değerlendirme yapıldığında tüm uygulamalarda bitki boyları kontrolün üzerinde bulunmuştur (29.2 cm'den daha uzun) ($F=11.29$;

$df=13.55$; $P<0.05$). **Larvaya toksisite** denemelerinde ise bazı uygulamalar [*S.f*, *H.b*, *S.g* 25 IJ, *S.g*, *H.b* 125 IJ, *S.f* (kadavra-1 cm), *X.b* (şırınga) ve *P.l* (bandırma)] +kontrole göre daha kısa boylu bitkilere sahip olduğu görülmektedir (41.8 cm karşın, 38.7, 38.2, 38.4, 35.2, 41, 41.04, 41.5, 32.2 ve 39.8 cm). En yüksek etki veya en uzun bitkilere sahip uygulama 46.3 cm ile *X.b* (bandırma)'da görülmüş ve bunu *S.f* 125 IJ

uygulamaları 44.9 cm ile izlemiştir (F= 14.16; df= 12.51; P<0.05) (Şekil 1 B).

Bitki yaş ağırlığına etki yönüyle deneme sonuçları değerlendirildiğinde; **yumurtaya etki** çalışmalarında yüksek etkileri (yüksek ağırlığa sahip uygulamalar) *S.g*, *H.b* 25 IJ, *S.f*, *S.g*, *H.b* 125 IJ ile *X.b*'nin her iki uygulaması göstermiştir (13.08, 12.76, 13.06, 14.34, 12.6, 13.36, 11.76 g). Bu uygulamalar istatistiki olarak -kontrolle aynı grupta yer almışlardır (F= 11.43; df= 13.55; P<0.05). **Larvaya toksisite** denemelerinde ise en ağır bitkiler *S.f* 125 IJ, *S.f* (kadavra-dip) ve *X.b*'nin her iki uygulamasının yapıldığı denemelerde tespit edilmiştir (14.29, 14.08, 14.56 ve 14.53 g) (F= 14.16; df= 12.51; P<0.05) (Şekil 1 C).

Bitki kuru ağırlığına etki yönüyle deneme sonuçları değerlendirildiğinde; **yumurtaya etki** denemelerinde en yüksek etkiyi *S.f* 125 IJ (1.92 g) gösterirken (F= 10.67; df= 12.51; P<0.05); **larvaya toksisite** denemelerinde *S.f* (kadavra-1 cm) ile *X.b*'nin her iki uygulaması göstermiştir (F= 14.16; df= 12.51; P<0.05) (Şekil 1 D). Bu uygulamalar -kontrol uygulamalarıyla istatistiki olarak aynı grupta yer almışlardır.

Kök yaş ağırlığına etki yönüyle deneme sonuçları değerlendirildiğinde; **yumurtaya etki** açısından *S.g* 125 IJ en fazla kök ağırlığına sahip bulunmuştur (F= 19.96; df= 12.51; P<0.05). **Larvaya toksisite** çalışmalarında ise uygulamalar arasında kontrol gruplarına göre istatistiki olarak farklılık bulunamamıştır (P>0.05) (Şekil 1 E).

Kök kuru ağırlığına etki yönüyle deneme sonuçları değerlendirildiğinde; **yumurtaya etki** çalışmalarında *S.g* 125 IJ, *S.f* (kadavra-dip) ve *X.b* (şırınga) uygulamaları en yüksek etkiye (en ağır bitkilere) sahip bulunmuşlardır (1.60, 1.61 ve 1.58 g). Kuru kök ağırlıkları +kontrolde 0.40 g iken -kontrolde 1.85 g olarak tespit edilmiştir (F= 29.66; df= 12.51; P<0.05). **Larvaya toksisite** çalışmalarında ise uygulamalar arasında kontrol gruplarına göre istatistiki olarak farklılık bulunamamıştır (P>0.05) (Şekil 1 F).

