Doktora Tezi

Uğur Azizoğlu

Biyoloji Anabilim Dalı

2014

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bacillus thuringiensis SY49-1 SUŞUNA AİT *cry1* VE *cry2* GENLERİNİN KLONLANMASI, İFADESİ VE BÖCEK ÖLDÜRÜCÜ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Hazırlayan
Uğur AZİZOĞLU

Danışman
Doç. Dr. Abdurrahman AYVAZ
Doç. Dr. Semih YILMAZ

Doktora Tezi

Ağustos 2014
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bacillus thuringiensis SY49-1 SUŞUNA AİT *cry1* VE *cry2* GENLERİNİN KLONLANMASI, İFADESİ VE BÖCEK ÖLDÜRÜCÜ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Hazırlayan
Uğur AZİZOĞLU

Danışman
Doç. Dr. Abdurrahman AYVAZ
Doç. Dr. Semih YILMAZ

Doktora Tezi

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FBD-11-3634 ve ÖNAP-3638 ile Tekno Girişim Sermayesi 0802.TGSD kodlu projeleriyle desteklenmiştir

Ağustos 2014
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Uğur AZİZOĞLU



YÖNERGEYE UYGUNLUK

***Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşuna Ait *cry1* ve *cry2* Genlerinin Klonlanması, İfadesi ve Böcek Öldürücü Etkilerinin Belirlenmesi** adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Uğur AZİZOĞLU

Danışmanları

Doç. Dr. Abdurrahman AYVAZ

Doç. Dr. Semih YILMAZ

Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ

Biyoloji ABD Başkanı

Doç. Dr. Abdurrahman AYVAZ ve Doç. Dr. Semih YILMAZ danışmanlığında **Uğur AZİZOĞLU** tarafından hazırlanan "***Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşuna Ait *cry1* Ve *cry2* Genlerinin Klonlanması, İfadesi Ve Böcek Öldürücü Etkilerinin Belirlenmesi**" adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

18/08/2014

JÜRİ:

Danışman	: Doç. Dr. Abdurrahman AYVAZ
Üye	: Doç. Dr. Mikail AKBULUT
Üye	: Doç. Dr. Sevil ALBAYRAK
Üye	: Doç. Dr. Ayşe TOLUK
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Ramazan MERT

ONAY:
Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 16/09/2014 tarih ve 2014/42-04 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

16 / 09 / 2014

Prof. Dr. Kazım KEŞLİOĞLU

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca farklı bakış açıları ve bilimsel katkılarıyla beni aydınlatan yardımlarını esirgemeyen, bu günlere gelmemde büyük katkıları olan, akademik hayatım boyunca kendilerini örnek almaktan onur duyacağım sayın hocalarım Doç. Dr. Abdurrahman AYVAZ ve Doç. Dr. Semih YILMAZ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez İzleme Komitesi toplantılarında bilgi ve desteklerinden faydalandığım hocalarım Prof. Dr. Rıfkıt ÖZKANCA ve Doç. Dr. Mikail AKBULUT'a, her türlü destek ve yardımlarından dolayı Tomarza Mustafa Akıncıoğlu MYO Müdürü Doç. Dr. Ahmet ERDİNÇ ve Müdür Yardımcısı Yrd. Doç. Dr. Sancar BULUT'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarından dolayı Dr. Salih KARABÖRKLÜ, Uzm. Rıdvan TEMİZGÜL, Enfal ÇÖMLEKÇİ, Zehra Büşra ATCIYURT'a, bu günlere gelmemde emeği geçen aileme ve ayrıca doktora çalışmalarım boyunca ihmal ettiğim ev işleri ve sorumluluklarını anlayışla ve sabırla karşılayan ev arkadaşım, kadim dostum Ziraat Yüksek Mühendisi Ahmet SAY'a teşekkür ederim.

Ayrıca eğitim ve öğretim hayatım boyunca bana güvenen, inanan ve her türlü maddi ve manevi desteğini esirgemeyen babam Sayın Bekir AZİZOĞLU'na saygı ve şükranlarımı sunarım.

Bu tez çalışmasına maddi destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: FBD-11-3634 ve ÖNAP-3638) ve Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı'na (Proje No:0802.TGSD**)** teşekkür ederim.

Uğur AZİZOĞLU

Kayseri, Ağustos 2014

Bacillus thuringiensis SY49-1 SUŞUNA AİT *cry1* VE *cry2* GENLERİNİN KLONLANMASI, İFADESİ VE BÖCEK ÖLDÜRÜCÜ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Uğur AZİZOĞLU
Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Doktora Tezi, Ağustos 2014
Danışmanlar: Doç. Dr. Abdurrahman AYVAZ
Doç. Dr. Semih YILMAZ

ÖZET

Bacillus thuringiensis (*Bt*) birçok zararlı böcek üzerinde toksik etki gösteren gram pozitif bir bakteridir. *Bt*'nin birçok suşu birden fazla *cry* gen bulundurur ve farklı konukçu spektrumuna sahiptir. Bu çalışmaya konu olan *Bt* SY49-1 suşu *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry5* ve *cry9* olmak üzere beş adet *cry* gen taşımaktadır. Bu çalışma *Ephestia kuehniella* ve *Culex pipiens* larvalarına karşı *cry1* ve *cry2* gen ürünlerinin toksisite seviyelerini belirlemek için planlanmıştır. Bu nedenle *Bt* SY49-1 suşunun *cry1Ab* ve *cry2* genleri pET28a(+) ifade vektörüne ligasyon yapılarak pET-*cry1Ab* ve pET-*cry2* rekombinant plazmitleri elde edilmiştir. Bu plazmitler $CaCl_2$ metodu ile kompetan hale getirilmiş *E. coli* BL21(DE3) suşuna aktarılmıştır. Bu genlerin *E. coli* BL21(DE3) suşunda ifadesini güçlendirmek amacıyla IPTG indüklemesi yapılmıştır. İndükleme sonucunda sırasıyla ~130 ve ~70 kDa büyüklüğünde rekombinant Cry1Ab ve Cry2 proteinleri elde edilmiştir. Yapılan aktivite denemlerinde *E. kuehniella* larvalarına karşı Cry1Ab ve Cry2 toksinlerinin 1000 µg\gör'lük dozu % 64 oranında ölüme sebep olmuştur. Aynı toksinler eşit hacimde karıştırılıp (Cry1Ab+Cry2) uygulandığında ise % 65 oranında ölüm meydana gelmiştir. *Bt* SY49-1 suşunun spor-kristal karışımının aynı dozu uygulandığında ise larvaların % 90'ı ölmüştür. Plazmit taşımayan *E. coli* BL21(DE3) uygulandığında ise aynı dozda önemli bir ölüm oranı (% 10) gözlenmemiştir. *Bt* SY49-1 spor-kristal karışımının 500 µg\ml'lik dozu *C. pipiens* larvalarının tamamına yakınını (% 97) öldürmüşken, rekombinant Cry2 proteini ve *E. coli* BL21 (DE3) suşu aynı zararlı üzerinde sırasıyla % 37 ve % 10 oranında ölüme neden olmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Bt* SY49-1, Gen klonlama, Rekombinant Cry1Ab ve Cry2 proteini, *E. kuehniella*, *C. pipiens* İnsektisidal aktivite

CLONING, EXPRESSION AND INSECTICIDAL ACTIVITY OF *cry1* AND *cry2* GENES FROM *Bacillus thuringiensis* SY49-1 STRAIN

Uĵur AZIĶZOĴLU

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

Ph. D. Thesis, August 2014

Supervisors: Assoc. Prof. Dr. Abdurrahman AYVAZ

Assoc. Prof. Dr. Semih YILMAZ

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis (*Bt*) is a gram positive soil bacteria and has insecticidal activity against many important insect pests. Many strains of the *Bt* may harbour more than one *cry* genes and has different host spectrum. *Bacilus thuringiensis* SY49-1 strain , used in this study, has five *cry* genes being *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry5* and *cry9*. This study has planned to determine the toxicity levels of *cry1Ab* and *cry2* genes against *Ephestia kuehniella* and *Culex pipiens* larvae. For this purpose pET-*cry1Ab* and pET-*cry2* recombinant plasmids were constructed thorugh ligating the *cry1Ab* and *cry2* genes of *Bt* SY49.1 strain into pET28a(+) expression vector. Consequently, the recombinant plasmids were transfered to *E. coli* BL21(DE3) strain rendered competent with $CaCl_2$ method. IPTG induction was carried out to improve the expression of the genes in *E. coli* BL21(DE3). As a result of induction ~130 and ~70 kDa Cry1Ab and Cry2 proteins were obtained, respectively. The bioassay results indicated that recombinant Cry1Ab and Cry2 toxins at dose of 1000 µg\g caused 64 % mortality on *E. kuehniella* larvae. When the same proteins were mixed (Cry1Ab+Cry2) at the equal amount and applied to the same pest, 65 % mortality rates were obtained. However, the same dose of spor crystal mixture of the *Bt* SY49-1 strain caused 90 % mortality. Plasmid free *E. coli* BL21(DE3) strain used as controls did not cause significant mortality (% 10) at the same dose. In the bioassay conducted with *C. pipiens*, while 500 µg\ml dose of *Bt* SY49-1 spor-crystal mixture caused nearly complate mortality (97 %), recombinant Cry2 and *E. coli* BL21 (DE3) strains had only 37 % and 10 % mortality, respectively.

Keywords: *Bt* SY49-1, Gene clonning, Recombinant Cry1Ab and Cry2 proteins, *E. kuehniella*, *C. pipiens*, Insecticidal activity

İÇİNDEKİLER

Bacillus thuringiensis SY49-1 SUŞUNA AİT _cry1_ ve _cry2_ GENLERİNİN KLONLANMASI, İFADESİ VE BÖCEK ÖLDÜRÜCÜ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Sayfa

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ii
KABUL VE ONAY iii
TEŞEKKÜR iv
ÖZET v
ABSTRACT vi
İÇİNDEKİLER vii
KISALTMALAR VE SİMGELER xiii
TABLOLAR LİSTESİ xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ xv

GİRİŞ 1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Gen Klonlamanın Temel Prensibi ve DNA Analizleri 5
1.1.1. Gen Klonlama 5
1.1.2. Gen Klonlama Vektörleri 5
1.1.3. Plazmit Vektörleri ve Özellikleri 6
1.1.3.1. Plazmitlerin Temel Özellikleri 6
1.1.3.2. Plazmit Büyüklüğü ve Kopya Sayısı 7
1.1.3.3. _Escherichia coli_ için Klonlama Vektörleri 8
1.1.3.4. Plazmit Vektörlerinin Şimlendirilmesi 8

1.1.4. Gen Klonlamada Restriksiyon Enzimlerinin Önemi.é é é é é é .. 10
1.1.4.1. Küt Uçlar ve Yapışkan Uçlaré é é é é é é é é ...é 10
1.1.5. Gen Klonlamada Ligasyon Işlemié é é é é é é é é é é é é é . 11
1.1.6. Rekombinant DNA Molekülünün Seçilmesié é é é é é é é é é 12
1.2. Zararlı Böcek Kontrolünde Yaygın Kullanılan Entomopatojenik Ajanlaré .é . 15
1.2.1. Mikrobiyal Insektisitleré é é é é é é é é é é é é é é é ...15
1.2.1.1. Entomopatojenik Nematodlar.é é é é é é é é é é é . 15
1.2.1.2. Entomopatojenik Virus; *Baculovirus*é é é é é é é é é 16
1.2.1.3. Entomopatojenik Protozoa; *Nosema locustae*é é é 17
1.2.1.4. Entomopatojenik Fungus, *Beauveria bassiana*é é é é é . 17
1.2.1.5. Entomopatojenik Bakteri, *Bacillus thuringiensis*é é é é 18
1.2.1.5.1. *Bacillus thuringiensis*'in Tarihié é é é é é é é 18
1.2.1.5.2. *Bacillus thuringiensis*'in Yaşam Döngüsüé é .. 19
1.2.1.5.3. *Bacillus thuringiensis*'in Sınıflandırılmasıveé é .
Taksonomisié é é é é é é é é é é é é é é 20
1.2.1.5.4. *Bacillus thuringiensis*'in Plazmitlerié é é é é . 23
1.2.1.5.5. *Bacillus thuringiensis* Kristal (Cry) Proteinlerié 23
1.2.1.5.6. *Bacillus thuringiensis* Insektisidal Genlerininé .. ..
Yapısı ve Düzenlenmesié é é é é é é é é é 28
1.2.1.5.7. Cry Proteinlerinin Biyokimyasıve Işlevselé é ...
Proteomiği é é é é é é é é é é é é é é é . 31
1.2.1.5.8. Gram Negatif Konukçularda Insektisidal Protein...
Yapısié é é é é é é é é é é é é é é é . 32
1.2.1.5.9. *Bacillus. thuringiensis*'de Pestisidal Protein Yapısı
é é é é é é é é é é é é é é é é é é é . 34
1.2.1.5.10. *Bacillus thuringiensis*'in Transformasyonu 36
1.2.1.5.11. Cry Toksinlerinin Etki Mekanizmasıé é é é ..36
1.2.1.5.12. Cry Toksinlerine Karşı Böcek Direncié é é é 39
1.2.1.5.13. Insektisidal Aktivitenin Ötesinde *Bacillus*é é ..
***thuringiensis*é é é é é é é é é é é é ... 40**
1.2.1.5.13.1. *Bacillus thuringiensis*'in Kitinaz ve.....
β-1,3-glukanaz Aktivitesié é é 40

1.2.1.5.13.2. *Bacillus thuringiensis* Kitinazları 41
1.2.1.5.13.2.1. *Bacillus thuringiensis* Kitinazları ve Çevre 41
1.2.1.5.13.2.2. Çevre ve Gıda Endüstrisinde *B. thuringiensis* Kitinazları 42
1.2.1.5.13.3. *Bacillus thuringiensis*'in Hidrojen Siyanid (HCN) Etkisi 42
1.2.1.5.13.4. *Bacillus thuringiensis*'in Biyostimülatör Aktivitesi 43
1.2.1.5.13.4.1. İndol-3-Asetik Asit (IAA) 43
1.2.1.5.13.4.2. ACC deaminaz 43
1.2.1.5.13.5. *Bacillus thuringiensis*; Biyolojik Gübre Etkisi. 44
1.2.1.5.13.5.1. Fosfat Çözünümü 44
1.2.1.5.13.5.1.2. Siderofor (Demir taşıyıcı) Üretimi 45
1.2.1.5.14. *Bacillus thuringiensis*'in Önemi 45

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal 47
2.1.1. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşunun Kültüre Alınması ve Çoğaltılması 47
2.1.2. Çalışmalarda Kullanılan Bakteri Suşları 47
2.1.3. Oligonükleotid Primerler 47
2.1.4. Çalışmalarda Kullanılan Besi Ortamları 48
2.1.5. Klonlama Çalışmalarında Kullanılan Çözelti ve Materyaller 49
2.1.6. Plazmit DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler 53
2.1.7. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Çözeltiler 53
2.1.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler 53
2.1.9. Protein İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler 53
2.1.10. SDS-PAGE Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler 54
2.1.11. Böcek Kültürü 55
2.1.11.1. *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera, Pyralidae) 55
2.1.11.2. *Ephestia kuehniella* Kültürü 56

2.1.11.3. *Culex pipiens* Linnaeus (Diptera, Culicidae)é é é é é é é 56

2.1.11.4. *Culex pipiens* Kültürüé é é é é é é é é é é é é é é 57

2.2. Yöntemé . 58

2.2.1. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suúunun Kültüre Alõnmasõveé .é é é .

Çoğaltõlmasõé .. 58

2.2.2. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suúunun Gram Boyama Yöntemiyleé ...

Boyanmasõé 58

2.2.3. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suúunun Spor Boyama Yöntemiyleé é .

Boyanmasõé 59

2.2.4. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suúundan Total DNA Đzolasyonué é é é . 59

2.2.5. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suúundan Plazmit DNA Đzolasyonué é . 59

2.2.6. PCR Yöntemiyle *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suúunun 16SITSrDNA

Bölgesinin Çoğaltõlmasõé é é é é é é é é é é é é é é é é é ... 60

2.2.7. PCR Yöntemiyle *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suúunun *cry1Ab* ve

***cry2* Tüm Genom Bölgesinin Çoğaltõlmasõé é é é é é é é é é é . 61**

2.2.8. Agaroz Jelden DNA Saflaútõrma Đşlemié é é é é é é é é é é 62

2.2.8.1. Yõkama Tamponun (Wash Buffer) Hazõrlanmasõé é é é .. 62

2.2.8.2. Saflaútõrma Basamaklarõé é é é é é é é é é é é é ... 62

2.2.9. Klonlama Đşlemleri ve Basamaklarõé é é é é é é é é é é é ... 63

2.2.9.1. *cry1Ab* Geninin pGEM-T Easy Klonlama Vektörüne Aktarõlmasõé . 63

2.2.9.2. *cry2* Geninin pGEM-T Easy Klonlama Vektörüne Aktarõlmasõ..... 63

2.2.9.3. *Escherichia coli* DH5Ű Kompetan Hücre Hazõrlama veé é é 63

Transformasyon Đşlemlerié é é é é é é é é é é é é 63

2.2.9.3.1. *E. coli* DH5Ű Kompetan Hücre Hazõrlamaé é é ... 63

2.2.9.3.2. *E. coli* DH5Ű'a Rekombinant Plazmitleriné é é é

Transformasyonu é é é é é é é é é é é é .. 64

2.2.9.4. Rekombinant Plazmitlerin Đzolasyonu ve Restriksiyoné é é .

Endonükleazlar ile Muamelesié é é é é é é é é é é é 64

2.2.9.4.1. Rekombinant Plazmitlerin Đzolasyonué é é é .. 64

2.2.9.4.2. Restriksiyon Endonükleazlar ile Muameleé é é ... 65

2.2.9.5. *cry1Ab* Geninin pET28a (+) Ekspresyon Vektörüneé é é é ..

Aktarõlmasõé . 65

2.2.9.6. *cry2* Geninin pET28a (+) Ekspresyon Vektörüneé é é é é ...
Aktarılmasıé . 66
2.2.9.7. *cry1Ab* Geninin pET28a (+) Ekspresyon Vektörüyle Ligasyon
Işlemié ..66
2.2.9.8. *cry2* Geninin pET28a (+) Ekspresyon Vektörüyle Ligasyon
Işlemié ...67
2.2.9.9. *Escherichia coli* BL21(DE3) Kompetan Hücre Hazırlama ve...
Transformasyon Işlemlerié é é é é é é é é é é é é 67
2.2.9.9.1. *E. coli* BL21(DE3) Kompetan Hücre Hazırlamaé . 67
2.2.9.9.2. *E. coli* BL21(DE3)'e Rekombinant Plazmitleriné é
Transformasyonué é é é é é é é é é é é ... 68
2.2. 10. Rekombinant Plazmit Taşıyan *E.coli* BL21(DE3)Bakterisinde
Koloni PCR Ile Genlerin Varlığının Tespit Edilmesié é é é 68
2.2.11. Rekombinant Protein Ekspresyonu ve Izolasyonué é é é 68
2.2.12. SDS-PAGE Analizié é é é é é é é é é é é é é é é . 70
2.2.12.1.SDS-PAGE Jellerin Boyanmasıé é é é é é é é . 70
2.2.13. Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonununé é é ...
Belirlenmesié 70
2.2.14. *Ephestia kuehniella*'ya Karşı Rekombinant Proteinleriné é ...
Insektisidal Etkisinin Belirlenmesié é é é é é é é é .. 71
2.2.15. *Culex pipiens*'e Karşı Rekombinant Proteinlerin Insektisidal..
Etkisinin Belirlenmesié é é é é é é é é é é é é é ... 71
2.2.16. Istatistiksel Analizé é é é é é é é é é é é é é ... 72

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşué é é é é é é é é é é é é é é é ... 73
3.2. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşunun Morfolojik Özelliğié é é é é é é .. 73
3.3. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşunun Plazmit Profilié é é é é é é é .. 74
3.4. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşunun 16S-ITS rDNA Dizi Analizi Sonucué ... 75
3.5. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşunun *cry1Ab* Geninin Analizié é ..é 78
3.6. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşunun *cry2* Geninin Analizié é é é é é é 79
3.7. *cry1Ab* ve *cry2* Genlerinin Kesim Enzim Haritalarının Belirlenmesié é é é 80

3.8. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşunun *cry1Ab* Geninin Klonlanması 81
3.9. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşunun *cry2* Geninin Klonlanması 82
3.10. Rekombinant pGEM-T*cry1Ab* Plazmitinin *Escherichia coli* DH5Ş Transformasyonu 83
3.11. Rekombinant pGEM-T*cry2* Plazmitinin *Escherichia coli* DH5Ş Transformasyonu 83
3.12. Klonlama Işleminin Doğruluğunun Test Edilmesi 85
3.13. *cry1Ab* Geninin pET28a (+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması 86
3.14. *cry2* Geninin pET28a (+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması 87
3.15. Rekombinant pET-*cry1Ab* Plazmitinin *Escherichia coli* BL21(DE3)ğe Transformasyonu 88
3.16. Rekombinant pET-*cry2* Plazmitinin *Escherichia coli* BL21(DE3)ğe Transformasyonu 90
3.17. Koloni PCR ile Genlerin Varlığının Tespit Edilmesi 90
3.18. Rekombinant Cry1Ab Proteinin Ekspresyonu ve SDS-PAGE Analizi 91
3.19. Rekombinant Cry2 Proteinin Ekspresyonu ve SDS-PAGE Analizi 92
3.20. *Ephestia kuehniella* Üzerinde Rekombinant Cry1Ab ve Cry2 Proteinlerinin İnsektisidal Aktivitesi 94
3.21. *Ephestia kuehniella* Üzerinde Rekombinant Cry1Ab ve Cry2 Proteinlerinin Sinerjistik Aktivitesi 95
3.22. *Culex pipiens* Üzerinde Rekombinant Cry2 Proteini ve *Bacillus thuringiensis*. SY49-1 Suşunun Spor-Kristal Protein Karışımının İnsektisidal Aktivitesi 102