Tüm parametrelere ait yumurtaya etki ve larvaya toksisite deneme sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; EPN ve simbiyont bakterilerin (*S.c*, *S.f*, *S.g*, *H.b*, *X.b* ve *P.l*)

kullanıldığı çalışmalarda, EPN'lerden *S.f*'nin her iki konsantrasyonu, kadavra uygulamaları ile simbiyont bakterilerden *X. b*'nin her iki uygulama şekli de (şırınga ve bandırma) yüksek etki göstermiştir. En önemli parametre olan domates bitkilerinin köklerindeki yumurta paketi sayıları değerlendirildiğinde; yumurtaya etki yönüyle, *S.f* 125 IJs cm⁻², *X.b* (bandırma), *S.f* kadavra (dip), *S.f* 25 IJs cm⁻², *X.b* (şırınga) ve *S.f* kadavra (1 cm) uygulamaları yüksek etki göstermiştir. Larvalara karşı olan toksisite (J2'lerin kullanıldığı) denemelerde; *S.f* 125 IJs, *X.b* (bandırma), *S.f* kadavra (dip), *X.b* (şırınga), *S.f* 25 IJs ve *S.f* kadavra (1 cm) uygulamaları yüksek etki göstermiştir. Çalışmalar sonucu yumurta ve J2'lerin kullanıldığı denemelerde yüksek etki gösteren *S.f* 25 ve 125 IJs cm⁻²; *S.f* kadavra uygulamaları ile simbiyont bakterilerden *X. b*'nin her iki uygulama şekli de (şırınga ve bandırma) doğa-sera denemeleri kapsamına alınarak etkilerinin araştırılması gerektiği kanısına varılmıştır.

Ülkemizde KUN'lere karşı EPN'lerin etkinliği ile ilgili ilk çalışma *M. incognita*'ya karşı yürütülmüştür (Bulun et al., 2009). Söz konusu çalışmada araştırmacılar *H. bacteriophora* ve *S. feltiae*'yı *M. incognita*'ya karşı laboratuvar koşullarında denemişler ve domates bitkisi köklerinde urlanmanın azaldığını kayıt etmişlerdir. Bu çalışmada *S. feltiae*'nın *M. javanica*'ya karşı etkili olduğu, köklerde yumurta paketi sayısını ve urlanmayı azalttığı görülmüştür (Şekil 1 A).

Dünya'da EPN'lerin KUN'lere karşı kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde; 9 farklı EPN türü (*S. feltiae*, *S. riobrave*, *S. carpocapsae*, *S. glaseri*, *S. masoodi*, *H. bacteriophora*, *H. indica*, *H. zealandica* ve *H. baujardi*) KUN'lere karşı denenmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır (Gouge et al., 1994; Grewal et al., 1997; 1999; Lewis et al., 2001; Fallon et al., 2002; Perez and Lewis 2002; 2004; Lewis et al., 2005; Khan et al., 2010; Del Valle et al., 2013). Fakat başarılı sonuçların alınmadığı çalışmalar da bulunmaktadır (Smitley et al., 1992; Riegel et al., 1998; Nyczepir et al., 2004; Shapiro-Ilan et al., 2006). Bu çalışmada da

S. feltiae *M. javanica*'ya karşı etkili olurken, denemelerde kullanılan diğer EPN türlerinin (*S. feltiae*, *S. glaseri* ve *H. bacteriophora*) çok etkili olmadığı sonucuna varılmıştır.

EPN'lerin KUN'lere karşı etkinliği ile ilgili araştırmalar incelendiğinde çalışmalarda öngörülen konsantrasyonlarla ilgili standart bir uygulamaya rastlanmamıştır. *S. glaseri*'yi 5×10^5 IJ (Bird and Bird 1986), *H. bacteriophora*'yı 2.47×10^9 ve *S. carpocapsae*'yi 2.08×10^9 IJ ha⁻¹ karışık popülasyon olarak (Smitley et al., 1992) uygulamışlardır. Grewal et al. (1997) ise tek uygulama olarak 2.47×10^9 *S. riobrave* IJ ha⁻¹ olarak bitki paraziti nematodlara karşı alan uygulamaları yapmışlardır. Perez and Lewis, (2002) yaptıkları çalışmada *M. incognita* ile bulaşık domates bitkilerinde EPN'leri test etmişlerdir. Araştırmacılar bitkilere *M. incognita* bulaştırmadan önce ve sonra olmak üzere iki uygulama yapmışlardır. Bu uygulamalarda kullandıkları EPN (*S. feltiae*, *S. riobrave* ve *H. bacteriophora*) konsantrasyonlarını 2.5×10^9 ve 12.5×10^9 IJ ha⁻¹ (25 ve 125 IJs cm⁻²) olarak vermişler ve başarılı sonuçlar aldıklarını bildirmişlerdir. Lewis et al. (2001) böceklere karşı yaygın olarak kullanılan EPN konsantrasyonunu (25 IJs cm⁻²), *S. feltiae* olarak *M. incognita*'ya karşı denemiş; gal sayısında, yumurta üretimi ve yumurta açılımında düşüş olduğunu kaydetmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan *S. feltiae*'nin iki konsantrasyonu da (25 ve 125 IJs cm⁻²) *M. javanica* tarafından meydana getirilen yumurta paketi sayısında düşüşe neden olmuş fakat 125 IJs konsantrasyonu daha etkili bulunmuştur.