4. BÖLÜM
TARTIŞMA-SONUÇ

4.1. Tartışma-Sonuç 107

KAYNAKLAR 117
ÖZGEÇMİŞ 147

KISALTMALAR VE SİMGELER

SY	Semih Yıldırmaz
ATP	Adenozin tri fosfat
Amp	Amfilisin
Kan	Kanamisin
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
AMP	Adenozin mono fosfat
Bt	*Bacillus thuringiensis*
BC	*Bacillus cereus*
RE	Restriksiyon enzimi
DNA	Deoksiribo aükleik asit
r-RNA	Ribozomal ribo nükleik asit
X-gal	5-bromo-4-chloro-indolyl-ß-D-galactopyranoside
IPTG	isopropylthiogalactoside
MCS	Çoklu klonlama bölgesi
Cry	Kristal protein
cry	Kriptik gen
ICP	İnsektisidal kristal protein
Cyt	Sitolitik
VIP	Vejetatif insektisidal protein
3D	Üç boyutlu
TBB	Toksin bağlanma bölgesi
kDa	Kilo dalton
%	Yüzde
Kb	Kilo baz
^{o}C	Derece santigrad
bç	Baz çifti
dH_2O	Distile su
dNTP	Deoksi nükleotid trifosfat
DTT	Dithiothreitol
F	Forward (ileri)
g	Devir sayısı

gr	Gram
mg	Mili gram
ITS	Internal trancribed sequences
kb	Kilo baz
Orf	Açık okuma çerçevesi
KCl	Potasyum Klorür
M	Molar
$MgCl_2$	Magnezyum Klorür
ml	Mili litre
mM	Mili molar
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
R	Reverse (geri)
rDNA	Ribozomal DNA
rpm	Devir sayısı
εl	Mikro litre
µg	Mikrogram
dk	Dakika
ů	Sigma
ß	Beta
Ŭ	Alfa
L	Litre
cAMP	Siklik adenozin monofosfat,
AC	Adenilsiklaz
PKA	Protein kinaz A
EC	Ekto Domain
MPED	Membran Proximal Ekstraselluler Domain
TM	Transmembran Domain
CYTO	Sitoplazmik Domain
Chi	Kitinaz
GlcNAc	Kitin N-acetylglukozamin
ACC	1-Aminosiklopropan-1-karboksilik asit
H_2PO_4	Di-hidrojen monofosfat
$H(PO_4)_2$	Hidrojen di-fosfat

PSB	Fosfat çözücü bakteriler
PGPB	Bitki büyümesini teĸvik edeci bakteri
SOC	Super Optimal Broth
Tris-EDTA	Tris etilen diamintetra asetik asit
TAE	Tris-asetik asit
TBE	Tris-borik asit
TEMED	Tetra metil etilen diamin
SDS	Sodyum dedosil sülfat
UV	Ultraviyole
TE	Tris-EDTA
g	Yerçekimi ivmesi
OD	Optik yoĵ unluk
rpm	Dakikadaki devir sayēsē
HCl	Hidroklorik asit
H_3PO_4	Ortofosforik asit
BSA	Sę̄r serum albumin
LC	Öldürücü konsantrasyon

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Gen klonlama aşamaları 6
Şekil 1.2. Epizom oluşumu 7
Şekil 1.3. Ampisiline dirençlilik (amp^R) ,replikasyon orjini ve restriksiyon bölgelerinin gösterildiği pGEM-T Easy plazmit vektörünün haritası 9
Şekil 1.4. Kanamisin dirençlilik (kan^R) ,replikasyon orjini ve restriksiyon bölgelerinin gösterildiği pET28a ekspresyon plazmit vektörünün haritası 10
Şekil 1.5. Ligasyon işleminin şematik gösterimi. 12
Şekil 1.6. Rekombinant DNA molekülünün antibiyotik ve LacZ gen bütünlüğüne dayalı seçimi 14
Şekil 1.7. *Bacillus thuringiensis*'in farklı yerlerden izolasyonu 20
Şekil 1.8. *B. thuringiensis* SY49-1 gram boyama ışık mikroskobu görüntüsü. 21
Şekil 1.9. *B. thuringiensis* SY49-1 Cry protein mikroskop görüntüsü 22
Şekil 1.10. *B. thuringiensis* SY49-1 Cry protein elektron mikroskop görüntüsü 22
Şekil 1.11. BC gruba ait 20 farklı türün 16s r-RNA analizine göre akrabalık ilişkisi 23
Şekil 1.12. *B. thuringiensis*'e ait Cry proteinin domain I,II ve III'ün yapısı 25
Şekil 1.13. *B. thuringiensis*'e ait Cry1Ab proteinin yapısı 26
Şekil 1.14. *B. thuringiensis*'e ait Cry1Ab proteinin etki mekanizması 27
Şekil 1.15. *B. thuringiensis*'e ait Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry4Ba proteinlerinin yapısı ve etkili olduğu böcek grupları 27
Şekil 1.16. Cry1Ab proteinin reseptör bağlanma bölgesi 37
Şekil 1.17. Cry proteinin ekti mekanizması 38
Şekil 1.18. Farklı böcek takımlarında bulunan kaderin reseptörünün yapısı 38
Şekil 2.1. pGEM-T Easy plazmit vektörünün haritası 51
Şekil 2.2. pET 28a (+) ekspresyon vektörünün haritası 52
Şekil 2.3. *Ephestia kuehniella*'nın hayat evreleri 56
Şekil 2.4. *Culex pipiens* larva yetiştirme havuzu 57
Şekil 2.5. *Culex pipiens* ergin yetiştirme kafesi. 58
Şekil 2.6. Thermocycler (Sensoquest) cihazı 61
Şekil 2.7. Rekombinant Cry proteinlerin ve spor-kristal karışımının liyofilize edilmesi. 69
Şekil 3.1. *B. thuringiensis* SY49-1 gram boyama ışık mikroskobu görüntüsü 73
Şekil 3.2. *B. thuringiensis* SY49-1 Cry protein mikroskop görüntüsü 74

şekil 3.3. Plazmit DNAğlarēnēn % 0.5ğlik agaroz jel görüntüsü 75
şekil 3.4. *B. thuringiensis* SY49.1 suĸunun 16S rDNA PZR ürünün saflaĸtērmaé é .. iĸleminden sonra % 1ğlik agaroz jel görüntüsüé é é é é é é é é é .76
şekil 3.5. *B. thuringiensis* SY49.1 suĸunun 16S rDNA nükleotid dizisi ile yapēlané é . soyaĵ acē..... 77
şekil 3.6. *B. thuringiensis* SY49.1 suĸunun *cry1Ab* primeri ile yapēlan PCR ürünün % 1ğlik agaroz jel görüntüsüé é é é é é é é é é é é é é é é é é é .78
şekil 3.7. *B. thuringiensis* SY49.1 suĸunun *cry2* primeri ile yapēlan PCR ürünün % 1ğlik agaroz jel görüntüsüé é é é é é é é é é é é é é é é é é ... 79
şekil 3.8. *cry1Ab* geninin kesim enzim haritasēé é é é é é é é é é é é é é .80
şekil 3.9. *cry2* geninin kesim enzim haritasē 81
şekil 3.10. Rekombinant pGEM-T*cry1Ab* plazmiti 82
şekil 3.11. Rekombinant pGEM-T*cry2* plazmiti 82
şekil 3.12. Transformasyon iĸlemi sonrasēmavi-beyaz koloni oluĸumu 84
şekil 3.13. pGEM-T*cry1Ab* rekombinant plazmitin *Eco*RI enzimi ile kesildikten sonra.. % 1ğlik agaroz jel görüntüsüé é é é é é é é é é é é é é é é é .85
şekil 3.14. pGEM-T*cry2* rekombinant plazmitin *Eco*RI enzimi ile kesildikten sonra % 1ğlik agaroz jel görüntüsüé é é é é é é é é é é é é é é é é é 86
şekil 3.15. Rekombinant pET-*cry1Ab* plazmiti 87
şekil 3.16. Rekombinant pET-*cry2* plazmiti..... 88
şekil 3.17. *cry1Ab* ve *cry2* genlerinin pET28a(+) vektörüyle ligasyon iĸlemi sonrasē% 0.8ğlik agaroz jel görüntüsüé é é é é é é é é é é é é é é é é .89
şekil 3.18. pET-*cry1Ab* ve pET-*cry2* plazmitini taĸēyan bakterilerin koloni PZRé é é . reaksiyonu iĸlemi sonrasē% 1ğlik agaroz jel görüntüsü 90
şekil 3.19. IPTG ile indükleme sonrasēprotein konsantrasyonlarē..... 91
şekil 3.20. Protein konsantrasyonunu belirlemede kullanēlan standart eĵri grafiĵi..... 91
şekil 3.21. IPTG ile indükleme sonrasēCry1Ab proteinin SDS-PAGE görüntüsüé 92
şekil 3.22. IPTG ile indükleme sonrasēCry2 proteinin SDS-PAGE görüntüsüé é .93
şekil 3.23. *E. coli* BL21 (DE3)ğde Cry proteinin IPTG ile indüklenmesinin ĸematik gösterimié ...94
şekil 3.24. Cry1Ab proteinin *E. kuehniella* larvalarēüzerindeki % ölüm oranlarē..... 96
şekil 3.25. Cry2 proteinin *E. kuehniella* larvalarēüzerindeki % ölüm oranlarē..... 96

Şekil 3.26. Cry1Ab+Cry2 proteinin *E. kuehniella* larvalarıüzerindeki % ölüm oranları. 97
Şekil 3.27. *Bt* SY49-1 suşunun spor-kristal karışımın *E. kuehniella* larvalarıüzerindeki.. % ölüm oranları..... 98
Şekil 3.28. *E. coli* BL21 (DE3)'ün *E. kuehniella* larvalarıüzerindeki % ölüm oranları 98
Şekil 3.29. *E. kuehniella* larvalarıüzerindeki 10 µg\gıdık doz uygulamasından gruplar . arası% ölüm oranları..... 99
Şekil 3.30. *E. kuehniella* larvalarıüzerindeki 25 µg\gıdık doz uygulamasından gruplar arası% ölüm oranları..... 99
Şekil 3.31. *E. kuehniella* larvalarıüzerindeki 50 µg\gıdık doz uygulamasından gruplar arası% ölüm oranları..... 100
Şekil 3.32. *E. kuehniella* larvalarıüzerindeki 100 µg\gıdık doz uygulamasından gruplar arası% ölüm oranları..... 100
Şekil 3.33. *E. kuehniella* larvalarıüzerindeki 250 µg\gıdık doz uygulamasından gruplar arası% ölüm oranları..... 101
Şekil 3.34. *E. kuehniella* larvalarıüzerindeki 500 µg\gıdık doz uygulamasından gruplar arası% ölüm oranları..... 101
Şekil 3.35. *E. kuehniella* larvalarıüzerindeki 1000 µg\gıdık doz uygulamasından gruplar arası% ölüm oranları..... 102
Şekil 3.36. Cry2 proteinin *C.pipiens* larvalarıüzerindeki % ölüm oranları..... 103
Şekil 3.37. *Bt* SY49-1 suşunun spor-kristal karışımın *C.pipiens* larvalarıüzerindeki %.. ölüm oranları..... 104
Şekil 3.38. *E. coli* BL21 (DE3)'ün *C.pipiens* larvalarıüzerindeki % ölüm oranları 104
Şekil 3.39. *C. pipiens* larvalarıüzerindeki 50 µg\mlık doz uygulamasından gruplar arası % ölüm oranları..... 105
Şekil 3.40. *C. pipiens* larvalarıüzerindeki 100 µg\mlık doz uygulamasından grupları ... arası% ölüm oranları..... 105
Şekil 3.41. *C. pipiens* larvalarıüzerindeki 250 µg\mlık doz uygulamasından grupları ... arası% ölüm oranları..... 106
Şekil 3.42. *C. pipiens* larvalarıüzerindeki 500 µg\mlık doz uygulamasından grupları arası% ölüm oranları..... 106

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Tipik plazmit çeşitleri ve büyüklükleri. 8
Tablo 1.2. Entomopatojenik nematodlar ve hedef zararlı grupları..... 16
Tablo 1.3. Ticari olarak üretilen entomopatojenik fungus türleri ve hedef zararlılar..... 17
Tablo 1.4. Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (US EPA) tarafından tescillenmiş rekombinant (Cry protein) biyo pestisit ürünleri 35
Tablo 2.1 Kullanılan primer çiftleri ve özellikleri 48
Tablo 3.1. *Bt* SY49-1 suşunun *Bacillus thuringiensis andalousiensis* BGSC 4AW1 contig00024 (ACNG01000016.1) suşu ile 16S-ITS rDNA dizi eşleştirme sonucu 77
Tablo 3.2. Rekombinant Cry1Ab proteini ve *Bt* SY49-1'in *E. kuehniella* larvaları üzerindeki LD_{50} ve LD_{95} değerleri. 95
Tablo 3.3. Rekombinant Cry2 proteini ve *Bt* SY49-1'in *C. pipiens* larvaları üzerindeki LD_{50} ve LD_{95} değerleri..... 103

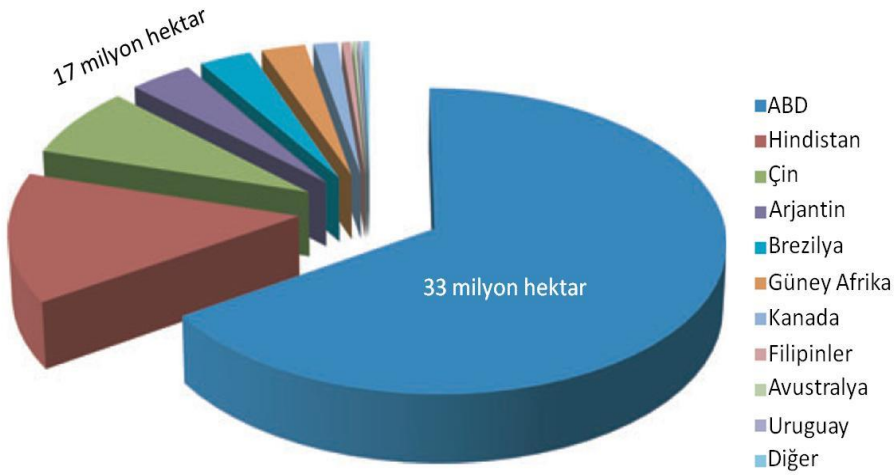
GİRİŞ

Günümüzde eskiye oranla kimyasal pestisit kullanımında azalma olmasına karşın zararlı böceklerle mücadelede kimyasal pestisit kullanımı yaygın olarak devam etmektedir. Bu kimyasalların ortaya çıkardığı problemlerle mücadele etmek oldukça zordur. Kimyasalların zararlarının ne kadar süreceği konusu insanlığın geleceği ve sınırlı yaşam alanlarının güvenliği açısından büyük kaygılara neden olmaktadır. Bu bakımdan doğal ortamla daha uyumlu, insan ve çevre sağlığı açısından daha güvenli tarımsal mücadele teknikleri geliştirmek ve uygulamasını yaygınlaştırmak çok önemlidir. Kimyasal mücadeleye alternatif birçok yöntem geliştirilmekte ve bunların optimizasyonuna yönelik ciddi gayretler sarf edilmektedir. Zararlı böceklerin kontrolünde mikroorganizma ve ürünlerinin uygulanması uzun yıllardan beri devam etmektedir [1,2]. Tarih öncesi dönemlerde zararlıların kontrolü ile ilgili uygulamalar eski Mısır ve Çin kayıtlarında yer almaktadır. Aristo, kayıtlarında bal arısında (*Apis millifera*) oluşan foulbrood böcek hastalığını tarif etmiştir [3]. Louis Pasteur ipek böceğinde (*Bombyx mori)* pebrine ve flacherie hastalıklarıyla ilgilenmiştir. Pasteur mikrobiyel patojenisite ve enfeksiyon hastalıkları alanında öncü olarak kabul edilmektedir. Ayrıca Kirby ve Bassi böcek patolojisine önemli katkılarda bulunmuşlardır [4,5] . *Bacillus thuringiensis* 1901 yılında Japon bilimi adamı Shigetane Ishiwatari tarafından izole edilmiştir. Ishiwatari bu bakteriyi ipek böceğinde sotto hastalığına neden olduğundan dolayı *Bacillus sotto* olarak isimlendirmiştir. 10 yıl sonra Berliner aynı bakteriyi Almanyanın Thuringia bölgesinde *Ephestia kuehniella*'dan izole etmiş ve bu bakteriyi *Bacillus thuringiensis* olarak isimlendirmiştir [6]. Berliner 1915 yılında *Bt* ile ilgili detaylı çalışmalar yaptığında endosporların yanında çeşitli inklüzyonların varlığını belirlemiştir [7,8].

Mattes [9] 1927 yılında *Bt*'de aynı inklüzyonların varlığını tespit etmiş ancak bu inklüzyonların insektisidal aktivitesi tam anlamıyla 1953 yılında belirlenebilmiştir [10].

Parasporal kristal proteinlerin önemi Thomas Angus tarafından fark edilmiş ve bu inklüzyonların insektisidal aktivitesi ispat edilmiştir. 1955 yılında Philip Fitz-James ve Hannay toksik parasporal kristallerin proteinden oluştuğunu keşfetmişlerdir [11,12]. ABD'de ilk ticari *Bt* ürünü 1958 yılında üretilmiş ve US Çevre Koruma Ajansı tarafından biyo-insektisit olarak tescillenmiştir.

1996 yılından beri *Bt* ürünleri böceklere karşı dirençli transjenik ürünlerin elde edilmesinde dünya çapında yaygınlaşmaya başlamıştır. Bu ürünler oldukça etkili olup kimyasal insektisit kullanımını önemli ölçüde azaltmıştır [13,14]. Günümüzde pestisitlerin (herbisit, insektisit, fungisit, nematisit, fumigant) küresel ekonomideki pazar payı 25.3 milyar dolar değerindedir. Biyopestisitler ise bu pazar payının sadece % 2.5'ini oluşturmaktadır [15].



Şekil 1. Transjenik *Bt* ürünlerinin ülkelere göre dağılımı [15]

Yaklaşık 50 milyon hektarlık *Bt* trangenik ürünün 33 milyon hetarlık bölümü ABD, 17 milyon hektarlık bölümünü ise Hindistan, Çin, Arjantin, Brezilya, Güney Afrika, Kanada, Filipinler, Avustralya, Uruguay ve diğer ülkelerde üretilmektedir [15]. *Bt* toksinleri insanlara, faydalı böceklerin çoğuna ve diğer canlılara toksik etkisinin olmaması nedeniyle, kimyasal insektisitlerin meydana getirdiği çevre ve sağlık sorunlarına neden olmamaktadır [16]. Genetik mühendisliğindeki gelişmeler ile *Bt* genlerinin pamuk, tütün ve domates gibi önemli ürün ve bitkilerde yaşayan patojenik olmayan bazı bakterilere aktarılmasıyla sonucu farklı konukçu spektrumuna sahip yeni ırkların geliştirilmesi bu bakterinin önemini daha da artırmıştır [17]. Gen klonlama

çalışmaları, gen izolasyonu, gen bankalarının oluşturulması, genlerin güvenlik altına alınarak yapı ve fonksiyonları üzerinde araştırmalar yapılması, klonlanan genlerin üzerinde mutasyonlar yapılarak fonksiyonel bölgelerin belirlenmesi, DNA dizi analizlerinin kolaylaştırılması ve rekombinant proteinlerin ifade ettirilmesi gibi amaçlarla yapılmaktadır [18, 19, 20]. Bir genin vektöre yerleştirilmesi ve bakteri hücresine transformasyonu sonucunda hücre bölünmesi ile vektörün içerdiği genin çok sayıda kopyasının oluşturulması işlemine gen klonlama adı verilmektedir [18,19]. Klonlama işleminde; virüs ve bakteriler, bakteriofajlar, plazmitler, kozmidler ve mayalar vektör olarak kullanılmaktadır [18]. Gen klonlama çalışmalarında vektör olarak plazmitler kullanıldığında, genler genomik DNA veya mRNA'dan izole edilerek Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmaktadır. Ardından hedef gen ve yerleştirileceği plazmit bir veya daha fazla enzim ile kesilerek *in vitro* şartlarda genin plazmite yerleştirilmesi sağlanmaktadır [18]. Günümüz biyoteknolojisindeki hızlı değişiklikler, araştırıcıdan araya farklı özellikleri olan plazmitler arasından amaçlarına en uygun olanı seçme olanağını sunmaktadır.

Rekombinant DNA teknolojisi, çeşitli materyallerden genlerin izole edilmesi, genler üzerinde değişik manipülasyonların yapılması, genlerin klonlanması ve daha sonra da araştırmalarda kullanılması gibi moleküler uygulamalar şeklinde tanımlanmaktadır. Bir DNA parçası veya gen bölgesinin izole edilip çoğaltılması bir dizi aşamada gerçekleştirilir. Bu evreler; öncelikle organizmadan DNA'nın elde edilmesi (ekstraksiyon ya da pürifikasyon), ardından parçalara ayrılması (fragmentasyon), daha sonra da çeşitli yöntemler kullanılarak bu parçaların sayısının artırılması (klonlama) gibi aşamaları içerir [21].

DNA üzerinde değişik amaçlı ve çok yönlü analiz yapılmasına imkân veren gen teknolojisi uygulamaları temelde 5 aşamada gerçekleşmektedir:

1-Restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak DNA fragmentlerinin elde edilmesi

2-Elde edilen fragmentlerin aynı enzimle kesilen uygun bir vektöre aktarılması

3-Fragment-Vektör kompleksinin konakçı organizmaya aktarılarak çoğaltılması (Klonlama)

4-Spesifik DNA fragmenti içeren kolonilerin seçimi

5-Klonlanan spesifik DNA fragmentinin tanımlanması[22].

Bu çalışmada topraktan izole edilen ve önceden yapılan toksisite çalışmalarıyla zararlı böcekler üzerinde etkili olduğu belirlenmiş olan *Bacillus thuringiensis* SY49-1 suşunun *cry1* ve *cry2* genleri klonlanarak *E. coli*'de ifade ettirildikten sonra elde edilen toksin proteinlerin insektisidal aktivitesi belirlenmiştir.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Gen Klonlamanın Temel Prensibi ve DNA Analizleri

1.1.1. Gen Klonlama

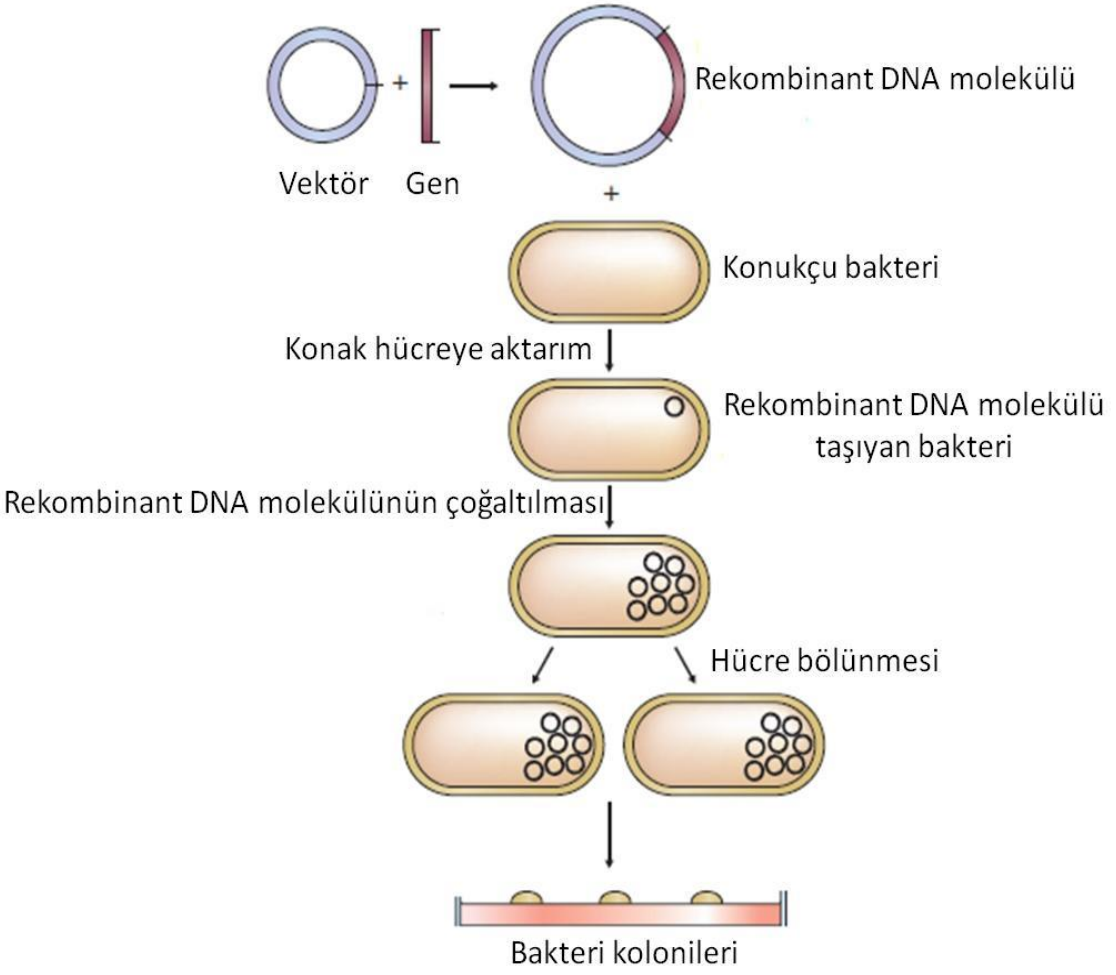
Gen klonlama çalışmaları; gen izolasyonu, gen bankalarının oluşturulması, genlerin güvenlik altına alınarak yapı ve fonksiyonları üzerinde araştırmalar yapılması, klonlanan genlerin üzerinde mutasyonlar yapılarak fonksiyonel bölgelerin belirlenmesi, DNA dizi analizlerinin kolaylaştırılması ve rekombinant proteinlerin ifade ettirilmesi gibi amaçlarla yapılmaktadır [18, 19, 20]. Bir genin vektöre yerleştirilmesi ve bu vektörün bakteri hücrelerine transformasyonu sonucunda hücrenin bölünmesiyle vektörün içerdiği genin birçok kopyasının elde edilmesine gen klonlama adı verilir [18,19]. Gen klonlamanın temel basamakları;

1. Rekombinant DNA molekülü oluşturmak için klonlanacak gen vektöre (halkasal DNA molekülü) yerleştirilmesi.
2. Rekombinat DNA molekülünün konak hücreye (genellikle bakteri) aktarılması (transformasyon).
3. Rekombinat DNA molekülünün çoğaltılması.
4. Konak hücrenin çoğaltılması.
5. Klonların selektif ortamda seçilmesi (Şekil 1.1)

1.1.2. Gen Klonlama Vektörleri

Bir DNA molekülünün vektör olarak kullanılabilmesi için önemli birkaç özelliğe sahip olması gerekir. Konak hücrede replike olabilmesi bunlar içerisinde en önemli olanlarındandır.

Bu sayede klonlanacak genin çok sayıda kopyası elde edilebilir. Çalışmanın amacına göre değişmekle birlikte klonlama vektörünün nispeten 10 kbʼden küçük olması gerekir. Daha büyük vektörler saflaştırma işleminde daha kolay kırılabildiği ve daha zor manipule edildiği için gen klonlama çalışmalarında fazla tercih edilmez. Yukarıda belirtilen kriterleri taşıyan iki çeşit DNA molekülü bakteri hücrelerinde bulunabilir. Bunlar plazmit ve bakteriofaj kromozomlarıdır. Gen klonlama çalışmalarında sıklıkla plazmit vektörleri kullanılmasına rağmen en önemli vektör tipleri bakteriyofajlardan üretilmektedir. Gen klonlamanın aşamaları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 1.1).



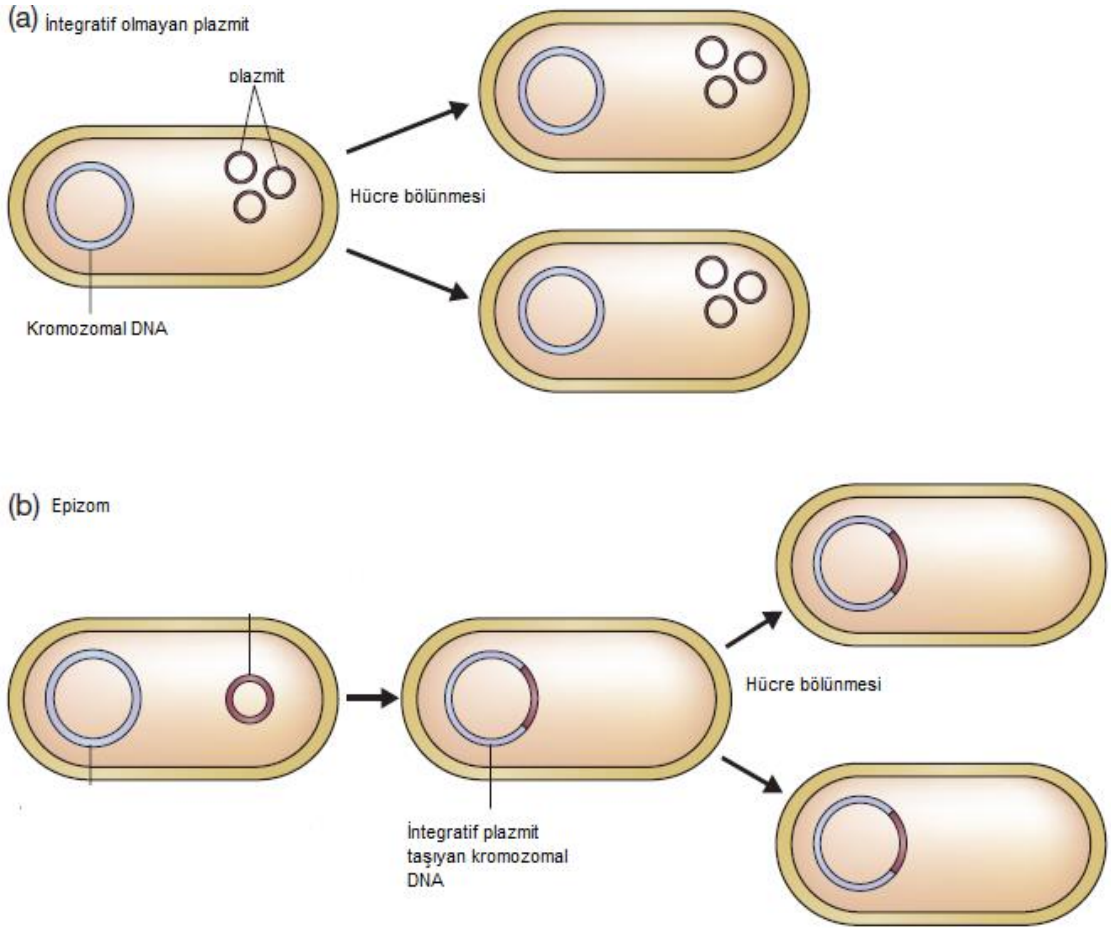
Şekil 1.1. Gen klonlama aşamaları[19]

1.1.3. Plazmit Vektörleri ve Özellikleri

1.1.3.1. Plazmitlerin Temel Özellikleri

Plazmitler, bakteri hücrelerinde kromozomal DNAʼdan bağımsız olarak çoğalabilen halkasal DNA molekülleridir. Plazmitler bir veya daha fazla gen bulundurma özelliğine

sahip olup bu genler sayesinde konukçusuna avantaj sağlamaktadırlar (Örneğin antibiyotik direnç genleri). Plazmitler replikasyon orjini olarak adlandırılan DNA dizilerine sahiptir. Böylece ana hücredeki kromozomal DNA'dan bağımsız olarak çoğalabilirler. Ayrıca bazı plazmitler bakteri kromozomuna entegre olarak replike olabilmektedir. Bunlara integratif plazmit ya da epizom adı verilir (Şekil 1.2) [19].



Şekil 1.2. Epizom oluşumu [19]

1.1.3.2. Plazmit Büyüklüğü ve Kopya Sayısı

Plazmit büyüklüğü ve kopya sayısı klonlama çalışmalarında oldukça önemlidir. Genel olarak klonlama çalışmalarında 10 kb daha küçük plazmit vektörleri tercih edilmektedir. Plazmitler, 1 ile 250 kb arasında değişken büyüklüğe sahip olabilirler. Kopya sayısı, tek bir bakteri hücresinde bulunan tek bir plazmitin molekül sayısını ifade eder. Klonlama çalışmalarında genel olarak yüksek kopya sayısına sahip plazmit vektörleri tercih

edilmektedir. Bu durum özellikle çok sayıda rekombinant DNA molekülü elde etmekte oldukça önemlidir.

Tablo 1.1 Tipik plazmit çeşitleri ve büyüklükleri

Plazmit	**Büyüklük**		**Organizma**
	Nukleotit Uzunluğu (kb)	**Moleküler Kütle (MDa)**	
pUC8	2.1	1.8	*E. coli*
pGEM	3.015		*E. coli*
pET28	5.369		*E. coli*
Co1E1	6.4	4.2	*E. coli*
RP4	54	36	*Pseudomonas*
F	95	63	*E. coli*
TOL	117	78	*P. putida*
pTiAch5	213	142	*A.tumefaciens*

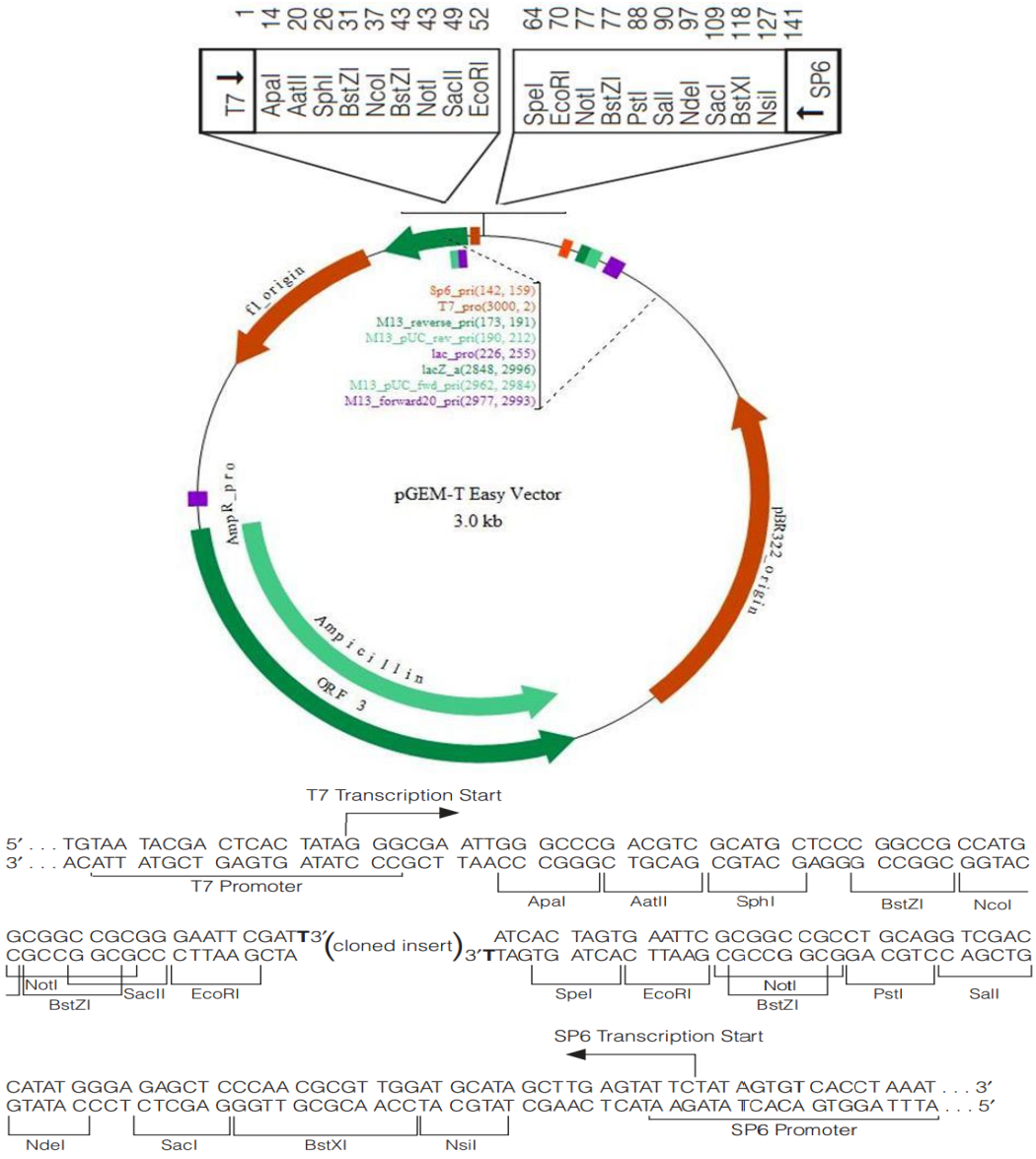
1.1.3.3. *Escherichia coli* için Klonlama Vektörleri

Konak organizma olarak *E. coli* kullanımı için çok çeşitli klonlama vektörleri mevcuttur. Bu durum *E coli*'nin son 50 yılda temel araştırmalarda oynadığı önemli rol açısından düşünüldüğünde hiç de sürpriz değildir. *E. coli*'nin mikrobiyolojisi, biyokimyası ve genetiği çok iyi bilindiği için gen yapısı ve işleyişi gibi önemli çalışmalarda model oraganizma olarak kullanılmaktadır. Gen klonlama çalışmalarında genellikle küçük plazmitler kullanılır. Çoğu ticari firmalardan elde edilen plazmit vektörleri *E. coli* ile uyumludur. Bu plazmitler, yüksek transformasyon etkinliğine sahiptir ve transformantların kolayca seçilmesine izin veren markerlar bulundurur. Ayrıca makul büyüklüklükte DNA parçalarını (~8 kb'ye kadar) klonlayabilme ve kolayca saflaştırılabilme gibi birçok özelliği barındırmaktadır [19].

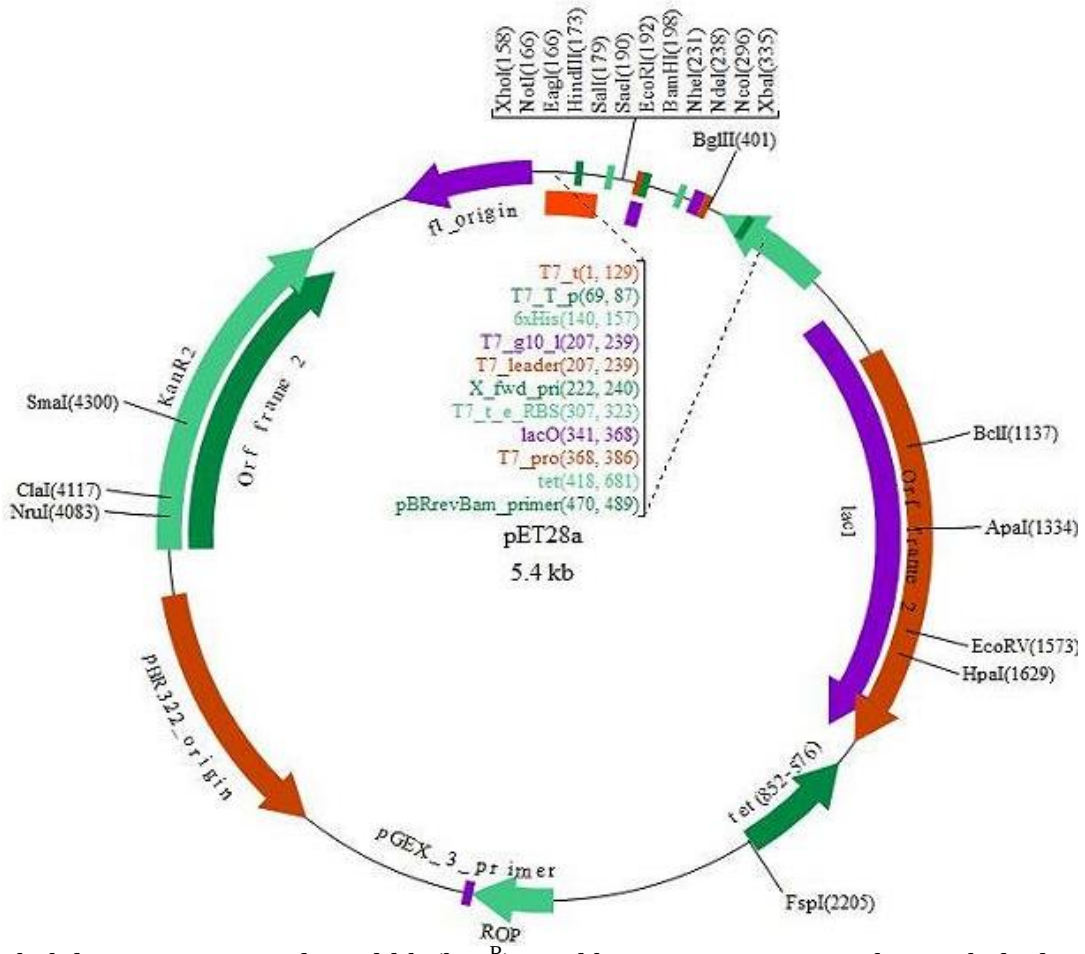
1.1.3.4. Plazmit Vektörlerinin İsimlendirilmesi

pBR322 vektörü geliştirilen ilk plazmit vektörlerindendir ve diğer vektörlere nazaran fazla karmaşık değildir. Günümüzde araştırmalarda yaygın şekilde kullanılmamasına karşın klonlama vektörlerinin temel özelliklerini göstermektedir. pBR322 plazmit vektörünün isimlendirilmesinde "p" bunun gerçek bir palzmit olduğunu "BR" vektörün köken olarak geliştirildiği laboratuvardaki araştırmacıların isimlerinin baş harflerini (Bolivar ve Rodriguez), 322 rakamı ise bu laboratuarda geliştirilen diğer vektörlerden ayırt eder (pBR325, pBR327, pBR328 vb.). Günümüzde PCR ürünleri kesim

enzimleriyle kesilmeksizin klonlanabilmektedir. pGEM-T Easy vektörü lineer bir plazmit vektörüdür ve 5ô ucunda ñTTTTò (Timin) kuyruğu bulundurur. Bu sayede PCR ürünlerini ya da klonlanması istenilen gen bölgesini ligasyon işlemiyle bünyesine alarak halkasal forma dönüşebilir. Ancak ligasyon işleminin olabilmesi için PCR ürünü veya gen bölgesinde 3ô uzamış AAA (Adenin) ucunun bulunması gerekir. Ayrıca vektör üzerinde kesim enzim bölgeleri, replikasyon orjini ve ampisiline direnç geni de bulunur.



Şekil 1.3 Ampisiline dirençlilik (amp^R), replikasyon orjini ve restriksiyon bölgelerinin gösterildiği pGEM-T Easy plazmit vektörünün haritası



Şekil 1.4. Kanamisin dirençlilik (kan^R), replikasyon orjini ve restriksiyon bölgelerinin gösterildiği pET28a ekspresyon plazmit vektörünün haritası

1.1.4. Gen Klonlamada Restriksiyon Enzimlerinin Önemi

Tip II restriksiyon endonükleazların (RE) ana özelliği DNA molekülünde spesifik tanıma dizisine sahip olmasıdır. Pek çok RE'leri hekzanükleotitlerin hedef yerlerini tanır. Fakat diğer RE'ler dört, beş ve hatta sekiz nükleotit dizilerini keserler. Örneğin *Sau3A* (*Staphylococcus aureus*) ñGATCò dizisini tanır. *AluI* (*Arthrobacter luteus*) ñAGCTò dizisini tanır ve keser. RE'lerinin DNA'yı benzer tanıma bölgesinden kesen anlamına gelen dejenere tanıma bölgeleri örnekleri de vardır. Örneğin *HinfI* (*Haemophilus influenza*) GANTC dizisini tanır. Bu yüzden bu enzim GATTC, GAGTC ve GACTC dizilerini tanır ve keser [19].

1.1.4.1. Küt Uçlar ve Yapışkan Uçlar

Restriksiyon endonükleazlar tarafından yapılan kesim işlemi gen klonlama deneyinin tasarımında oldukça önemlidir. Birçok RE küt ya da düz uç olarak adlandırılan DNA

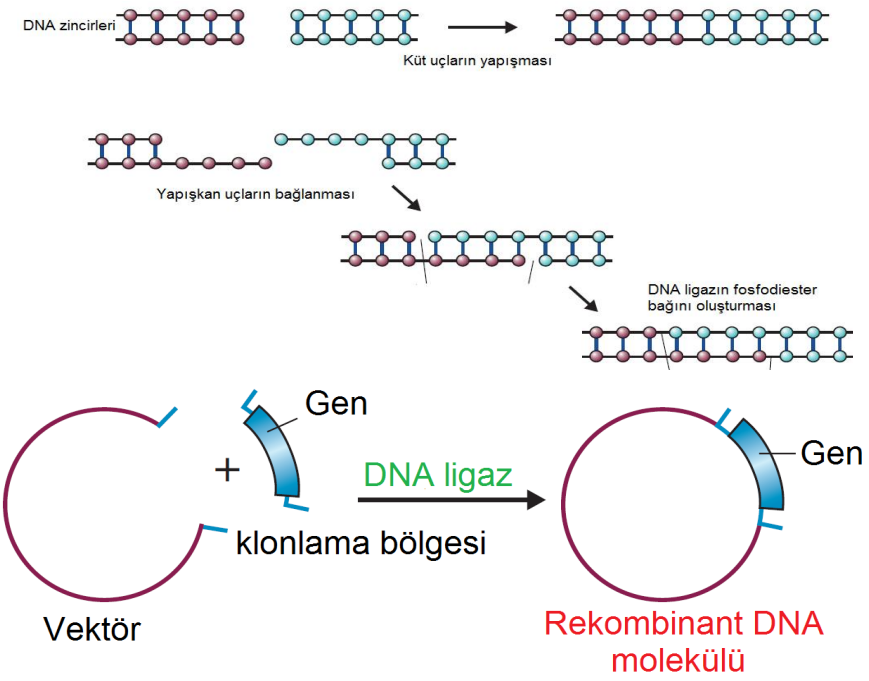
molekülünü aynı pozisyonda kesen bir özellik gösterir. Yapışkan uç oluşturan restriksiyon enzimleri, DNA'yı biraz farklı şekilde keser. Bu enzimler DNA ipliği ni tam olarak aynı pozisyonda kesmez. Yapışkan uç oluşturan RE'lerin önemli özelliği, farklı dizileri tanıyan restriksiyon enzimlerin aynı yapışkan uçu üretebilmesidir. *Bam*HI tanıma dizisi (GGATCC) ve *Bgl2* (AGATCT) buna örnektir. Her iki enzim de GATC yapışkan uçlar oluştururlar.