EPN'lerin bitki paraziti nematodlara karşı uygulanmasında çok sayıda farklı metod bulunmaktadır. En yaygın kullanılan yöntem EPN'lere ait IJ'lerin sulu süspansiyon olarak direkt uygulanması şeklindedir (Bird and Bird, 1986; Ishibashi and Kondo 1986; Grewal et al., 1997; Perry et al., 1998; Riegel et al., 1998; Smitley et al., 1992; Fallon et al., 2002; Lamondia and Cowles, 2002; Perez and Lewis 2002; 2004; Khan et al., 2010). Böcek kadavrası içinde bulunan EPN'lerin uygulandığı (kadavra uygulamaları) az sayıda çalışmada bulunmaktadır

(Grewal et al., 1999; Shapiro-Ilan et al., 2006; Del Valle et al., 2013). Ayrıca EPN'lerin simbiyotik bakterilerinin (*Xenorhabdus* ve *Photorhabdus*) kullanıldığı çalışmalarda mevcuttur (Grewal et al., 1999; Lewis et al., 2001; Fallon et al., 2004; Shapiro-Ilan et al., 2006; Lewis and Grewal 2005; Aatif et al., 2012). Bu çalışmaların çoğu KUN'lere karşı yapılmıştır. Bu çalışmada, hem sulu süspansiyon (25 ve 125 IJ cm⁻²) hem de kadavra içinde EPN uygulamaları [*S.f* (kadavra-dip) ve *S.f* (kadavra-1 cm)] birlikte deneme planına alınmıştır. *S.f*'nin her iki konsantrasyonu, kadavra uygulamaları yüksek etki göstermiştir. EPN ile simbiyotik olarak yaşayan ve konukçularının ölümüne neden olan bakteriler [*(X.b)* ve *(P.I)*] 2 farklı şekilde uygulanmıştır (şırınga ve bandırma). *X.b* (bandırma) etkili olurken diğer bakteri ve uygulamaları aynı etkiyi göstermemiştir.

4. Sonuç

Bu çalışma sonucu elde edilen bulgular ile ülkemizde önemli örtüaltı sebze yetiştiriciliği yapılan bölgelerde kurulan doğa-sera denemeleri sonuçları tartışılarak elde edilecek bulguların uygulamaya aktarılması ile ülkemizde KUN'lere karşı kimyasal mücadele alanları daraltılarak pestisit kullanımı azaltılacaktır. Böylece çevre ve insan sağlığı açısından daha güvenli ve sürdürülebilir mücadele yöntemlerinin kullanım olanakları gündeme gelecektir.

Teşekkür

Çalışmalarda kullanılan *Meloidogyne javanica* kültürünü veren Doç. Dr. Zübeyir DEVRAN (Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Antalya), EPN'leri ve simbiyotik bakterileri üreten Prof. Dr. Selçuk HAZIR (Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Ana Bilim Dalı, Aydın)'a, çalışmaların bazı aşamalarında yardımcı olan Dr. F. Dolunay ERDOĞUŞ ve Dr. Tuba KATI ÇEKENGİL (Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü, Ankara)'e ve çalışmayı desteklediği (Proje No: 111O784) için TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Kaynaklar