Gen klonlama çalışmalarında klonlama yapılacak gen veya DNA parçasının RE ile kesilme işlemi oldukça kritiktir. Klonlamada kullanılan vektörün uygun enzimle kesilmesi ve genin de uyumlu uç oluşturmasını sağlayacak (aynı enzimle kesilmesi veya yapışkan uç oluşturan enzimle kesilmesi) ligasyon (birleştirme işlemi) işlemi için hayati önem taşımaktadır [19]

1.1.5. Gen Klonlamada Ligasyon İşlemi

Rekombinant DNA molekülünün oluşumundaki önemli aşamalarından biride ligasyon işlemidir. RE enzimler ile kesilmiş (küt uç veya yapışkan uç) klonlama vektörü ve DNA fragmenti (gen) DNA ligaz enzimi ile bir araya getirilir. DNA ligaz iki DNA molekülünü uç uca birleştiren özel bir enzim tipidir. Bu enzim DNA tamiri ve DNA ikileşmesinde rol oynar. Ayrıca, ökaryotlarda mayoz bölünmedeki krosoverde ve memelilerde, bağışıklık sisteminin çeşitliliği ni sağlayan rekombinasyon süreçlerinde rol oynarlar. DNA ligazlar, laboratuvarda rekombinant DNA dizileri oluşturmak için vazgeçilmez birer araç haline gelmişlerdir. Örneğin restriksiyon enzimleri ile elde edilen DNA parçalarının bir plazmit içine yerleştirilebilmesi için DNA ligazlar kullanılır. Uçları birleştirilen DNA moleküllerinin uçları ñyapışkanò veya ñkütò olabilir. Moleküler biyolojide DNA ligaz iki DNA molekülünü uç uca birleştiren özel bir ligaz tipidir. DNA ligaz kırıkların tamirinden de sorumludur. Genetik mühendisliği çalışmalarında kullanılan DNA ligazlar, ya normal *E. coli* bakterilerinden ya da T4 bakteriyofajı ile enfekte edilmiş *E. coli* bakterilerinden izole edilirler. Bağlama veya ligasyon, rekombinant DNA teknolojisinde klonlanacak geni taşıyan DNA parçaları ile vektörün bir enzim aracığıyla birbirlerine bağlanması işlemine denir. Bu işlem için ligaz cinsi enzimler görev yapar. Yapışkan uçların ligasyon etkinliği küt uçlara göre oldukça yüksektir. Bu nedenle klonlama çalışmalarında genellikle yapışkan uçlar tercih edilmektedirler. Vektör/insert DNA konsantrasyonları optimum derecede seçilmelidir

[19]. Eşer uygun oranlarla çalışılmazsa ligasyon etkinliği düşer. Bu yüzden 1:1, 1:5, 1:10 şeklindeki vektör/insert DNA oranları tercih edilmektedir. ATP veya NAD kofaktörlerinin fosfat bağının kesilmesi ile reaksiyon için gerekli enerji elde edilir. Artakalan AMP molekülü enzimde bulunan bir lizin kalıntısı tarafından bağlanır. Birleştirilecek DNA molekülünün 5'ucundaki fosfat, lizine bağlı AMP'deki 5'fosfata saldırarak, AMP'yi DNA'ya bağlayan bir pirofosfat bağı oluşturur. Kopuk DNA zincirinin 3'-OH grubu, 5'uçtaki pirofosfat grubuna saldırarak AMP'nin serbest bırakılmasına ve DNA zincir uçlarının birleşmesine neden olur. DNA ligaz bir DNA zincirinin 3'-OH ucunu diğer DNA zincirinin 5'-fosfat ucuna fosfodiester bağı ile bağlar [19].



Şekil 1.5. Ligasyon işleminin şematik gösterimi [19]

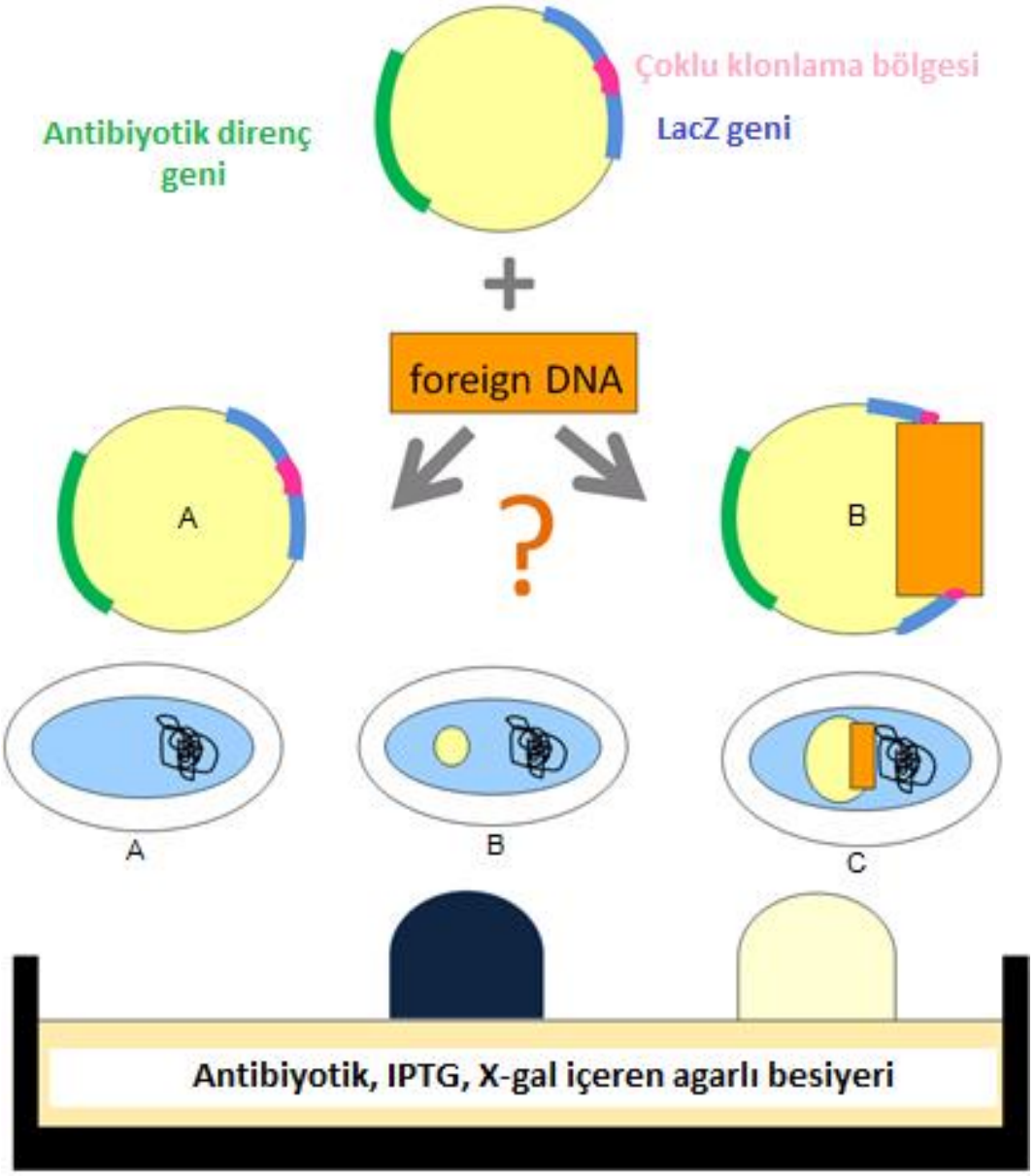
1.1.6. Rekombinant DNA Molekülünün Seçilmesi

Transformasyon terimi genel olarak ekzogenik DNA'nın hücre içine alınıp hücre genetiği ile bütünleşmesi anlamına gelir. Transformasyon işlemine başlamadan önce ilgilenilen gen bölgesi plazmid vektör ile ligaz enzimi aracılığıyla birleştirilir. Bu işleme ligasyon adı verilir. Genellikle nükleik asitler, örneğin plazmidler kendiliğinden bakteri hücrelerinin içine giremezler bunun için uyarıcı bir etki gereklidir. Bu yüzden transforme olacak hücre membranlarının daha önceden düzenlenmesi gerekir. Kompetan hücre olarak da ifade edilen transforme olacak hücreler kalsiyum klorür ile

uyarılır ve hücre membranları rekombinant plazmit vektörü hücre içine alabilecek şekilde düzenlenir [19].

Transformasyon sadece bakterilerin doğal ortamlarında gerçekleşmez. Labarotuvarda da (*Bacillus* ve *Streptococcus* cinsleri) bakteriler transforme olabilmektedir. Bakteri türlerinin çoğu, normal şartlar altında sınırlı miktarda transformasyonla DNA alırlar. Bu türleri etkili bir şekilde transforme etmek ve bakterilerin DNA alma yeteneklerini arttırmak için bazı fiziksel, kimyasal ve elektriksel uyarılar yapılır. Bu bu uyarılara maruz kalan organizmalara kompetan hücre veya organizma adı verilir [19]. Kimyasal olarak uyarılan kompetan hücrelerin transformasyon oranı genellikle düşüktür. Bu oran genellikle 1/10.000'in üzerinde değildir. Bu yüzden plazmit içeren bakteriyel hücrelerin seçilimine ihtiyaç duyulur. İlgilenilen geni içeren (transforme olan) plazmit DNA'ları bulunduran hücrelerin seçimi antibiyotik direncine göre yapılır. Birçok *E. coli* soyu antibiyotiklere hassastır. Manipülasyon ya da klonlama için kullanılan plazmit DNA'lara antibiyotik direnç geni genetik mühendisliği kullanılarak eklenmiştir. Plazmit DNA'lar içerdikleri antibiyotik direnci özelliğinden dolayı antibiyotik içeren besi ortamında antibiyotiğe direnç gösterdikleri için sadece kompetan bakteri hücresi hayatta kalacaktır. Fakat plazmiti almayan kompetan hücreler antibiyotik direnci kazanamadıkları için gelişmeyecektir. Rekombinant olan (ilgilenilen gen bölgesi ligasyon olan) ve rekombinant olmayan plazmitleri (ilgilenilen gen bölgesini içermeyen) belirlemek için plazmit vektörün çoklu klonlama bölgesine (MCS) "β-galaktosidaz" geni eklenmiştir. LacZ geni olarak da bilinen β-galaktozidaz geni laktozun parçalanmasını katalizler. Eğer ilgilenilen gen plazmidin çoklu klonlama bölgesine başlanmışsa bu durumda LacZ geninin bütünlüğü bozulacağı için besiyerinde bulunan laktoz parçalanmayacaktır. Transforme hücrelerin seçiminde antibiyotik kullanımının yanında IPTG (isopropylthiogalactoside) ve X-gal'de (5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside) iki kimyasala daha ihtiyaç vardır. IPTG β-galaktozidaz geni için bir uyarıcıdır. Bunun anlamı eğer ortamda IPTG varsa enzim sentezlenir. X-gal ise renksiz fakat kromojen bir maddedir ve laktoz analoğu olarak kullanılır. Bu madde β-galaktozidaz enzim ile parçalanır ve mavi renk oluşur. Transforme olmayan hücreler antibiyotik direnç geni içermediklerinden antibiyotikli besiyerinde hayatta kalamazlar. Plazmit içeren fakat ilgilenilen geni içermeyen hücreler antibiyotik direncine sahiptir. Bu yüzden antibiyotikli besiyerinde hayatta kalırlar. Fakat çoklu

klonlama bölgelerindeki LacZ geninin bütünlüğü bozulmadığı için ortamda bulunan X-gal maddesini parçalar ve mavi renk açığa çıkar. Fakat ilgilenilen geni içeren Plazmit DNA'daki LacZ gen bütünlüğü bozulduğu için X-gal maddesini parçalayacak enzim sentezlenmez ve mavi renk oluşmaz. Besi yerinde bu hücreler beyaz koloni oluştururlar [Webgentech].



Şekil 1.6. Rekombinant DNA molekülünün antibiyotik ve LacZ gen bütünlüğüne dayalı seçimi [Webgentech].

1.2. Zararlı Böcek Kontrolünde Yaygın Kullanılan Entomopatojenik Ajanlar

1.2.1. Mikrobiyal İnsektisitler

Bu insektisitler yakayan mikroskobik (virüs, bakteri, fungus, protozoa ve nematod) organizmalardan veya bunların ürünleri olan toksinlerden oluşmaktadır. Bunlar diğer insektisitler gibi püskürtme, toz ve granül halde uygulanacak şekilde kullanıma sunulmuştur. Mikrobiyal insektisitler; yaban hayatı, insan ve diğer canlılar üzerinde toksik etki göstermemesi, ürettikleri toksinlerin genellikle tür veya cins düzeyinde etki göstermesi, faydalı böcek türlerine zarar vermemeleri, birçok durumda konvansiyonel pestisitlerle birlikte kullanılabilmesi ve hasat döneminde dahi uygulanabilmeleri gibi birçok avantaja sahiptir. Her zararlı için kullanılamasa da bu ürünler süs bitkilerinde ve tarım ürünlerinde kayıplara sebep olan zararlı böcekler için bakarlı bir şekilde kullanılabilir. Çünkü mikrobiyal insektisitlerin çoğu belli böceklere karşı etkilidir ve yarı ömürleri oldukça kısadır. Kullanıcılar hedef zararlıyı iyi bir şekilde tanımlamalı ve etkili bir uygulama yöntemi belirlemelidir. Ancak, bu insektisitler yüksek düzeyde seçiciliğe sahip olduklarından uygulandıkları alanlardaki diğer zararlı türlere etki etmemektedir [23,24].

1.2.1.1. Entomopatojenik Nematodlar

Biyolojik kontroldeki bakarlıları göz önüne alındığında 7 nematod familyası (Mermithidae, Allantonematidae, Neotylenchidae, Sphaerularidae, Rhabditidae, Steinernematidae ve Heterorhabditidae) ön plana çıkmıştır. Günümüzde ise bu familyalar içerisinde entomopatojenik olan familyalar (Heterorhabditidae ve Steinernematidae) biyolojik mücadeledeki bakarlılarından dolayı en çok çalışılan familyalar olmuştur [25]. Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarına ait türler geniş bir konak dağılımına ve letal özelliğe sahiptir. Bu yüzden potansiyel biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılabilirler [26-28].

Entomopatojenik nematodlar kimyasal ve mikrobiyal insektisitlerin etkin olarak uygulanmalarının zor olduğu toprak ortamında bulunurlar. Toprak, zararlı böceklerin kontrolü için uygulanan predatör ve parazitlerin nüfuzunu engeller. Entomopatojenik nematodlar için böyle bir bariyer söz konusu değildir. Çünkü toprak bunların doğal

yaşam ortamlarıdır [29]. Günümüzde entomopatojenik nematodlar ticari olarak üretilen bir ürün haline gelmiş olup seralarda, mantar üretim alanlarında [30,31], çilek tarlalarında, yaban mersini bahçelerinde, çim ekili alanlarda [32] elma bahçelerinde [33] ve turunçgil yetiştirme alanlarında geniş ölçekte kullanılmaya başlanmıştır (Tablo 1.2). Biyolojik mücadelenin kapsamının ve uygulama alanının genişletilmesi büyük önem arz etmektedir. Çünkü 21. yüzyılda tarımın devamlılığı büyük ölçüde mikrobiyal kontrol ajanları ve çevreyle dost diğer alternatif mücadele yöntemlerinin kullanımına bağlı olacaktır [34].

Tablo 1.2. Entomopatojenik nematodlar ve hedef zararlı gruplar [25].

Nematod familyası ve türleri	**Hedef zararlı gruplar**	**Kaynak**
Heterorhabditidae		
Heterorhabditis bacteriophora	Lepidoptera, Coleoptera	Begley [26], Klein [35]
Heterorhabditis megidis	Coleoptera	Klein [35]
Heterorhabditis marelatus	Coleoptera, Lepidoptera	Liu and Berry [36], Berry et al. [37]
Steinernematidae		
Steinernema carpocapsae	Lepidoptera, Coleoptera, Siphonaptera	Begley [26], Klein [35],
Steinernema feltiae	Diptera (Sciaridae)	Begley [26], Klein [35],
Steinernema glaseri	Coleoptera (Scarabaeidae)	Klein [35]
Steinernema kushidai	Coleoptera (Scarabaeidae)	Ogura [38]
Steinernema riobrave	Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera	Cabanillas et al. [39]
Steinernema scapterisci	Orthoptera	Parkman et al. [40]

1.2.1.2. Entomopatojenik Virus; *Baculovirus*

Virüsler içerisinde ise en az 16 familyanın böceklerle mücadelede etkili olduğu tespit edilmiştir [41]. Bakulovirusler önemli tarım ve orman zararlılarının kontrolünde özellikle de Lepidoptera ve Hymenoptera takımlarına ait zararlıların kontrolünde biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılmakta ve ticari olarak üretilmektedir. [25, 42, 43]. Brezilya'da soya fasulyelerinde önemli oranda zarara neden olan *Anticarsia gemmatalis*'e karşı *Baculovirüs anticarsia* başarılı bir şekilde kullanılmaktadır [44].

1.2.1.3. Entomopatojenik Protozoa; *Nosema locustae*

Entomopatojenik protozoalar böcek popülasyonlarının düzenlenmesinde önemli role sahiptir [45]. Entomopatojenik protozoalar genellikle konukçuya özgüdür ve kronik enfeksiyona sebep olduğundan yavaş etki gösterir. Çoğu entomopatojenik protozoanın biyolojisi karmaşıktır. Bu organizmalar sadece yaşayan konukçularda gelişebilir ve ara konukçuya ihtiyaç duymaz. *Nosema locustae* çekirge kontrolü için geliştirilmiş tek ticari üründür [46]. Entomopatojenik protozoalar diğer mikrobiyal kontrol ajanlarına göre zararlı kontrolü uygulamalarında birçok dezavantaja sahiptir. Üretilmeleri için yaşayan konukçuya ihtiyaç duyarlar ve oldukça yavaş etki gösterirler. Bu yüzden de biyolojik mücadelede sınırlı uygulama alanına sahiptir.

1.2.1.4. Entomopatojenik Fungus, *Beauveria bassiana*

Entomopatojenik funguslar diğer biyolojik kontrol ajanlarına göre daha geniş konukçu aralığına sahiptir. Lepidoptera, Homoptera, Coleoptera ve Diptera takımlarına bağlı türlerde etkili olduklarından dolayı *Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae* ve *Lecanicillium lecanii*'nin dünya çapında yaygın şekilde kullanılır [47]. Entomopatojenik funguslar konusunda en çok tartışılan konulardan biri bu canlıların toksin salgılamalarıdır. *B. bassiana*'nın Çin'de yerel olarak üretildiği ve Mısır kurduna (*Ostrinia nubialis)* ve Çam tırtılına (*Dendrolimus* spp.) karşı kullanıldığı kaydedilmiştir [48]. Ülkemizde de Çam vd. [49] *B. bassiana*'nın patates böceği *Leptinotarsa decemlineata*'ya karşı bakarılı bir şekilde kullanabileceğini belirtmiştir.

Tablo 1.3. Ticari olarak üretilen entomopatojenik fungus türleri ve hedef zararlar [50, 51, 52]

Ticari ürün adı	Fungus türü	Hedef zararlı	Üretici firma ve Ülke
Ostrinil	*Beauveria bassiana*	Mısır Kurdu	NPP, Fransa
Conidia	*Beauveria bassiana*	Kahve kurtları	Live System Tecnology,
Mycotol GH	*Beauveria bassiana*	Çekirgeler	Mycotech, USA
ComGuard	*Beauveria bassiana*	Avrupa mısır kurdu	Mycotech, USA
Mycotol WP	*Beauveria bassiana*	Beyaz sinekler,	Mycotech, USA
Naturalis-L	*Beauveria bassiana*	Pamuk zararlıları	Troy Biosciences, USA
Proecol	*Beauveria bassiana*	Lepidoptera larvaları	Probioagro, Venezuella
Boverin	*Beauveria bassiana*	Patates böceği	Former, Rusya

Tablo 1.3. Ticari olarak üretilen entomopatojenik fungus türleri ve hedef zararlı grupları [50, 51, 52] (Devamı)

Boverol	*Beauveria bassiana*	Patates böceği	Çekoslovakya
PFR-97	*Paecilomyces fumosoroseus*	Beyaz sinekler	EKO-Tec, USA
Pae-Sin	*Paecilomyces fumosoroseus*	Beyaz sinekler	Agrobionsa, Meksika
Mycotol	*Lecanicillium lecanii*	Beyaz sinekler,	Koppert, Hollanda

1.2.1.5. Entomopatojenik Bakteri, *Bacillus thuringiensis*

1.2.1.5.1. *Bacillus thuringiensis*'in Tarihi

Tarih öncesi dönemlerde zararlıların kontrolü ile ilgili uygulamalar eski Mısır ve Çin kayıtlarında yer almaktadır. Aristo kayıtlarında bal arısında (*Apis millifera*) oluşan foulbrood böcek hastalığı tanıtarif etmiştir [3]

Louis Pasteur ipek böceğinde (*Bombyx mori)* pebrine ve flacherie hastalıklarıyla ilgilenmiştir. Pasteur patojenik mikrobiyoloji ve infeksiyon hastalıklarının öncüsü olarak kabul edilmektedir. Ayrıca Kirby ve Bassi böcek patolojisine önemli katkılarda bulunmuşlardır [4, 5].

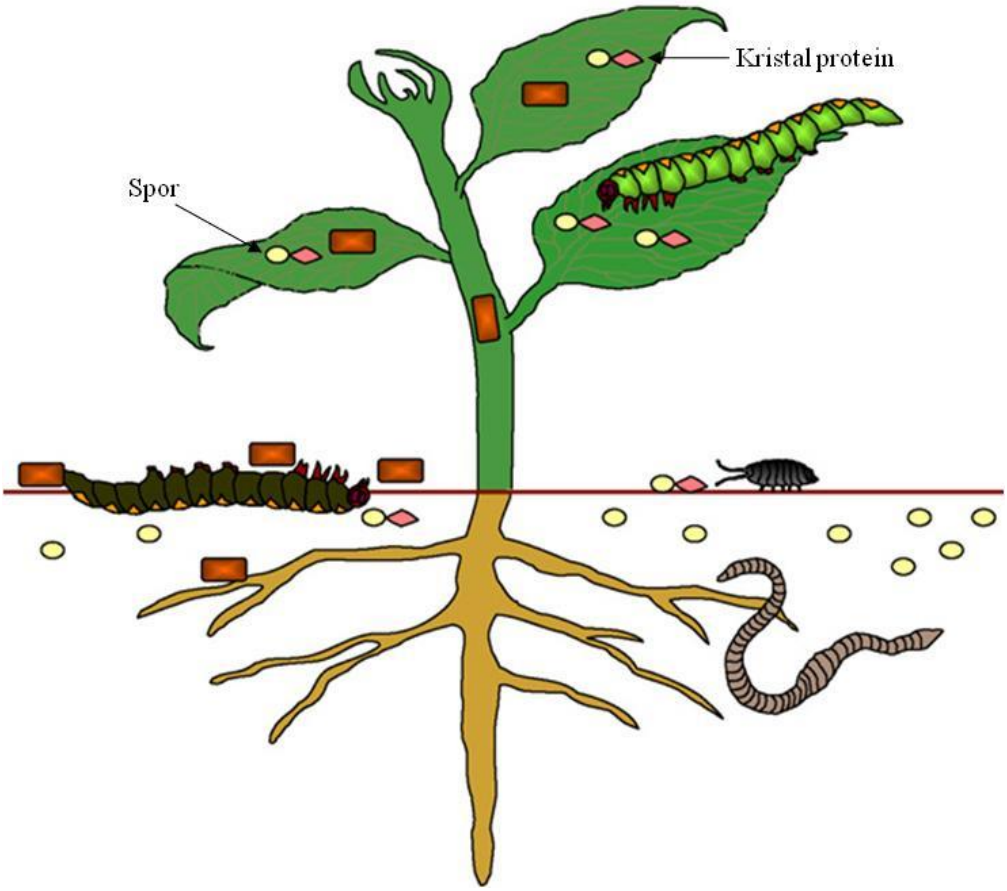
Bacillus thuringiensis'in (*Bt*) insektisidal özelliği bakteri tanımlanmadan öncede biliniyordu. Ancak *Bacillus thuringiensis* 1901 yılında japon bilimi adamı Shigetane Ishiwatari tarafından izole edilmiştir. Ishiwatari bu bakteriyi ipek böceklerinlerinde sotto hastalığına neden olduğundan dolayı *Bacillus sotto* olarak isimlendirmiştir. 10 yıl sonra Berliner aynı bakteriyi Almanya'nın Thuringia bölgesinde *Ephestia kuehniella*'dan izole etmiş ve bu bakteriyi *Bacillus thuringiensis* olarak isimlendirmiştir [6]. Berliner 1915 yılında *Bt* bakterisiyle ilgili detaylı çalışmalarda endosporlar yanında vücut inkluzyonlarının varlığını da göstermiştir [7,8].

1927 yılında Mattes [9] *Bt*'de aynı inklüzyonların varlığını tespit etmiş ancak bu inkluzyonların insektisidal aktivitesi 25 yıl sonra belirlenebilmiştir [10]. Parasporal kristal proteinlerinin önemi Thomas Angus tarafından fark edilmiş ve protein inklüzyonların insektisidal aktivitesini ispat etmiştir. 1955 yılında Philip Fitz-James ve Hannay toksik parasporal kristallerin proteinden oluştuğunu keşfetmişlerdir [11,12].

1.2.1.5.2. *Bacillus thuringiensis*'in Yaşam Döngüsü

Bacillus thuringiensis (*Bt*) toprak, rizosfer, yaprak, temiz su, tahıl tozu, böcekler, kabuklular, halkalı solucanlar, böcekçil memelilerden izole edilebilir (şekil 1.7) [53-61]. *Bt*'nin yaşam döngüsü vejetatif hücre bölünmesi ve sporlanma fazı olarak iki evreden oluşmaktadır. Vejetatif hücreler çubuk şekilli 2-5 µm uzunluğunda, 1 µm genişliğinde gram pozitif hücre duvarı yapısına sahiptir [62]. Sporlanma fazı asimetrik hücre bölünmesi kapsar ve yedi aşamadan oluşur. Birinci aşama aksiyel filament oluşumu, ikinci aşama ön spor septum oluşumu, üçüncü aşama engulfment (parasporal kristallerin ilk oluştuğu evre), dördüncü- altıncı aşama ekzosporium, primordial hücre çeperi ve korteks oluşumu, yedinci aşama sporun olgunlaşmasıaşamalarından oluşur [63]. *Bt* sporlanma esnasında üretmiş olduğu kristal (Cry) proteinleri spesifik pestisidal aktivite gösterdiğinden dolayı dünya çapında biyolojik mücadele uygulamalarında yaygın şekilde kullanılmaktadır [64]. Cry proteinleri Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera takımlarına ait böceklerin belirli türlerine toksiktir. Ayrıca nematod ve akar gibi omurgasız canlılar üzerinde toksik etki gösterdiği de belirtilmiştir [64-66].

Farklı lepidoptera takımına ait larvaların spesifik Cry proteinlerine karşı hassasiyet seviyelerinin farklı olabileceği belirtilmiştir. Örneğin Cry1Ac proteini çoğu lepidopteran böceğe karşı yüksek larvisidal etki gösterir fakat *Actebia fennica* (Lepidoptera: Noctuidae) [67], *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) [68], *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) [69], larvaları üzerinde düşük etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun yanısıra *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) karşı Cry1Ac proteininin Cry2Aa proteininden daha yüksek toksitite gösterdiği belirlenmiştir. *Bt*'nin Cry proteinleri direk böcek larvaların vücut boşluğuna enjekte edildiğinde larva üzerinde herhangi bir etki göstermediği belirtilmiştir. Ancak larvalar *Bt* bulaşmış besinler ile beslendiğinde orta barsak epitel hücrelerinde hasarlara ve parçalanmalara neden olduğu tespit edilmiştir. *Bt* toksinleri üretildikleri anda pro-toksin halindedir. Pro-toksinlerin aktif toksin haline dönüştürülmesinde kritik faktörler mevcuttur. Bu faktörler ortam pH'ı ve spesifik proteazlardır [15].



Şekil 1.7. *Bacillus thuringiensis*'in farklı yerlerden izolasyonu [61].

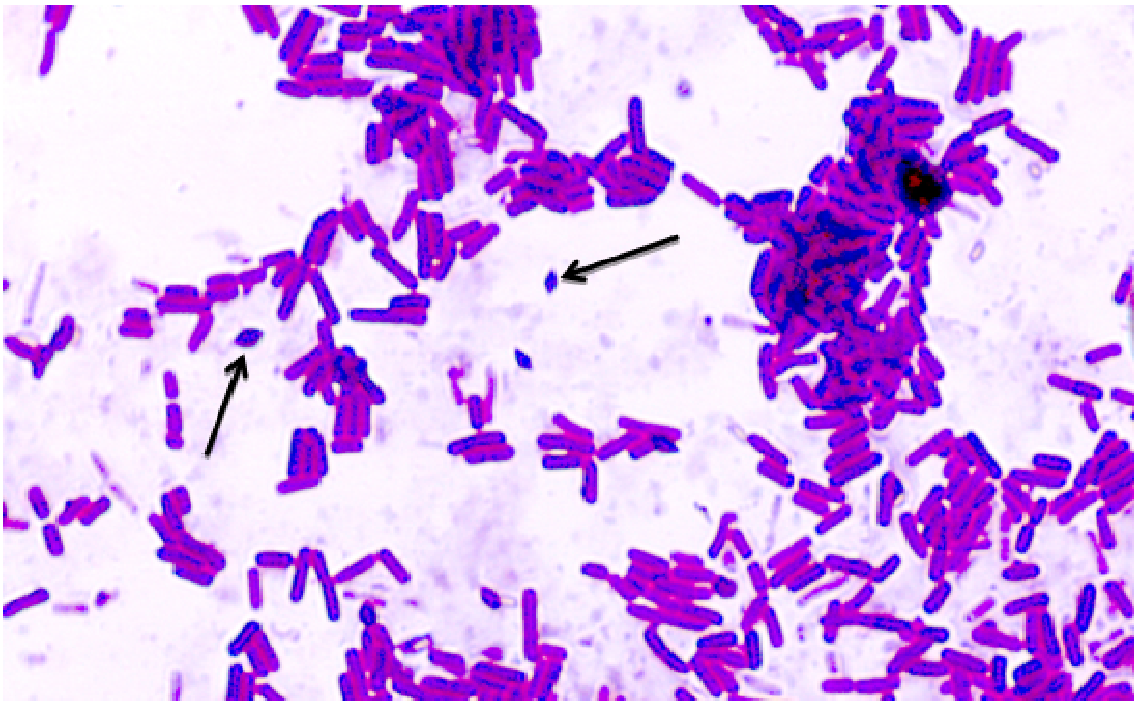
1.2.1.5.3. *Bacillus thuringiensis*'in Sınıflandırılması ve Taksonomisi

B. thuringiensis'in sistematikteki yeri şu şekilde gösterilebilir;

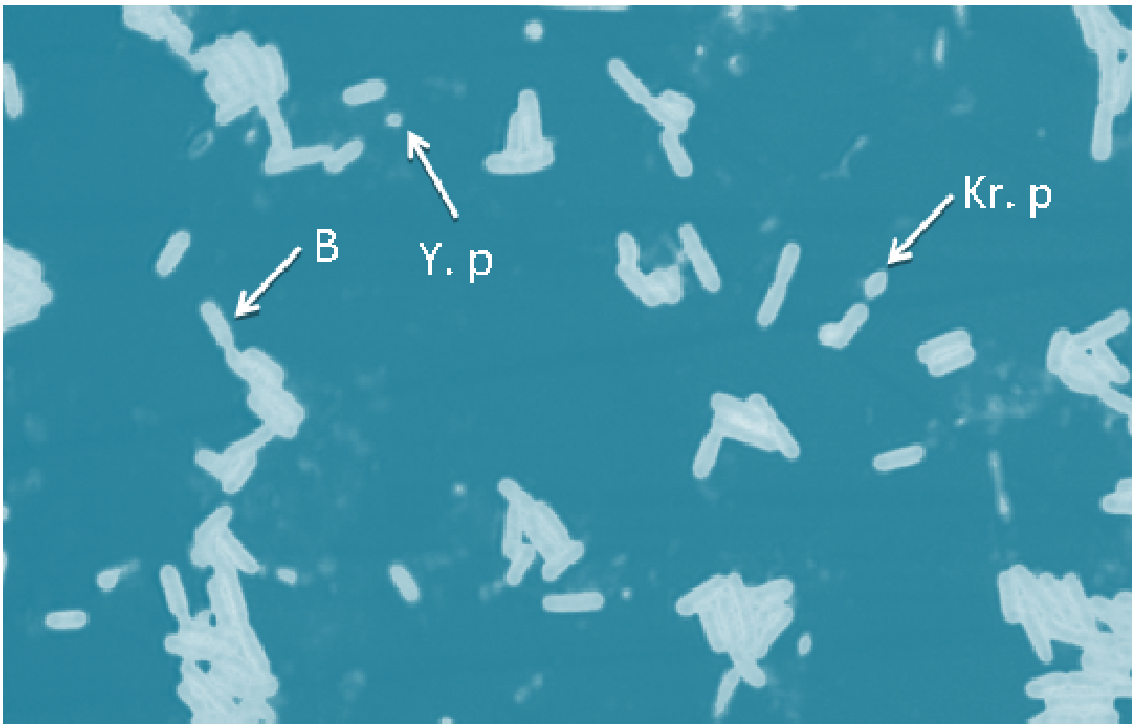
Üst alem	:	Bacteria
Alem	:	Eubacteria
Şube	:	Firmicutes
Sınıf	:	Bacilli
Takım	:	Bacillales
Familya	:	Bacillaceae
Cins	:	Bacillus
Tür	:	*Bacillus thuringiensis*

Bt'nin tanımlanmasında ilk olarak kristal gen ve proteinlerinin tespit edilmesi gerekmektedir. Bu amaç için en iyi yöntemlerden birisi *Bt*'nin oluşturduğu kristal proteinleri boyayarak ışık veya faz-kontrast mikroskobunda incelemektir. Kristal

yapılarının büyüklüğünü tespit etmek için elektron mikroskobu ile de daha ayrıntılı inceleme yapılabilmektedir [70]. *Bt* çok sayıda ve farklı büyüklüklerde plazmitlere sahiptir. **δ**-endotoksin genlerinin çoğu da büyük plazmitler üzerinde bulunurken, bazıları da kromozom üzerinde yer almaktadır [71]. *Bt* suşlarının plazmit içerikleri birbirinden farklı olabilmekte ve bu suşlardaki plazmit sayısının belirlenmesi, bu plazmitlerin *cry* genlerini taşıyıp taşımamasının tespit edilmesi karakterizasyon için önemlidir. *Bt* izolatlarının sınıflandırılmasında kullanılan faydalı bir yöntemde H-serotiplendirmedir. Serovarlar içinde, suşların farklılığı da Barjak ve Bonnefoi [72] tarafından flagella antijenlerine dayandırılarak geliştirilmiştir ve o zamandan beri kullanılmaktadır [73]. Ancak serotip içindeki izolatların biyokimyasal karakterleri, plazmit profilleri ve insektisidal aktiviteleri her zaman aynı değildir. Aynı zamanda, kendi kendine aglütine olan ve hareket yeteneği ne sahip olmayan suşlar bu yöntemle tiplendirilemez. Özel amaçlar için plazmit profil analizi, insektisidal kristal protein (ICP) belirlemek için monoklonal antikor kullanılarak yapılan immünolojik testler ve özgün DNA prob ve primerleri kullanılarak ICP leri kodlayan genin tanımlanması önerilmiştir [74, 75, 76].

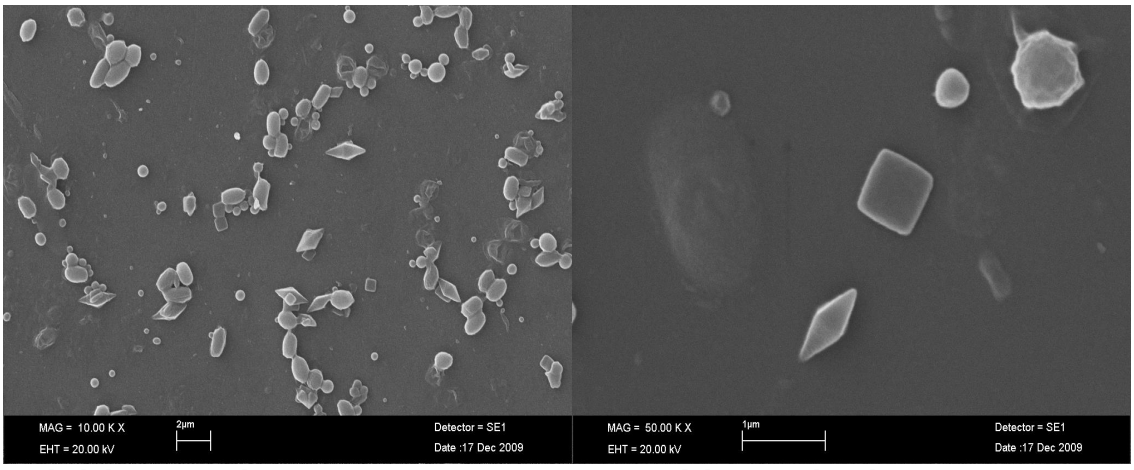


Şekil 1.8. *B. thuringiensis* SY49-1 gram boyama ışık mikroskobu görüntüsü (X1000)



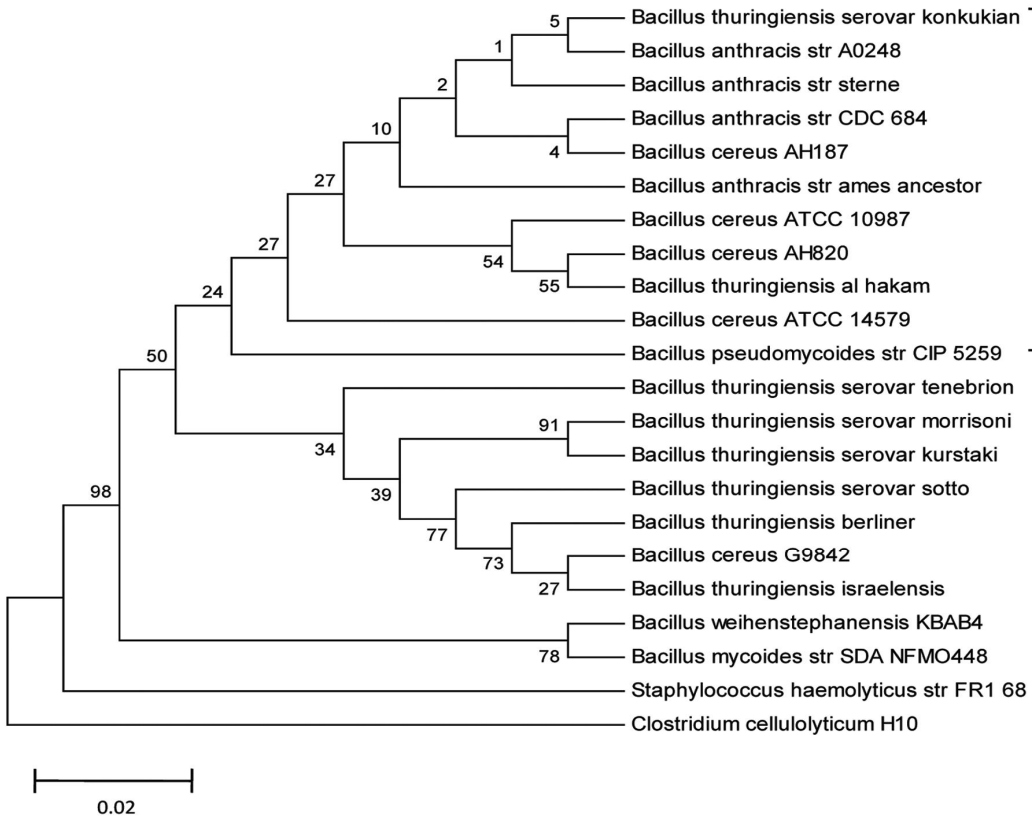
B: Bakteri Y.p: Yuvarlak protein Kr.p: Kristal protein

Şekil 1.9. *B. thuringiensis* SY49-1 Cry protein mikroskop görüntüsü (X1000)



Şekil 1.10. *B. thuringiensis* SY49-1 Cry protein elektron mikroskop görüntüsü

Bacillus cereus (BC) grubu bakteriler arasında yer alan *Bt*'yi ayırt etmek güçtür. *Bt*, BC grup bakterilerinden Cry (kristal) protein üretmesiyle ayrılmaktadır. Ancak farklı *Bt* suşlarını belirlemekte 16S r-DNA dizi analizi kullanılarak tür seviyesinde tanımlama yapmak mümkündür. Şekil 1.5'de BC grubuna ait 20 faklı türün akrabalık ilişkisi (neighbor-joining tree) gösterilmiştir [63].



Şekil 1.11. BC gruba ait 20 farklı türün 16S r-DNA analizine göre akrabalık ilişkisi[63].

1.2.1.5.4. *Bacillus thuringiensis*'in Plazmitleri

Bt suşlarının yaklaşık 6 milyon baz çiftlik bir genoma sahiptir [77] ve 2 ile 272 kb arasında değişken 2 ile 11 adet plazmit bulundurabilir [78, 79]. İnsektisidal kristal proteini (ICP) kodlayan genler bu plazmitler üzerinde yer almaktadır [80]. Büyük ve küçük plazmitler üzerinde bulunan *cry* genlerinin etrafında çok sayıda hareketli bölge bulunur. Bu plazmitler konjugasyon benzeri mekanizmalar ile bir *B. thuringiensis*'ten diğerine kendiliğinden transfer olabilir [81].

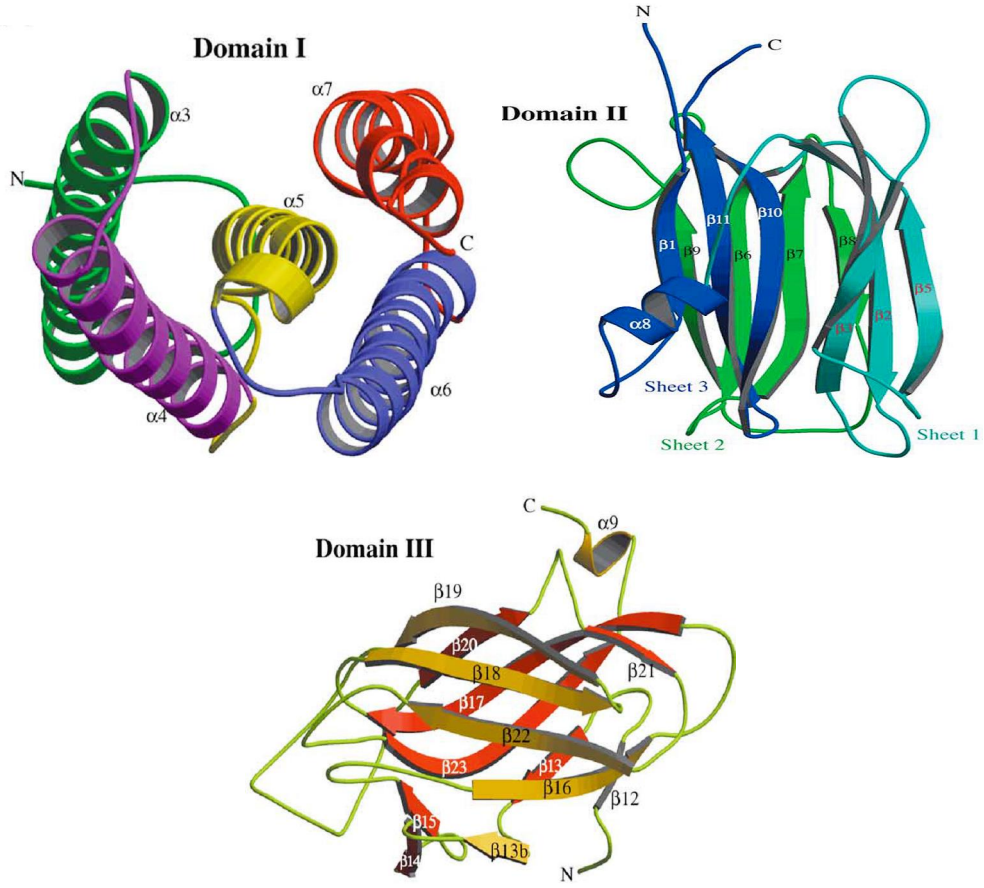
1.2.1.5.5. *Bacillus thuringiensis* Kristal (Cry) Proteinleri

Bt'nin 700'den fazla *cry* geninin dizi analizi yapılmış ve amino asit dizisine göre 70 farklı protein (Cry1, Cry2, ... Cry70) grubuna ayrılmıştır [65]. Her bir Cry protein grubu örneğin Cry1 ve Cry70 protein grubu % 40'dan daha az aminoasit benzerliğine sahiptir. Aynı protein grubu içinde yer alan ve büyük harflerle belirtilen gruplar (Cry1A, Cry1B vb.,) en az % 70 aminoasit benzerliği göstermektedir. Küçük harfle belirtilen gruplar ise (Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ab vb.,) % 70'den fazla ancak % 95'den