- Aatif HM, Javed N, Khan SA and Ahmed S (2012). Virulence of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria and their toxins against juvenile's immobilization of *Meloidogyne incognita*. Pakistan Journal of Phytopathology, 24: 170-174.
- Akhurst RJ (1982). Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. Journal of General Microbiology, 128: 3061-3065.
- Anonymous (2010). *Ruhsatlı Bitki Koruma Ürünleri*, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Pulat Basımevi. 398 sayfa.
- Bird AF and Bird J (1986). Observations on the use of insect parasitic nematodes as a means of biological control on root-knot nematodes. International Journal of Parasitology, 16: 511-516.
- Bulun N, Güneş Ç ve Gözel U (2009). Entomopatogen Nematodların Kök ur Nematodu (*Meloidogyne incognita*, Tylenchida: Meloidogynidae) Üzerine Etkinliğinin Belirlenmesi, *Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi*, Van, 370.
- Daykin ME and Hussey RS (1985). Staining and histopathological techniques in nematology. In: Barker KR, Carter CC and Sasser JN (Eds), *An advanced treatise on Meloidogyne Volume II: Methodology*, North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina, USA, pp. 39-48.
- Del Valle EE, Lax P, Dueñas JR and Doucet ME (2013). Effects of insect cadavers infected by *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema diaprepesi* on *Meloidogyne incognita* parasitism in pepper and summer squash plants. Ciencia e Investigación Agraria, 40: 109-118.
- Fallon DJ, Kaya HK, Gaugler R and Sipes BS (2002). Effects of entomopathogenic nematodes on *Meloidogyne javanica* on tomatoes and soybeans. Journal of Nematology, 34: 239-245.
- Gouge DH, Otto AA, Schirocki A and Hague NGM (1994). Effects of Steinernematids on the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*. Tests of Agrochemicals and Cultivars No. 15. Annals of Applied Biology Supplement, 124: 134-135.
- Grewal PS, Lewis EE, Venkatachari S (1999). Allelopathy: A possible mechanism of suppression of plant-parasitic nematodes by entomopathogenic nematodes. *Nematology* 1: 735-743.
- Grewal PS, Martin WR, Miller RW and Lewis EE (1997). Suppression of plant-parasitic nematode populations in turfgrass by application of entomopathogenic nematodes. Biocontrol Science and Technology, 7: 393-399.
- Gulcu B and Hazir S (2012). An alternative storage method for entomopathogenic nematodes. Turkish Journal of Zoology, 36: 562-565.
- Gulcu B, Hazir S and Kaya HK (2012). Scavenger deterrent factor (SDF) from symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes. Journal of Invertebrate Pathology, 110: 326-333.
- Haydak MH (1936). "A food for rearing laboratory insect". Journal of Economic Entomology, 29: 1026.
- Hussey RS and Barker KR (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. Plant Disease Reporter, 57: 1025-1028.
- Ishibashi N and Kondo E (1986). *Steinernema feltiae* (DD-136) and *S. glaseri*: Persistence in soil and bark compost and their influence on native nematodes. Journal of Nematology, 18: 310-316.
- Kepenekçi İ (2014a). Nematolojik Çalışmalar için Arazi ve Laboratuvar Uygulama Kılavuzu, *Nematoloji El Kitabı*. ISBN: 978-605-4627-71-9, Siyasal Kitabevi, XXII+455 sayfa.
- Kepenekçi İ (2014b). Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae: Rhabditida) of Turkey. Pakistan Journal of Nematology, 32: 59-65.
- Khan MR, Mehboob A and Khan U (2010). Interaction of the entomopathogenic nematode *Steinernema masoodi* and the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato. Nematologia Mediterranea, 38: 179-185.
- Lamondia JA and Cowles RS (2002). Effect of entomopathogenic nematodes and *Trichoderma harzianum* on the strawberry black root rot pathogens *Pratylenchus penetrans* and *Rhizoctonia fragariae*. Journal of Nematology, 34: 351-357.
- Lewis EE and Grewal PS (2005). Interactions with plantparasitic nematodes. In: PS Grewal, R-U Ehlers and DI Shapiro-Ilan (Eds) *Nematodes as biocontrol agents*. New York: CABI, pp. 349-362.
- Lewis EE, Grewal PS and Sardanelli S (2001). Interactions between the *Steinernema feltiae*-*Xenorhabdus bovienii* insect pathogen complex and the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Biological Control, 21: 55-62.
- Melakeberhan H (1997). Effect of temperature and nitrogen source on tomato genotypes response to *Meloidogyne incognita* infection. Fundamental and Applied Nematology, 20: 1-8.
- Mohamed MA and Coppel HC (1983). Mass rearing of the greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) for small-scale laboratory studies. Great Lakes Entomologist, 16: 139-141.
- Mohammad AB, Eskandar Z, Saeid S, Mohammad J and Fariba M (2007). Evaluation of sulfosulfuran for broadleaved and grass weed control in