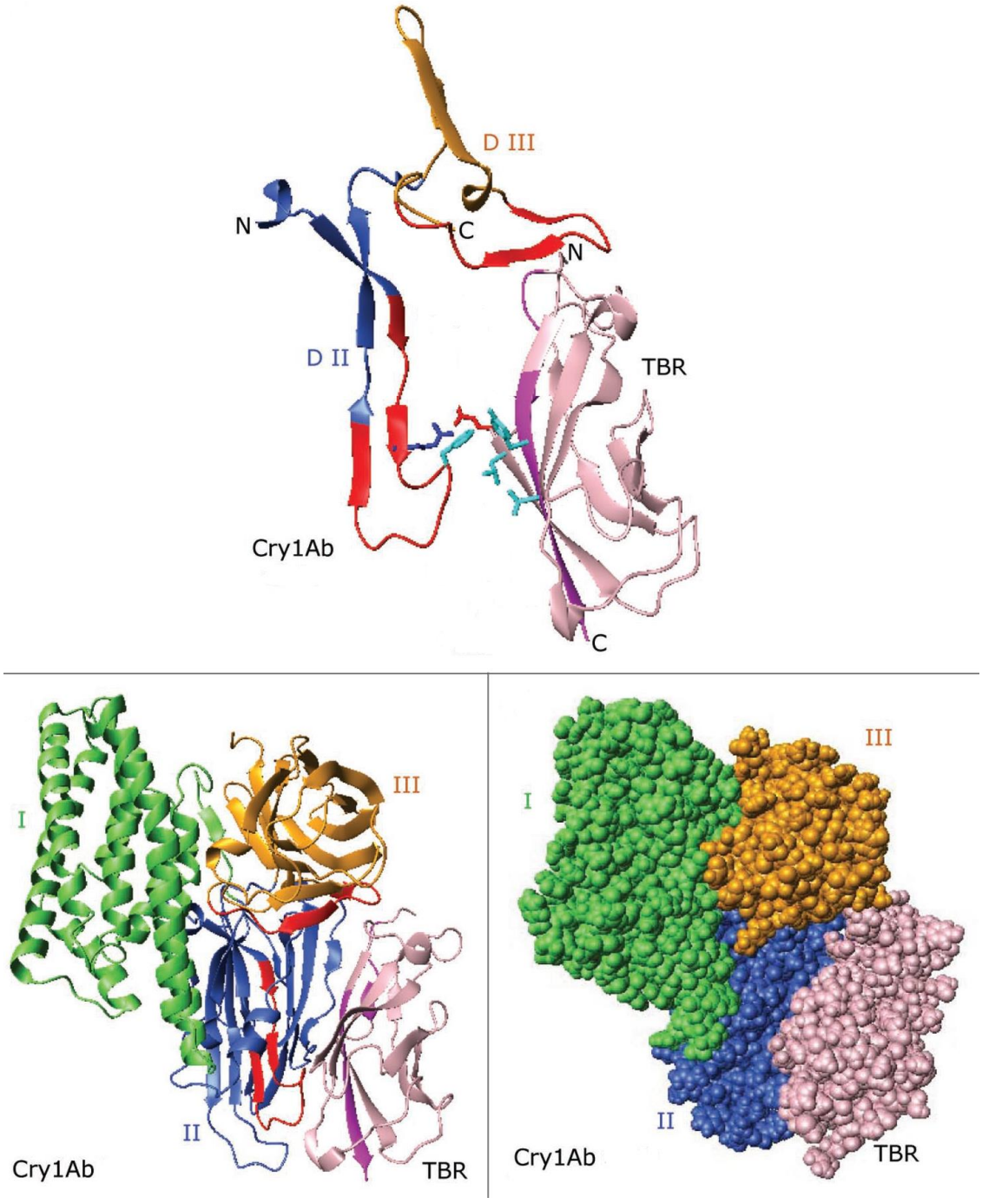
daha az amino asit benzerliği göstermektedir. Cry protein dizilerin filogenetik analizi, Cry proteinin tüm üyelerinde filogenetik olarak ilişkili olmayan üç domainli Cry toksin ailesi (3D), mosquitosidal Cry toksin ailesi (Mtx), binary benzeri aile (Bin) ve sitolitik (Cyt) toksin ailesi olmak üzere 4 protein ailesinin varlığını göstermiştir [82]. Bazı *Bt* suşları ise vejetatif büyüme sırasında VIP (vejetatif) protein olarak isimlendirilen parasporal olmayan insektisidal protein üretirler. Vip1, Vip2 ve Vip3 olmak üzere üç çeşit VIP protein karakterize edilmiştir [83,84]. 3D toksin grubu, Cry toksin ailesinin en geniş grubunu oluşturur. Birçok 3D toksin gubunun (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry8Ea, vb.,) üç boyutlu yapısı tanımlanmıştır [85]. 3D proteinler üç bölgeden (domain) oluşmaktadır. 1. bölge, hidrofobik heliks Ù-5 etrafında altı amfipatik heliks demeti olmak üzere yedi Ù-heliks demetinden oluşur ve toksin oligomerizasyonu, membrana bağlanma ve por oluşumundan sorumludur. 2. bölge, onbir ß alt grubundan oluşur ve böcek bağırsağının epitel hücrelerinin membran proteinlerine bağlanma fonksiyonuna sahiptir. 3. bölge yirmiüç ß sandviçten oluşmaktadır. Bu bölgenin fonksiyonu Cry toksinlerinin bağırsak proteazları tarafından sindirilmesini önlediği, iyon kanallarının oluşumunu sağladığı, reseptöre bağlandığı ve böcek özgünlüğünden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Ayrıca 3D toksinlerde ñtoksin bağlanma bölgesi (TBB)ôdeò toksinin membrana bağlanmasını sağlar [86]. 3D Cry proteinleri bakteri sporlanması sırasında üretilirler ve üretildikleri esnada inaktif (protoksin) haldedir. Örneğin 130 kDa büyüklüğünde üretilen bazı Cry proteinleri (Cry1Aa, Cry1Ab, é vb.,) büyük protoksinler olarak üretilirken, 65-70 kDa büyüklüğünde üretilen diğer Cry proteinler (Cry2Aa, Cry11Aa, é vb.,) küçük protoksinler olarak üretilirler. Büyük protoksinler böceklerin orta bağırsağında proteaz enzimleri tarafından C-terminal uçundan yaklaşık 600 aminoasit, N-terminal uçlarından ise 20-25 aminoasit uzaklaştırılarak aktif toksin haline dönüşürler [86]. Küçük protoksinler ise sadece N- terminal uçundan işlem görür [87]. Protoksin ya da olgun toksin protein fragmentleri incelendiğinde, 3D Cry protein ailesinin filogenetik analizi için farklı bir topoloji ortaya çıkarılır [87-89]. Cry toksinleri protoksin sekanslarının aminoasit dizi benzerlikleriyle sınıflandırılmaktadır. Toksin fragmentlerinin filogenetik analizleri, protoksin dizilerinin analizleri belirli Cry toksinlerinin farklı evrimsel ilişkilerini ortaya çıkarmaktadır [88, 89].

Fakat Cry9Aa proteini, Cry9Ba ve Cry9Ca proteinleri ile C-terminal protoksin fragmentlerinde yüksek dizi benzerliği göstermektedir. Böylece bu proteinler aynı

grupda değerlendirilmelerine rağmen aralarında filogenetik bir ilişki olmadığı belirtilmiştir [88, 89]. Toksin fragmentlerinin filogenetik analizleri, böcek takımlarına etkilerine göre Cry proteinlerinin aynı ya da farklı grupda yer almalarını ortaya çıkarmıştır. Ancak bazı istisnalar da mevcuttur. Örneğin, Cry1B ve Cry1I proteinleri Lepidoptera takımı üzerinde etkili olmasına karşın bazı Coleptera takımı içinde yer alan böceklere de etkili olduğu tespit edilmiştir [88, 89, 90]. Böylece tüm protoksinlerin filogenetik ilişkileri Cry toksinlerinin böcek özgüllüğünün nasıl değerlendirileceğini açığa çıkaramamaktadır. Bireysel bölgelerin evrimsel ilişkilerinin analizi, 1. bölge ve 2. bölge dizileri başlangıçsız olarak analiz edildiğinde farklı toksinlerin benzer kümelenme gösterdiği gibi 1. bölge ve 2. bölgenin birlikte evrimleştiğini ortaya koymuştur. Örneğin Cry1Be, Cry1Cb ve Cry1Eb proteinleri ilişkili 3. bölge amino asit dizileri bulundururken, Cry1Ac ve Cry1Bd proteinleri aynı 3. bölge amino asit dizilerine sahiptir. Farklı Cry toksinleri arasındaki III bölgenin yer değiştirmesi muhtemelen böcek spesifitesini belirmede etkili bir süreçtir [87].

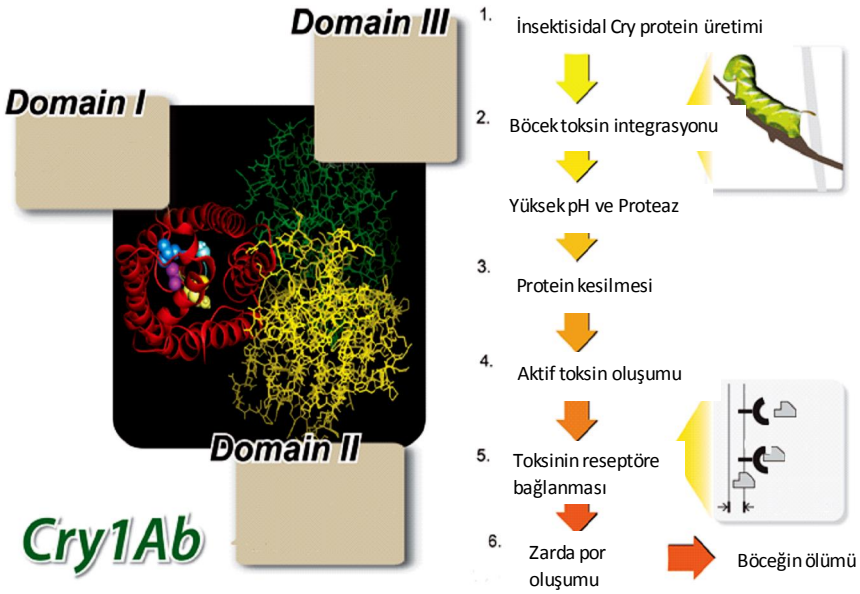


Şekil 1.12. *B. thuringiensis*'e ait Cry proteinin domain I, II ve III'ün yapısı [91]

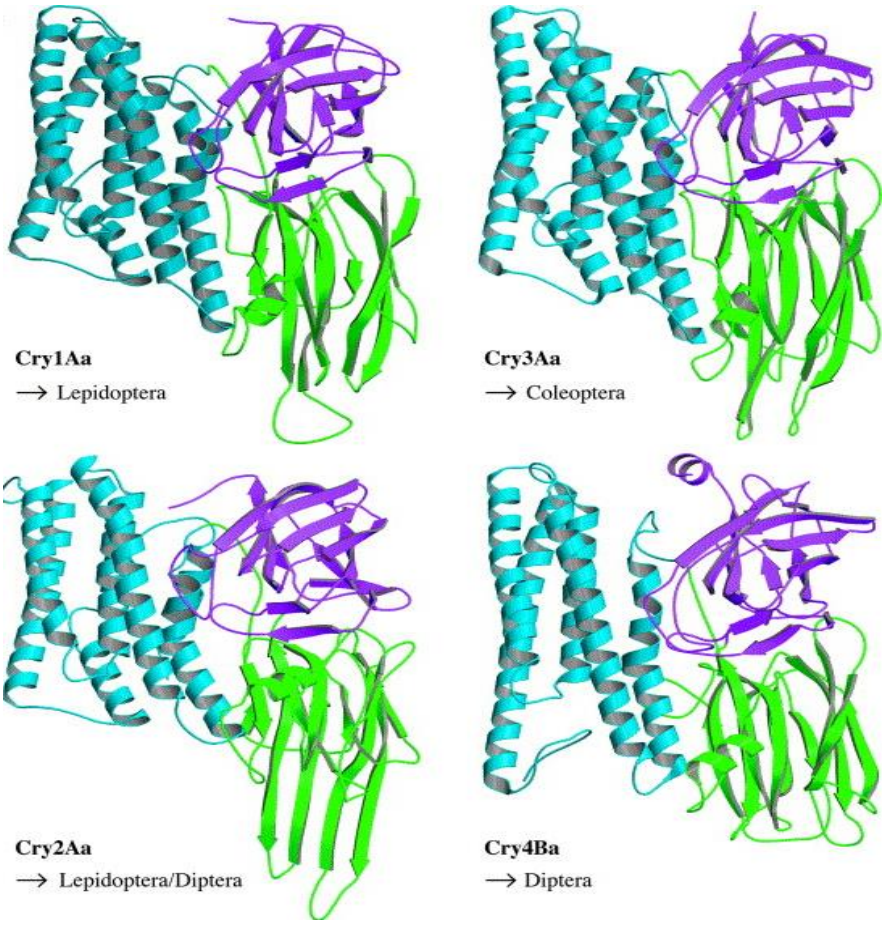


ķekil 1.13. *B. thuringiensis*ĉe ait Cry1Ab proteinin yapēsē[63]

*I; Domain I,
*II; Domain II
*III; Domain III
*TBR; Toksin Baĵ lanma Bölgesi



ķekil 1.14. *B. thuringiensis*ĉe ait Cry1Ab proteinin etki mekanizmasē[92].



ķekil 1.15. *B. thuringiensis*ĉe ait Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry4Ba proteinlerinin yapēsēve etkili olduĵu böcek gruplarē[91]

*I; Domain I,

*II; Domain II

*III; Domain III

1.2.1.5.6. *Bacillus thuringiensis* İnsektisidal Genlerinin İfadesi ve Düzenlenmesi

B. thuringiensis'in (*Bt*) sporlanma evresinde asimetrik hücre bölünmesi görülür ve yedi aşamadan oluşur. Birinci aşama aksiyel filament, ikinci aşama ön spor septumu, üçüncü aşama engulfment (parasporal kristallerin ilk oluştuğu evre), dört- altıncı aşama ekzosporium, primordial hücre çeperi ve korteks oluşumu, yedinci aşama sporun olgunlaşmasıdır. Aşamalarından oluşur [63]. Sporlasyonun en önemli noktalarından biri parasporal kristallerin oluşmasıdır. İnsektisidal toksinler (Cry toksinler) genellikle **δ**-endotoksin olarak ifade edilirler ve bazı böcek türlerine özgüdürler [93]. Bu toksinleri kodlayan genlere *cry* gen ailesi denilir [64, 94]. *cry* genlerinin en önemli ortak özelliklerinden biri büyümenin durgun evresinde ifade edilmeleridir. Cry proteinleri (*cry* gen ifadesinin son ürünleri) kuru hücre ağırlığının yaklaşık % 20-30 karşılık gelip, genelikle ana hücrede birikir.Bu proteinler sporlanmanın 3. aşamasında oluşmaya başlar ve 7. aşamanın sonuna kadar devam eder [62].

Bt Cry toksinleri için **δ**-endotoksin ifadesi yanlış kullanılmaktadır. Heimpel [93] *Bt* parasporal kristal proteinlerini hücre içeresinde oluştuklarını ve bakteri toksik bileşikleri içerisinde dördüncü sırada keşfedildiği için böyle adlandırmıştır. Fakat **δ**-endotoksinler çeşitli gram negatif bakterilerin dış zarında bulunan bütün haldeki ñOò somatik antijen kompleksinin lipopolisakkaritleri ile alakalı olup, bunların hastalığa neden olma kabiliyetlerinin önemli bir faktörüdür [95]. Etki mekanizmalarına bakıldığında Cry toksin basit bir toksin olup, basit bir proteinin monomeri veya oligomeri olarak tarif edilir [96]. Cry toksin oligomerleşebilen toksik bir monomerdir. *Bt* parasporal kristalleri oligomero polipeptit protoksin alt ünitelerinden oluşur. Protoksin, Cry toksinin toksik olmayan formudur. Yani protoksinin aktifleşmesiyle insektisidal Cry toksin oluşur [97, 98]. Protoksinin aktif toksine dönüşümü konukçu özgüllüğüne bağlı olarak toksin gruplarına arasında farklılık gösterir. Örneğin Cry1A ve Cry4 (~65 kDa) toksinleri sırasıyla Lepidoptera ve Dipteraöya etkili olup, 125-135 kDa ağırlığındaki protoksinlerin ürünleridir. Fakat Coleopteraöya etkli Cry3 toksinleri (~68 kDa) 72 kDa büyüklüğündeki protoksinlerinden üretilir. Sentezlenen Cry protein miktarı transkripsiyonel, post transkripsiyonel ve post translasyonel seviyede gerçekleşen bir dizi mekanizmayla koordineli şekilde kontrol edilir. *Bt* sporulasyonu, kor RNA polimeraza bağlanan ve sporulasyona özgü promotorları kullanarak transkripsiyonu yöneten ñ*sigma* (σ)**ò** faktörünün peş peşe aktivisyonu ile başlar [99]. σ^H; σ^F; σ^E; σ^G ve

σ^K olmak üzere beş tane sporulasyona özgü sigma faktörü bulunur. σ^H bölünme öncesi hücrede, σ^E ve σ^K ana hücrede, σ^F ve σ^G ise sporlanma başlangıcında aktiftir.

Cry genlerine ait çeşitli promotorlar tanımlanarak, dizileri belirlenmiştir [100-104]. Örneğin *cry1Aa* geni iki çakışan (BtI, BtII) promotorla ifade edilir [105]. Downstream promotordan (BtI) yapılan transkripsiyon sporlasyonun 2. ve 6. aşamasında aktif olup σ^E ile yapılır. Daha sonra transkripsiyon upstream (BtII) promotorla desteklenilir. BtII promotoru sporlasyonun 6. aşamasından son aşamaya kadar aktif olup σ^K ile çalışır. İki promotorun ard arda kullanımı büyük bir ihtimalle sporulasyon döngüsü boyunca protoksin sentezini gerçekleştirmektedir. Fakat bazı *cry* genlerini sporulasyondan bağımsız ifade edildiği belirtilmektedir. Örneğin *cry3A* gen ifadesi sporulasyonu başlatamayan mutant suşlarda gerçekleştirilir [106]. Buna ilaveten De Souza *et al*., [107] ve Malvar *et al*., [108] *cry3A* genin vejetatif büyüme esnasında üretildiğini ifade etmişlerdir. *Cry3A* promotoru vejetatif hücrelerin σ faktörü olan σ^A ile tanınır exponential vejetatif büyüme evresinin sonunda aktifleşir ve sporlasyonun 3. aşamasına boyunca aktif kalır. Bazı *cry* genlerinin transkripsiyonel seviyede ifadesini düzenleyen ilave bazı proteinler görev alır [109]. Bu düzenleyici protein piruvat dehidrogenazın E2 alt ünitesi olarak tanımlanmıştır. Mutasyona uğramış upstream bir bölge ve β-galaktozidazın kodlayan dizisinden oluşan bir kimera E2 alt ünitesinin bağlanma afinitesini düşürerek β-galaktozidaz sentezinin azalmasına sebep olur. Açık bir şekilde *cry* gen düzenlenmesinde görev alan piruvat dehidrogenazın E2 alt ünitesinin varlığı katabolik aktivite ve Cry toksin sentezi arasında bir bağlantı olduğunu göstermektedir [109]. *cry* gen ifadesinin post translasyonel seviyede düzenlenmesi mRNA stabilitesine bağlıdır. Cry-mRNA'nın yarı ömrü yaklaşık 10 dk.'dır. Bu değer ortalama bir bakteriyel mRNA'nın yarı ömründen en az 5 kat daha fazladır [110]. Çoğu *cry* genin 3' ucundaki transkripsiyonel terminatörlerin (pozitif retro regülatör) bulunması mRNA stabilitesine katkıda bulunabilir [111]. Diğer bir ifadeyle transkripsiyonel terminatör Cry-mRNA'yı 3' ucundan bağlayan ekzonukleaz parçalanmasından koruyarak stabilitesini artırır.

Agaisse ve Lereclus [112] *Bt cry3A* mRNA'larının stabilizasyonu için gerekli mükemmel bir shine-dalgarno (SD) dizisi (GAAAGGAGG) tanımlamıştır. Bu dizi 5' translasyon edilmeyen bölgede -125 ve -117 arasında haritalanmış olup yazarlarca stabilize SD

(stab-SD) motifi olarak ifade edilmiştir. mRNA stabilitesinin 30s ribozomal alt ünitenin 16s rRNA'sı ile stab-SD arasındaki ilişkiden kaynaklanması oldukça muhtemeldir. 30s ribozomal alt ünitenin bu diziye başlanması muhtemelen mRNA'yı 5'-3' ribonükleaz aktivitesinden korumaktadır. Bu tür potansiyel stab dizileri *cry3Ba* ve *cry7Aa* genlerinin benzer upstream pozisyonları ile *cry1Ac* ve *cry1Ic* genlerinin intergenik kısımlarındaki *cry1Ic*'nin upstream pozisyonlarında da tanımlanmıştır [113].

Cry genlerinden stabil parasporal kristallerin oluşması henüz olgunlaşmamış toksinlerin parçalanmasını engelleyen post translasyonel düzenleyici bir mekanizmadır. Ayrıca protoksinin C-terminal kısmındaki sisteince bakımından zengin bölge di-sülfit bağları oluşturarak kristallerin stabil olmasını sağlar. Bazı araştırmacılar parasporal kristalleri stabilize ve kristalize etmek için ilave proteinlere ihtiyaç olduğunu ifade etmişlerdir [114-116]. Bu proteinler şaperon olarak görev yapar ve kristalizasyonu teşvik eder.

cry genlerinin ilginç bir özelliği de yüsek esneklik göstermeleridir. Bu özellik Cry toksinlerin böcek-konukçu aralığındaki değişikliğine katkıda bulunabilir. Bu tür genetik esneklik *cry* genlerinin değişikliğine neden olan çeşitli transpozonlar ve insersiyon elementlerinden kaynaklanır. Aslında bu tür transpozonlar gen çoğalmasını ve yeni genlerin ortaya çıkmasına katkı sağlayabilir [87]. Buna ilaveten *cry* genlerin aktarılabilir plazmitlerde olmasını farklı *Bt* suşlarını arasında yatay gen transferi ihtimalini arttırır. Bu da farklı Cry toksin içeriği bulunan yeni suşların oluşmasına neden olur [117, 118].

cry genlerinin operonlarda kümelendiği ve organize olduğu birçok *Bt* suşunda gösterilmiştir [119]. Operonların bazılarını Orf1 ve *p19* gibi en az bir upstream okuma çerçevisi içerir. İkinci bir *orf* (Orf2 veya *p20*) *cry2* ve *cry11* operonlarında bulunur. *Bt* tarafından üretilen Cry toksinlerin doğasını ve konsantrasyonu sadece spesifitesini yansıtmakla kalmayıp bireysel parasporal kristallerin yapısal dizaynını da yansıtır [113, 120]. *cry* genlerin operonlarda düzenlemesi genetik rekombinasyonun artmasını sağlar. Bu tür rekombinasyonlarla yeni toksinler ve yeni konukçu spesifitesi oluşabilir. Böylece ürün böcek türlerinin etkinliğinin korunmasında sağlanır.

Anlamlı bir şekilde operonlarda organize olmuş *cry* genlerinin çoğu (*cry1Ic1*, *cry2Aa*, *cry2Ac* ve *cry11A* vb.,) truncated toksinleri kodlar. Bu toksinlerde uygun katlanma ve kristalizasyon için gerekli olan sisteince zengin C-terminal bölgesi yoktur. Bazı durumlarda protoksinler P19 ve P20 proteinlerinde olduğu gibi truncated toksinler için moleküler şaperonlar olarak işlev görebilir [113-115].