- wheat (L.) in Iran. *Crop Protection*, 26: 1385-1389.
- Molina JP, Dolinski C, Souza RM and Lewis EE (2007). Effect of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) on *Meloidogyne mayaguensis* Rammah and Hirschmann (Tylenchida: Meloidoginidae) infection in tomato plants. *Journal of Nematology*, 39: 338-342.
- Nakasone KK, Peterson SW and Jong SC (2004). Preservation and Distribution of Fungal Cultures. In: GM Mueller, GF Bills and MS Foster (Eds), *Biodiversity of fungi, Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press, pp. 47-37.
- Netscher C and Sikora RA (1990). Nematode parasites of vegetables. In: M Luc, RA Sikora and J Bridge (Eds), *Plant Parasitic nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. CAB International, Wallingford, U.K., pp. 237-284.
- Nyczepir A, Shapiro-Ilan DI, Lewis EE and Handoo Z (2004). Effect of entomopathogenic nematodes on *Mesocriconema xenoplax* populations in peach and pecan. *Journal of Nematology* 36: 181-185
- Perez EE and Lewis EE (2002). Use of entomopathogenic nematodes to suppress *Meloidogyne incognita* on greenhouse tomatoes. *Journal of Nematology*, 34: 171-174.
- Perez EE and Lewis EE (2004). Suppression of *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne hapla* with entomopathogenic nematodes on greenhouse peanuts and tomatoes. *Biological Control*, 30: 336-341.
- Perry RN, Hominick WM, Beane J and Briscoe B (1998). Effect of entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* and *S. carpocapsae*, on the potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, in pot trials. *Biocontrol Science and Technology*, 8: 175-180.
- Riegel C, Dickson DW, Nguyen KB and Smart GC (1998). Management of root-knot nematodes with entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology Supplement*, 24: 637-641.
- Shapiro-Ilan DI, Nyczepir A and Lewis EE (2006). Entomopathogenic nematodes and bacteria applications for control of the pecan root-knot nematode, *Meloidogyne parityla*, in the greenhouse. *Journal of Nematology*, 38: 449-454.
- Siddiqi MR (1986). *Tylenchida parasites of plants and insects*. Farnham Royal, UK: Commonwealth Agricultural Bureaux, 645 pp.
- Smith D and Onions AHS (1994). *The Preservation and Maintenance of Living Fungi*. CAB International Bakeham Lane Egham-England, 122 pp.
- Smitley DR, Warner FW and Bird GW (1992). Influence of irrigation and *Heterorhabditis bacteriophora* on plant-parasitic nematodes in turf. *Journal of Nematology Supplement*, 24: 637-641.
- Somvanshi VS, Lang E, Straubler B, Sproer C, Schumann P, Ganguly S, Saxena AK and Stackebrandt E (2006). *Providencia vermicola* sp. nov., isolated from infective juveniles of the entomopathogenic nematode *Steinernema thermophilum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 629-633.
- SPSS (1999). *SPSS for Windows*, release 10.0.1. Chicago, IL, USA, SPSS.
- Stirling GR (1991). *Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes*. CAB International, Wallingford, Oxon, pp. 50-85.
- Thomas HA and Poinar GO (1979). *Xenorhabdus* gen. Nov. A genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family enterobacteriaceae int. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 29: 352-360.
- White GF (1927). A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*, 66: 302-303.
- Whitehead AG (1998). *Plant Nematode Control*. CAB International, New York, USA, pp. 209-236.
- Woodring JL and Kaya HK (1988). *Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes*. Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, A.K., A hand Book of Techniques Southern Cooperative Series Bulletin, 331, 30 p.