1.2.1.5.7. Cry Proteinlerinin Biyokimyası ve İşlevsel Proteomiği

Olgun spor oluştuktan hemen sonra spor ve parasporal kristal protein ana hücreden dışarı bırakılır, larvaların tüketimi için hazır hale gelir. Meydana gelen Cry toksin virulans faktörü olup, *Bt*'nin BA ve BC'den rahatlıkla ayırtedilmesini sağlar. Farklı parasporal kristaller tek ya da çok sayıda Cry proteininden oluşur. Örneğin *Bt kurstaki* HD 73'ün parasporal kristali sadece Cry1Ac içerirken aynı türün farklı bir suşu olan HD1'in parasporal kristalinde Cry1Aa Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa ve Cry2Ab olmak üzere beş faklı Cry proteini vardır. Cry toksinlerinin diğer bir özelliği farklı şekilde birlikte kristalize olan öncül protoksinlerdir. Bu durum elektron mikroskobunda farklı şekilde görülebilmektedir. Cry toksinler özelllikle büyük plazmitlerde buluna *cry* genleri tarafından kodlanır. Fakat *cry* genler kromozomal DNA'ya da entegre olabilir. İlk *cry* genlerin klonlamasıve dizilenmesinden bu yana 300'den fazla *cry* genin nükleotit dizisi çıkarılmıştır [121,122]. Höfte ve Whiteley [123] ve Carlton [124] konukçu aralığına bağlı olmak koşuluyla Cry proteinler ve bunlarıkodlayan genleri için evrensel bir adlandırma ve sınıflandırma şemasıönermişlerdir. Daha sonra aminoasit dizi benzerliğine göre faklı bir adlandırma formatı geliştirilmiştir [94]. Crikmore *et al*., [94] geliştirdiği bu sınıflandırma sisteminde *cry* genleri 51 grup ve alt gruba ayrılmıştır. Cry toksinleri ise böcek konukçu özgüllüğüne göre 6 ana sınıfa ayrılmıştır. Bunlar grup1-Lepidoptera spesifik (Cry1 Cry9 Cry11 ve Cry15) grup 2-Lepidoteraï Diptera spesifik (Cry2) grup 3ï Coleoptera spesifik (Cry3, Cry7, Cry 8), grup4-Diptera spesifik (Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry19, Cry20) grup5-Lepidoptera-Coleoptera spesifik (Cry1I) grup-6 Nematod spesifik (Cry 6). Cry1I, Cry2, Cry3, Cry10 ve Cry11 toksinleri (73-82 kDa) kendine has özelliklere sahiptir. Çünkü daha büyük Cry1 ve Cry4 proteinlerinin (130-140kDa) doğal parçalarıgibi görünmektedir. Cry3Aa [125], Cry1Aa [126] Cry1Ac [127] Cry2Aa [128], Cry3Bb [129], Cry4Ba [91] Cry4Aa [130], Cry8Ea1 [131] gibi bazıCry proteinlerinin 3 boyutlu yapısıçıkarılmıştır.

Tüm Cry proteinlerin 3 yapısal bölgesi bulunur ve yüksek düzeyde topolojik benzerlik gösterirler. 1. bölgede birbirine bağlı 7Ŭ heliks bulunur. Ŭ helikal sarmallarda merkezi bir ampifatik heliks yer alır. Bu heliks tanımlanan tüm toksinler içinde en iyi korunmuş bölgedir. 1. bölgede görülen çeşitli mutasyonlar toksisiteyi ortadan kaldırmasına rağmen hücresel reseptörlere bağlanmada problem oluşturmadığı görülmüştür. Bu mutasyonların toksin moleküllerinin konformasyonunda toksisiteyi engeleyen kapsamlı bir değişiklik yapıp yapmadığı bilinmemektedir. 2. bölge, herbiri bir çengelle sonlanan üç set anti paralel ß tabakadan oluşur. ß tabakalar merkezi bir hidrofobik öz çevresinde paketlenmiş olup ß prizma yapısı olarak bilinen şekli oluşturur. 3. bölge, ñ jellyï roll ñ topolojisini oluşturan iki anti paralel ß tabakanın üst üste gelmiş halidir. Yapılan çalışmalarda 2. ve 3. bölgelerin reseptöre bağlanma ve insektisidal aktiviteden sorumlu olabileceği belirtilmiştir. 1. bölge hücre zarında iyon kanalı oluşturur [64]. Hücre zarıyla bağlantı kurulmasının ardından toksinin zara girmesini kolaylaştırmak için yeniden katlanır [132,133]. Bazı araştırmalarda hidrofobik Ŭ-4 ve 5 helikslerin zara girdiği ve toksisiten sorumlu olduğu belirtilmiştir [134,135]. Fakat yapılan *insitu* veya *invivo* çalışmalarda bu durumu destekleyen bir delil yoktur. 2. bölge, diğer bölgelerle kıyaslandığında çok dallanma gösteren kısım olup diğer toksinlerin 2. ve 3. bölge ile yerdeğiştirmesi konukçu spesifitesini etkileyebilir. Domainin ucunda bulunan anti paralel ß tabakaların zicirlerini bağlayan halkalar gösterilmiş olup Cry toksinleri içerisinde korunumu enaz olan bölgedir. Ilginç bir şekilde Cry1A, Cry2A, Cry3A, Cry4A ve Cry5A toksinlerinin uç halkasal uzunluklarının boyu oldukça değişkendir. Cry5Aa toksini en uzun halkasal uça sahipken Cry3Aa en kısa halkasal kısıma sahiptir. Halkasal uzunlukların domain yapısında ve işlevinde ne tür etkisinin olduğu bilinmemektedir. Boonserm *et al.*, [91] daha kısa halkasal uçların 2. bölgedeki merkezi ß tabakanın yapısını etkileme ihtimalinin bulunduğunu ve sonuç olarak 1. ve 2 bölgelerin etkileşimini engelleyebileceğini belirtmiştir. Yapısal ve işlevsel görevleri ne olursa olsun bu halkasal yapılar reseptör tanıma, bağlanma ve spesifitede anahtar unsurlar olarak ortaya çıkmaktadır.

1.2.1.5.8. Gram Negatif Konukçularda Insektisidal Protein Ifadesi

Geçmişe bakıldığında klonlanan her hangi bir gen için ilk rekombinant ifade konukçusu *Escherichia coli* olmuştur. *E. coli*'de *Bt* kristal proteinlerin ifadesi ilk olarak klonlanan genin izolasyonun belgelendirilmesi için kullanılmıştır. Doğal *Bt* ifade sinyalleri

genelikle *E. coli* de ıklev görürken, bazē durumlarda kristal üretimi ile sonuçlanērken [136] bunlarēn temel kullanēmē kristal proteinlerin temel labarotuvar seviyesinde incelenmesi olmuktur. *Bt* proteinleriyle ilgili çalēkmalar çoĵunlukla Cry1 ve Cry3 proteinleri üzerine olmuktur. Bu proteinler *E. coli*ô de oldukça iyi ifade edilmektedir [137]. Boonserm *etal*., [138] *E. coli*ôde kristalografi bakēmēndan saf protein üretimi için *cry4Aa* odaklē P_{tac}-P_{cry4A}ôyē açēklamēktēr. Ürün tescili için toksikoloji materyalinin üretimi ile ilgili çekitli çalēkmalar vardēr. Gustafson *et al*., [139] yaptēĵē çalēkmada 1000-1 fermantasyonunda 50 gr üzerinde üretilmiklerdir. Huang *et al*., [140] IPTG indüklenebilir *Pseudomonas fluorescens* ifade sistemin 75-1 yüksek yoĵunluklu fermantasyonda % 98 saflēkta 37gr Cry35Ab1 ve 31gr Cry34Ab1 üretimini belirtmiktir. Huangôēn çalēkmasēndaki Cry35Ab1 ve Cry34Ab1ôin verimi 3-4 g/L tahmin edilirken *E. coli*ôde 1g/L altēnda olduĵunu ifade etmiklerdir.

Gram negaif konukçularda yüksek seviyede kristal protein ifadesi için genin konukçuya dizayn edilmesi ve ifadesinin düzenlenmesi önerilmektedir. Sporulasyon ile indüklenen *Bt* promotorlarēyla baĵlantēlē diziler *E. coli*ô de aktif promotorlar olabilir. Aksi halde ifade de problem olabilir [136,141]. *Bacillus*ôun ribozom baĵlanma bölgeleri *E. coli*ôde iyi çalēkēr. Fakat *Bacillus* türleri UUG baklangēç kodonunu etkili bir kekilde kullanērken bu kodon *E. coli*ô de etkili deĵildir. Örneĵin UUG ôin AUG ile deĵiktirilmesi *cry1Ba* ôēn ifadesini bariz bir kekilde arttērdēĵē belirtilmiktir [142]. Schnepf *et al*., [141] doĵal *cry1Aa* promotor/translasyon baklanĵēcēnēn *E. coli*ôde ß-galaktosidaz okuma çerçevesinde bulunmasēnēn önemli oranda *LacZ* protein üretimiyle sonuçlandēĵēnē ortaya koymuktur.

m-RNA ve protein stabilitesinin yanēnda transkripsiyonel-translasyonel uzama ve ekleme ikleminin analiz edilmesi ve doĵrulanmasē zordur. *E.coli*ôde *cry4Aa* geninin toksin kodlayan kēsmē konukçu kodon kullanēmē ile yeniden sentezlendiĵinde [143] ifade de bek kat, aktif protein eldesinde üç kat artēk gözlenmiktir.

Yakēn baĵlantēlē genlerden üretilen 20 kDaôluk bir proteinin birlikte ifadesi olmadan orjinal *cyt1Aa* klonlarēnēn *E. coli*ôde ifadesi ya gerçekleкmez ya da çok az miktarda görülür. Bakka bir çalēkmada P20ônin (antibadi yapēmē için kendisini yeterli düzeyde üretir) *cyt1Aa* ile doĵrudan baĵlantē kurduĵu ve 42 ºCôde ēsēē koku duyarlē *LacZ X90* proteinini stabilize edebildiĵi gösterilmiktir [144].

P20ô *cyt1Aa*óda delesyon olma durumuna karşı konukçuyu korumak için bir şaperon etkisi gösterir. Son çalışmalar şöyle düzenlemiş promotor kullanarak *E. coli*óde insektisidal olarak aktif *cty1Aa* genin yalnız başına üretilebiliş ini göstermiştir [145-147].

*E. coli*ôde proteinlerin ifadesine yönelik çalışmalar genellikle insan gen ürünleri üzerine olmuştur. Bununla birlikte ifade vektörleri ve konukçu şşklarında önemli gelişmeler kaydedilmiştir. İşadesi az olan ya da yüksek miktarlarda ihtiyaç duyulan proteinlerin üretiminde önemli ilerlemeler saş lanmıştır [148-151].

1.2.1.5.9. *Bacillus thuringiensis*ôde Pestisidal Protein İşadesi

Moleküler metotların *Bt* toksinlerine uygulanmaya başlandığı zamanlarda bu yeni elde edilmiş bilginin püskürtülebilir *Bt* biyopestitlerine dönüştürülmesinde önemli kaygılar bulunmaktaydı. Ayrıca klonlamış DNAônın *Bt*ôye aktarılmasında pratik bir yolun bulunmaması genetiş ine müdahale edilmiş organizmaların salıverilmesi hususundaki kaygıları da ortaya çıkarmıştır. Moleküler analizlerin büyük çoş unluş u ürün geliştirmekten ziyada toksin çalışmalarına yöneliktir [137]. 1980ôlerin sonunda bir çok labarotuvarda elektroporasyonla *Bt*ôe transformasyonun yapıldığı belirtilmiş ve böylece hedeflenmiş genetik modifikasyonların yolu açılmıştır. Bu durum klonlama vektölerinin çoş almasına neden olmuştur. Klonlama vektörlerinin birçoş u *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*óden elde edilmiş ve bu vektörlerin mevcut vektörlerden daha stabil kaldığı belirtilmiştir. [137, 152, 153]. Genetik manipulasyonlar ile yeni insektisidal gen kombinasyonlarına sahip *Bt* suşları elde etmek için yeni metotlar geliştirilmiştir [94, 137, 154]. *Bt* toksin gen ifadesi düzenlenmesi anlayışı, promotor ve RNA polimeraz ů faktörleriyle ilgili önemli düzeydeki ifade kontrol seviyesi, mRNAôın 3ô 5ô ucunun stabilitesini saş layan diziler ve kristal oluşumunu artıran şaperon benzeri proteinlerin varlığı bu anlayışı önemli ölçüde geliştirmiştir. [64, 116, 155-157]. Ayrıca Gilmer ve Baum [158] Cry1Ac protoksin segmentinin Cry1Fa ile yer deş iştirmesiyle Cry1Fa önün ifadesinin arttığını belirlemişlerdir. Bu tip modifikasyon daha sonra rekombimnat *Bt* suşlarıve transjenik bitkilerde uygulanmıştır.

Bt'de stabil genlerin yerleştirilmesi için rekombinasyon sistemlerin kullanılabileceği belirtilmektedir. Bunun için bazen [157, 159] homolog rekombinasyon, bazen de bölgeye özgü rekombinasyon sistemi kullanılmıştır [160,161]. İki sistemde de suşlar alanda bakarılığı bir şekilde test edilmiş [157,162] ve Ecogen suşlar [156] kayıtlı ürünler olmuştur; Bunlardan Raven®, Crymax® ve Lepinox®; son ikisi 2011'den beri satışa sunulmuştur (Tablo 1.4). Diğer ikisi sırasıyla Sandoz and AgrEvo için tescil işlemlerini bağlatmıştır. Network Database [163] ve Abbott Labs rekombinant *Bt* suşlarıyle tescil çalışmalarını yapmaktadır. Baum *et al.*, [156] Vip3 proteinlerinin ifadesini arttırmak veya zwittermisin düzenlenmesini değiştirmek suretiyle *Bt* suşlarının insektisidal kapasitelerini arttırma ihtimalinden bahsetmiştir. En yeni çalışmalar *Vip3A* geninin sporlanma sırasında Cry1C promotorunun [164] veya Cry11A/P19 [165] ile ifadesinin programlanabileceğini göstermiştir. Birinci durumda Vip3A sporulasyon sırasında birikmiş Cry1C protoksin segmentine fizyon yapılarak inklüzyon oluşumu indüklenebilmiştir. Fakat ortaya çıkan protein aktivitesi oldukça düşük bulunmuştur. İkinci durumda ise tüm kültürün insektisidal aktivitesi bariz bir şekilde artmıştır. Zwittermisin geni Kevany *et al.*, [166] tarafından tanımlandığından ve *Bt*'ün büyük DNA parçalarının manipülasyonlarının yapılabilmesinden beri [167] *cry* gen sentezinin değiştirilmesi mümkün olmuştur. Cry proteinlerinin ifadesinin arttırılmasığ için gen değişimlerinden yukarıda bahsedilmiş olup, entero toksinlerin eliminasyonlarığ için bu metotlar kullanılmıştır [168]. *B. subtilis*'de genom redüksiyonlarığ sporulasyon fazına geçişi uzatır ve rekombinant protein sentezinin arttırılmasınığ sağlar.

Tablo 1.4. Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansığ (US/EPA) tarafından tescillenmiş rekombinant (Cry protein) biyo pestisit ürünleri [163].

Ürün	**Şirket**	**Cry Protein**	**Organizma**	**Kayıt Yılı**
M-Trak®	Mycogen	$Cry3Aa^{R}$	*P. fluorescens*	1991–2003
MVP®, MVPII®	Mycogen	$Cry1Ac^{R}$	*P. fluorescens*	1991–2003
Raven®	Ecogen	Cry1Ac(2), Cry3A, $Cry3Bb^{R}$	*B. thuringiensis*	1995–2005
MATTCH®	Mycogen	$Cry1Ac^{R}$ ve Cry1Ca/Cry1Ab $protoksin^{R}$	*P. fluorescens*	1995–2004
M/C®	Mycogen	Cry1Ca/Cry1Ab $protoksin^{R}$	*P. fluorescens*	1996–2003
CRYMAX®	Ecogen	Cry1Ac(3), Cry2A, $Cry1Ca^{R}$	*B. thuringiensis*	1996–2011+
Lepinox®	Ecogen	Cry1Aa, Cry1Ac(2), Cry2A, Cry1Fa/1Ac $protoksin^{R}$	*B. thuringiensis*	1996–2011+

R Rekombinant protein ürünü, + :2011'den beri üretimine devam ediyor

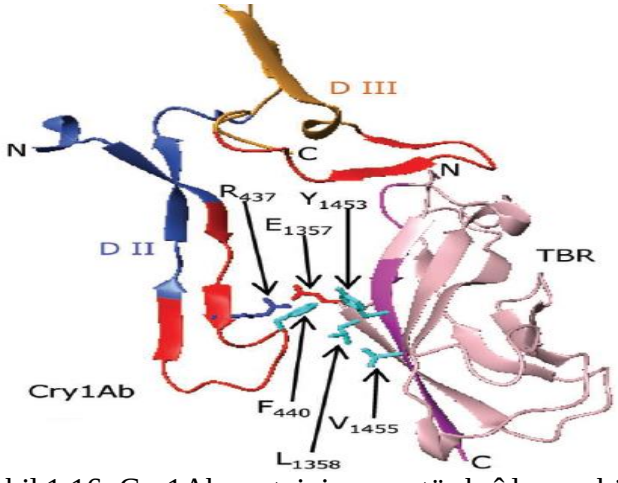
1.2.1.5.10. *Bacillus thuringiensis*'in Transformasyonu

Bt ile ilk transformasyon çalışmaları İnsektisidal Kristal Protein (ICP) kodlayan genlerin klonlanmasından önce olmuştur. Bu işlem kojugasyon denemeleri ve lizozim müdahalesiyle protoplast oluşumuyla yapılmıştır. [169-171]. Ayrıca Heierson *et al.*, [172] vetetatif *Bt* hücrelerini trisi sükrozla kompetan hale getirerek transformasyon yapılabileceğini belirtmiştir. Fakat bu stratejiler düşük transformasyon etkinliği ve transformat seçimindeki zorluklarla beraberinde getirmiştir. 1980'lerin sonunda *Bt* transformasyonuyla ilgili ilk elektoporasyon çalışmaları yapılmıştır. Elektroporasyon, geçici olarak hücre zarının geçirgenliğini arttırarak DNA girişine imkân veren bir yöntemdir. Bu metotta kısa elektriksel güç uygulanarak lipit tabakada geçici hasar oluşturulur. Aynı yıllarda elektroporasyonla *Bt*'de transformasyonun yapıldığı başarısız çok sayıda protokol ortaya konulmuştur [173-177]. Bu çalışmalar transformasyon etkinliğini alçak başlı olarak değiştiğini göstermiştir. Etkinlik oranı µg DNA başına 10^2 ve 10^5 transformant olarak değişiklik göstermiştir. Bundan başka Macaluso and Mettus [178] *Bt* transformasyon etkinliğinin plazmit DNA'ya da bağlı olduğunu göstermişlerdir. Çalışmalarında metilasyonsuz plazmit DNA'ların daha etkili transfer olduğunu göstermişlerdir. Peng *et al*. [179] DNA'nın tuzlardan arındırılması, hücre büyüme şartları, elektroporasyon solusyonları ve elektirik alanları gibi faktörleri değiştirerek *Bt*'in trasformasyon etkinliğini arttırmaya yönelik birçok deneme yapmıştır. Bu çalışmada sonunda µg DNA başına $2x10^{10}$ trasformasyon etkinliği belirlenmiştir.

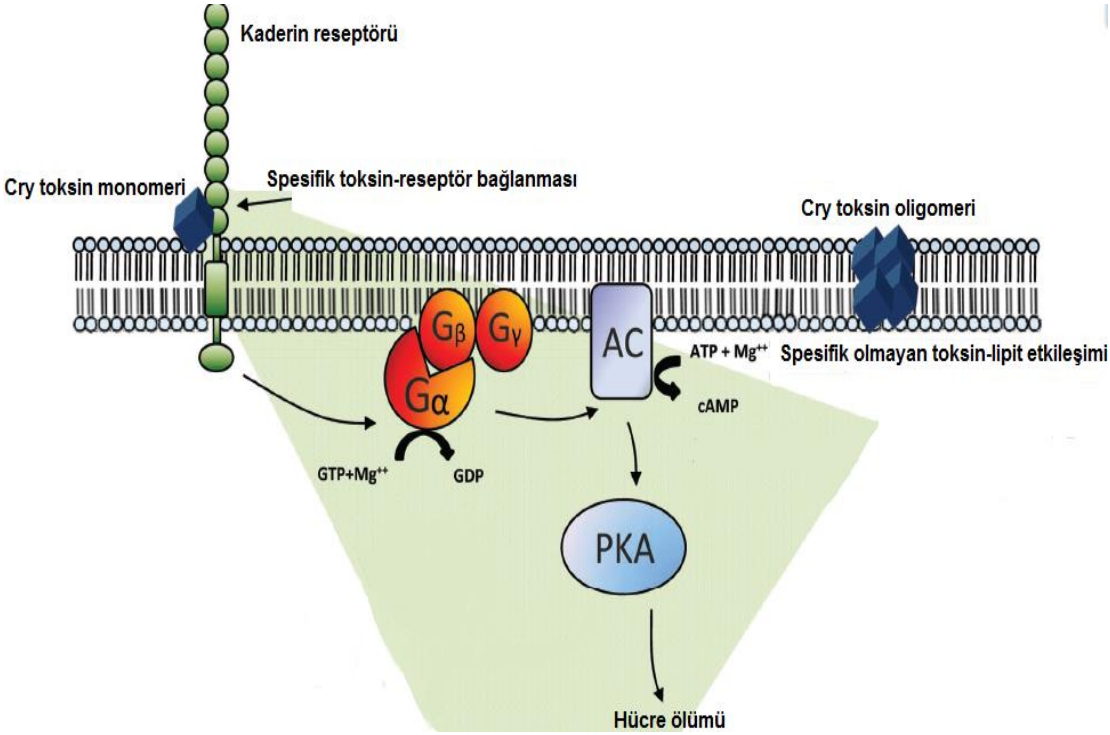
1.2.1.5.11. Cry Toksinlerinin Etki Mekanizması

Bt'in taksonomisi ve sınıflandırılması karmaşık olduğu gibi Cry toksinlerinin böcekler üzerindeki etki mekanizması da karmaşıktır. Cry toksinlerinin insektisidal aktivitesiyle ilgili birkaç model vardır [180]. Bunlaradan ilki Cry toksin, orta bağırsağa bağlanarak oligomerize olur ve litik faz oluşturmak üzere zara tutunur [181]. Cry toksinlerinin oligomer oluşturmak süretiyle plazma zarında litik por ortaya çıkarmasına görüşüdür. Cry toksine maruz bırakılan sentetik lipit tabakada fırça kenarlı zar veziküllerindeki iyon akışının değişikliği düşünülmektedir [126, 181]. Fakat hem böcekte hem de canlı hücrelerde bu konuyla ilgili doğrudan bir kanıt bulunamamıştır. Aslında canlı hücerelerin plazma zarına giren toksin oligomerlerinin litik por oluşturmadığı farzedilmekedir [182]. Buna ilaveten mutasyona uğratılmış Cry toksinler ilgili yapılan

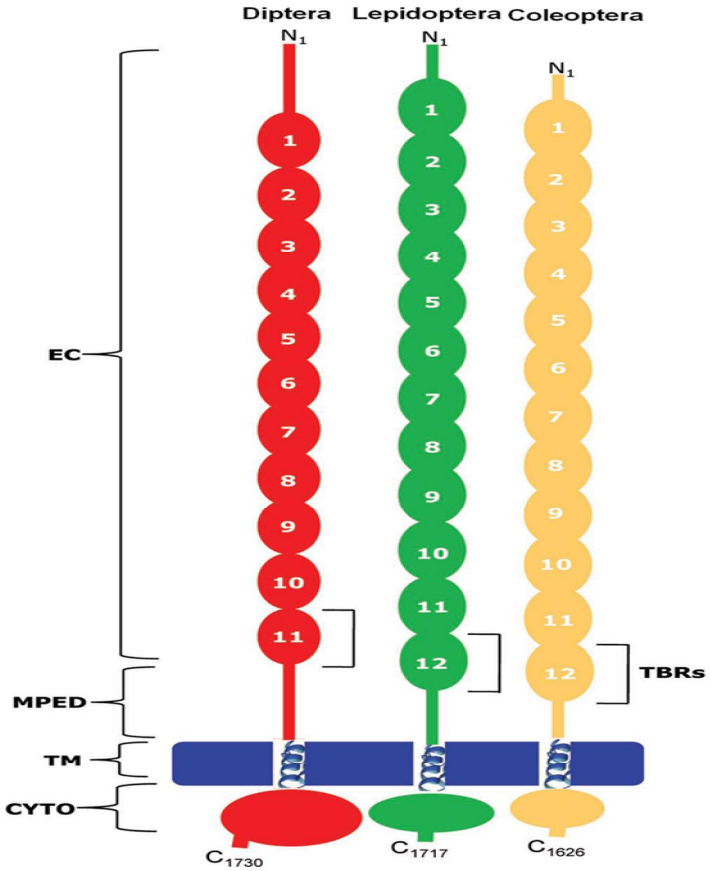
çalışmalarda zar vezikülündeki membran geçirgenliği ne toksin oligomerlerinin ne de oranteğe değişikliklerinin toksisiteyle doğrudan bağlanteğe olmadığını göstermiştir [68, 183,184]. Zang *et al.*, [182-185] için önerdiği model ise Cry toksinlerin hücreleri ozmotik liziz ile öldürdüğü fikrine dayanmaktadır [181]. Burada toksin monomeri BT-R1 kaderin reseptörüne bağlanır ve magnezum bağımlı sinyal iletimini aktifleştirerek hücrenin ölümüne neden olur. Gerçekte toksin faaliyeti önerilen toksin bağımlı ozmatik lizizden çok daha karmaşıktır. Cry toksin faaliyeti kaderin reseptörü BT-R1 reseptöründeki yüksek korunumlu yapısal motifte tek taraflı bağlanmasını içeren, karmaşık ve dinamik bir işlemdir [186]. Cry1Ab için BT-R1 reseptörüne bağlanması heterotrimerik G protein ve adenilsiklazı uyararak CAMP üretimini artırmak suretiyle moleküler bir sinyal oluşumunu başlatır. CAMP proteinkinazı aktifleştirir, hücre iskeletiyle ilgili düzenlemeler ve iyon akışı gibi bir dizi hücresel değişiklik ortaya çıkarır. Bu ikinci haberci yolunun hızlandırılmasını hücrenin kimyasını değiştirerk ölüme neden olur [182,185]. Toksin faaliyetinin, toksinin BT-R1 kaderin reseptörüne bağlanmasını bloke etmek süretiyle engellendiği inden söz etmek mümkündür [182, 187-189]. Liu *et al.*, [190] pamuk yaprak büken zararlısında Cry1Ab toksisitesinin çözünebilir toksin bağlayan kaderin fragmentleriyle azaltılabileceği ini belirtmiştir. Tüm bu sonuçlar toksisiteyi belirleyen primer faktörün spesifik toksin etkileşimi olduğunu göstermektedir. Yapı-fonksiyon ilişkisi bakımından toksin-reseptör biyokimyasının belirlenmesi Cry toksin aktivitesinin anlaşılmasında önemli bir aşama sağlayabilir. Toksin reseptör kompleksi ile ilgili modellenmiş bir görüntüde Cry1Ab'nin büyük bir olasılıkla BT-R1'e bağlanması için gerekli 422-498 aminoasit dizileri içindeki rezidüleri gösterilmiştir (şekil 1.16). Bu dizilerin reseptör bağlama bölgelerini içerdiği varsayılmıştır.



şekil 1.16. Cry1Ab proteinin reseptör bağlanma bölgesi



Şekil 1.17. Cry proteinin ekti mekanizması(***AC(**Adenilsiklaz),***PKA** (Protein kinaz A)



Şekil. 1.18. Farklı böcek takımlarında bulunan kaderin reseptörünün yapısı

EC(Ekto Domain), MPED (Membran Proximal Ekstraselluler Domain) TM (Transmembran Domain), CYTO, (Sitoplazmik Domain), TBR (Toksin Bağlanma Bölgesi)

1.2.1.5.12. Cry Toksinlerine Karşı Böcek Direnci

Dünya çapında *Bt*'nin ticari fomülasyonları ekonomik olarak zarara neden olan böcekleri kontrol etmek için 60 yıldır kullanılmaktadır [63]. Günümüzde birçok tarım ürünü böcek istisnalarına karşı dirençli olmalarını sağlayan *cry* genlerini taşımaktadır. Önceleri böceklerin *Bt* toksinlerine ve insektisidal toksinlerine karşı direnç geliştiremeyeceği varsayılıyordu. Çünkü *Bt*'nin böcek savunma sistemine adapte olabildiği, bu işlemi ise üretilen toksini değiştirmek süretiyle veya farklı spesifik aktivitelere sahip toksinler üreterek yapabildiği düşünülmekteydi. Fakat, *Bt*'de adaptsayon uyumlu faktörler olmasına rağmen doğada akıllıca kullanılan *Bt* ve *cry* gen ürünleri böceklerin transjenik bitkilere ve *Bt* temelli biyoinsektisitlere direnç geliştirme ihtimalini arttırmaktır. Ayrıca labaratuvar ortamında *Bt* direçli böcek türlerinin geliştirilmesi bu ihtimali daha da güçlendirmektedir [191-193].

Cry toksinlerinin insektisidal aktivitesi bir dizi olay içermektedir. Bunların içerisinde parasporal toksinlerin protoksinlere dönüşmesi, protoksinlerin proteazlarla aktif toksine dönüşmesi, bu aktif toksinin orta bağırsak epiteliyle bağlantı kurmasına gibi olaylar vardır. Toksin reseptör etkileşimi CAMP bağlantılı sinyal iletim yolunu tetikler ve orta bağırsak epitelinin işlevselliğini ve yapısını bozar [182,185]. Böcekler *Bt* ile sürekli temas halinde olduğundan böcekte fizyolojik değişiklikler olur ve savunma sistemleri güçlenir. Bunun sonucu ise *Bt*'nin insektisidal aktivitesine direnç geliştirmektir. *Bt* toksinlerine dirençin azalmasıyla ilgili 3 farklı yaklaşım vardır. Artan savunma tepkisi temel olarak mukozal yüzeyin aktivitesini değiştirir ve proteaz sekresyonu artarak prokoagulantlar oluşur. Örneğin ladin kurdunun bağırsak sıvısındaki 75 kDa'luk bir koagulant protein *Bt* sups. *sotto* protoksinlerinin çökelmesine sebep olmaktadır. Çökelme işlemi toksinleri ayırarak hedef reseptöre ulaşımını sınırlandırır.

Protoksin aktivitasyonunda kullanılan proteaz profili larvaların yaşına bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Larval büyüme ve gelişim sırasında sindirim kanalındaki proteaz konsatrasyonunda gözlemlenebilir artış olur. Bu tür bir artış Cry toksinlerine karşı duyarlılığın azalmasının nedeni olabilir. Colorado patates böceğinin dirençli bir popülasyonunda zar veziküllleriyle bağlantılı aminopeptidaz aktivitesi duyarlı olanlara göre daha fazla bulunmuştur [193]. Aminopeptidaz seviyesindeki artış dirençli *Plodia* kolonilerinde de gözlenmiştir [194]. Colorado patates böceğinin direçli popülasyonları

duyarlılarla kıyaslandığında *Bt kurstaki* proteolitik aktivasyonunda belirgin azalma gözlenmiştir. Bu durum böcek bağırsağında toksinlerin proteolitik olarak bozulmamasının direncin önemli bir mekanizması olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde *Plodia* da kemotripsin benzeri bir enzimin miktarı dirençli bireyde belirgin bir şekilde azalma göstermiştir [194]. Toksin bağlanma bölgesindeki sayının azalması veya mutasyonlara bağlı olarak toksin bağlanmasındaki azalma Cry toksinlerinin reseptörlere bağlanmasını engeller buda direnç mekanizmasında önemlidir [195,196]. Saturasyon bağlanma deneylerinde direçli Colorado patates böceğinin fırça kenar zar vezikülleri duyarlı olanlarla kıyaslandığında % 60 daha az Cry3A toksinin bağlandığını göstermektedir. Açık bir şekilde Colorado patates böceğindeki direnç, toksin bağlanmasındaki azalma kadar orta bağırsak proteaz aktivitesindeki değişiklikle de ilişkilidir.

1.2.1.5.13. İnsektisidal Aktivitenin Ötesinde *Bacillus thuringiensis*

1.2.1.5.13.1. *Bacillus thuringiensis*'in Kitinaz ve β-1,3-glukanaz Aktivitesi

Fungal hücre duvarı fungus hücresinin kuru ağırlığının yaklaşık % 20-30'unu oluşturur. Bu yapı hücreyi fiziksel hasarlara karşı korur ve hücreye şeklini verir. Kitin ve β-1,3-glukandan oluşan iskelet tabakasıyla birlikte fungal hücre duvarı anti fungal proteinlerin birçoğu için bir hedef teşkil eder. Bu antifungal proteinler fungal hücre ölümüne yol açan kitinaz ve glukanaz enzimlerini içerirler [197]. Kitinazlar bakteri, fungus ve yüksek yapılı bitkiler gibi birçok organizmada bulunur ve farklı rollere sahiptir [198]. Mikroorganizmalar tarafından üretilen kitinazın bitkilerde farklı tiplerde hastalığa sebep olan funguslar için biyokontrol ajanı olarak görev yaptığı rapor edilmiştir [199-201]. Ramirez *et al*., [202] *Bt* ssp. *israelensis* suşu tarafından üretilen bir kitinazın büyüyen kültürlere uygulandığında % 45-100 arasında fungal inhibisyona neden olduğunu rapor etmişlerdir. Hatta bu kitinazın *Sclerotium rolfsii* ile enfekte edilmiş soya tohumlarına uygulandığında tohum çimlenmesini % 25-90 arasında değişken oranlarda artırdığı gözlenmiştir. Antifungal tarama amacıyla 16 *Bt* izolatı üzerinde yapılan çalışmada dejenere primerler kullanılarak β-1,3-glukanazın PCR amplifikasyonu yapılmış ve üç suşun beklenilen moleküler ağırlıkta ürün verdiği ve bunların muhtemelen glukanaz üretiminden sorumlu olduğu rapor edilmiştir.

1.2.1.5.13.2. *Bacillus thuringiensis* Kitinazları

Günümüze kadar *Bt kenyea, pakistani, colmeneri, canadiensis, entomocidus, kurstaki, israelensis* ve *konkukian*'ın farklı suşlarından enaz 38 kitinaz genin gen bankasında bulunduğu görülmektedir. Bunlardan % 58'i Çin'de % 18'i Meksika'da diğer kısmı da USA, Mısır, Türkiye Tayland, Hindistan, Pakistan, Tunus ve Kore gibi ülkelerden klonlanmıştır [203]. *Bt* kitinazlarının çoğu % 93.8-99.6 oranında birbirine benzerlik gösterir. *Bt* kitinazları katalitik domain ve potansiyel kitin bağlama domaininden (ChBD) oluşan modüler bir yapıya sahiptir. Bunlar enzimlerin tipik karakteristik özelliklerinden olup kitin ve selüloz gibi biyo polimerleri sindirir. *Bt* kitinazlarının büyük bir kısmında katalitik domain benzerlik gösterir. Fakat *B. circulans* Chi41, *B. subtilis* Chi, *Serratia marcescens* Chi ve *Enterobacter agglomerans* ChiA gibi diğer bakteri kitinazlarının katalitik domainleriyle düşük seviyede benzerlik gösterir. *Bt* kitinazlarının kitin bağlanma domainleri % 99 oranında birbirine benzerlik gösterip aromatik rezüdiler (Örneğin; Trp-591, Tyr-595 ve Trp-626 ChiA-HD73'de) içerirler. Bu rezüdiler sadece *Bt* kitinazlarında olmayıp *S. marcescens* and *B. circulans* gibi bakterilerin kitinazlarında da korunumuş olup doğrudan kitin bağlamadan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Buna ilave olarak ChiA74 gibi endo kitinazlar iki tane fibronektin benzeri domain içerir. Bu domainler subsrat bağlamada önemli olabileceği düşünülen korunmuş aromatik amino asit içerirler [204-207].

1.2.1.5.13.2.1. *Bacillus thuringiensis* Kitinazları ve Çevre

Bt kitinazları doğada önemli bir role sahip olup farklı çevresel amaçlar için kullanılabilir. Örneğin; 1 karides atıklarının sindirimi, 2. Cry proteinlerini insektisidal aktivitesinin arttırılması, 3. Fitopatojen fungusların kontrolü. Bunlardan 2 ve 3. ısü kimyasal kullanımını azaltan alternatiflerdir.

Karidesler deniz ürünleri restoranlarında geneksel bir bir yiyecektir. Fakat bunların baş ve dış iskelet gibi yenilmeyen atıkları bu canlının hacimce %56-60'ını karşılık gelmektedir. Bu atıklar kitin-protein ve mineral atıklarından oluşmaktadır. *Bt* bir dizi kitinaz ve proteaz salgılayarak bunların sinerjistik aktivitesi karides atıklarının parçalanmasında kullanılmaktadır. Parçalanmış karides atıkları eczacılık, tıp, gıda, su arıtma, pigment eksraksiyonu, besi yerleri, hayvan gıdası formülasyonu, toprakta

nematod popülâsyonun azaltılmasında ve tek hücre protein üretiminde kullanılmaktadır [208].

Buna ilaveten *Bt* kitinazlarının peritrofik zarı sindirerek Cry proteinlerin insektisidal aktivitesini arttırdığı belirtilmiştir. Biyoteknolojik amaçlarla *Bt*'nin homolog kitinazlarının aşırı ifadesi Cry proteinlerin ifadesini arttırmayı sağlayan bir genetik yöntemle gerçekleştirilmiştir [209]. Buna ilave olarak *Bt* kitinazlarının *Fusarium* türleri ve *Sclerotium rolfsii* gibi fitopatojen fungus türlerine karşı inhibitör aktivitesinin olduğu gösterilmiştir [210].

1.2.1.5.13.2.2. Çevre ve Gıda Endüstrisinde *Bacillus thuringiensis* Kitinazları

Kitin N-asetilglikozamin (GlcNAc) çözünme özelliği olmayan lineer β (1-4) bağlı polimeridir. N-asetilglikozamin proteinlerle birleşerek omurgasızlarda (kabuklular, böcekler ve örümcekler) dış iskelet, alg ve fungus gibi canlıların hücre duvarı yapımında kullanılır. Bakteriler, bitkiler, funguslar, omurgasız ve omurgalıların endo-ekzo kitinaz ürettikleri bilinmektedir. Endo kitinazlar kitin polimerinin iç kısımlarında kitini rastgele parçalar, buna karşılık ekzo kitinazlar aktivitelerine kitinin nonreducing ucundan başlayarak kitobiyoz veya GlcNAc üniteleri açığa çıkarır. Bunlarda daha sonra sırasıyla kitobiyozlar N-asetilglukozaminidazlarla parçalanırlar. Her iki tür enzimin kombinasyonu sinejistik bir etki ile sonuçlanıp biyoenerjitik ve çok çeşitli hücresel yapının sentezinde görev alan GlcNAc üretimini arttırır. Buna ilaveten kitinolitik enzimlerin fungal enfeksiyonlara karşı hem bitki ve insanı korumak hem de eklembacaklılarda kutikula dögüsünde görev almak gibi doğada da farklı rolleri vardır. Örneğin kitinin kullanıma hazır çözünebilir biyolojik materyallere dönüşümünü sağlamak süretiyle okyanuslarda karar kılınan sağlanmasında bunlara örnektir. [199, 207, 210-212].

1.2.1.5.13.3. *Bacillus thuringiensis*'in Hidrojen Siyanid (HCN) Etkisi

Hidrojen siyanid fungus ve bakteriler tarafından ilk durağan büyüme fazı sırasında glisinden üretilen tipik bir sekonder metabolittir [213]. Bu sekonder metabolitin bakteriyal patojenisiteye katkı sağladığı [214,215] ve pseudomonadlarla ilişkili çoğu bitki kök hastalıklarının biyolojik kontrolünde geniş spektrumlu bir bileşik olduğu bilinmektedir [216].

1.2.1.5.13.4. *Bacillus thuringiensis*'in Biyostimülatör Aktivitesi

1.2.1.5.13.4.1. İndol-3-Asetik Asit (IAA)

Fitohormonlar bitkilerin büyüme ve gelişiminde sinyal iletimi ve düzenleyici olarak önemli bir rol oynar. Oksinler, özellikle de indol-3-asetik asit (IAA), fizyolojik, biyokimyasal ve genetik açıdan en çok çalışılan bitkisel düzenleyicilerdir [217]. Bitkiler ile ilişkili bakteriler tarafından üretilen fitohormonlar bitki büyümesinde [218], bitki patolojisinde [219] ve bitki mikroorganizma etkileşiminde [220] anahtar rol oynarlar. Bitki büyümesini teşvik edici olarak bilinen bakteriler *Herbaspirillum, Rhizobium* ve *Azospirillum* gibi cinslere ait türler olup bitki kökleriyle etkileşim halindedirler. IAA biyosentezinin genetik mekanizmasıve düzenlenmesiyle ilgili bu cinsler üzerinde çok sayıda çalışma yapılmış olup triptofan bağımlıve triptofan bağımsız yollar gibi bir çok yol tanımlanmıştır [221]. Triptofandan (Trp) IAA sentezi indol-3-asetamid ve indol-3-prüvikasit (IPyA) yollarıyla meydana gelebilir. Bitki patojeni bakterilerde IAA triptofandan tercihen indolasetamid ara yoluyla üretilir ve bitkide tümor üretimini uyarır [222, 223]. *Azospirillum spp.* için IAA üretiminde birden fazla yol olduğu rapor edilmiştir [224-227]. Yakın zaman kadar *Bt* türünün fitohormon üretimine ilişkin bir tanımlama yapılmamıştır. Bu amaçla 16 *Bt* izolatıyla yapılan çalışmada izolatların bitkilerin faydalanabileceği düzeyde IAA ürettikleri görülmüştür. IAA birikimi dış kaynaklı triptofan tarafından uyarılmaktadır ve bu indol-3-asetamid ve indol-3-prüvikasit yollarıyla gerçekleşebilir.

1.2.1.5.13.4.2. ACC deaminaz

1-Aminosiklopropan-1-karboksilik asit (ACC) doğal olarak meydana gelen etilenin öncüsü bir aminoasittir ve normal bitki gelişiminde, strese karşı cevap vermede olduğu gibi kullanılan önemli bir fitohormondur. Bu hormon tohum çimlenmesini, yaşlanmayı, meyve olgunlaşmasını, yaraların iyileştirilmesini ve çoğu bitkisel gelişimi düzenler [228, 229]. ACC'yi Ŭ-ketobütrat ve amonyuma dönüştüren bir enzim olan ACC deaminaz bulunduran birkaç mikroorganizma bulunmaktadır [231]. ACCD enzimi bitki büyümesini uyaran bazı bakteri [227, 231, 232, 233] maya [234] ve mantar [231-233] türlerinde bulunmaktadır. Farklı *Bacillus* türlerinde ACCD bulunduğu ve bu enzimin kanola tohumunun çimlenmesi sırasında kök uzamasını uyardığı belirlenmiştir. Bu bakteri suşlarını içeren toprak eklendiğinde kanola bitkisin kök-gövde gelişiminin ve

kuru-yaĸ aĵırlıklarının arttığı rapor edilmiĸtir [232]. *B. cereus* türünün birçok suĸunun sekans benzerlik analizi sonuçlarına göre *accd* genine sahip olduğu belirlenmiĸtir.

1.2.1.5.13.5. *Bacillus thuringiensis*; Biyolojik Gübre Etkisi

Biyolojik gübre, yaĸayan mikroorganizmaları içeren tohuma, bitki yüzeyine, topraĵa, rizosfer kolonilerine veya bitki içerisine uygulandığında bitkinin mineral besin alımını ve taĸınımını artıran bir madde olarak tanımlanabilir [235]. Biyolojik gübre olarak arbusküler mikoriza gibi rizosferik funguslar [236], *Penicillium bilaii, Penicillium radicum* [237, 238], bitki büyümesini artırıcı rizobakterler (PGPR) [239, 240] ve son yapılan çalıĸmalarla *Bt*'nin de kullanılabileceği göstermektedir.

1.2.1.5.13.5.1. Fosfat Çözünümü

Fosfat (P) birçok toprakta oldukça yüksek miktarda bulunmasına karĸın bitki büyümesini sınırlayan en önemli faktörlerden biridir. Bitkilerin fosfatı düĸük seviyelerde alabilmesinin nedeni toprakta bulunan fosfatın çözünmemiĸ formda bulunmasıdır ve bitkiler fosfatı yalnızca iki çözünebilir formda, monobazik (H_2PO_4) ve dibazik (HPO_4) iyonlar halinde alabilirler [241]. Fosfat çözücü bakteriler (PSB) çoĵu toprakta mevcut olup çözünebilir olmayan fosfatı enzimatik faaliyetler sonucu çözünebilir hale getirirler [242-245]. Mineral fosfat çözünürlüğünün temel mekanizması mikrobiyal hücrelerin asidifikasyonu sonucu oluĸan ve bu hücrelerin etrafını kuĸatan ve Ca^{2+} için proton yer değiĸtirmesi sonucu iyonik fosfat salınımına yol açan organik asitlerin üretimidir. Topraktaki organik fosforun mineralizasyonu defosforilasyon reaksiyonlarında önemli bir rol oynayan asit fosfatazlar ve fitazlar tarafından gerçekleĸmektedir [244]. Fosforun rizosferdeki çözünürlüğüne dair PGPB'de gösterilen en yaygın etki mekanizması konukçu bitkinin beslenme yeteneğinde artıĸ olduğunu göstermiĸtir [246]. Son zamanlarda yapılan çalıĸmalar arasında *Azotobacter chroococcum* ve buğday, *Enterobacter agglomerans* ve domates, *Pseudomonas chlororaphis* ve *Pseudomonas putida* ve soya fasülyesi, *Rhizobium sp.* ve *Bradyrhizobium japonicum* ve turp, ve *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* ve mısır etkileĸimleri gösterilebilir [227, 235]. *Bacillus* cinsinde ise çalıĸmalar *Bacillus* sp. ve beĸ ürün türü [243], *Bacillus circulans* ve *Cladosporium herbarum* buğdayda [247], *Bacillus megaterium* ise ĸeker pancarı ve arpada yapılmıĸtır [248]. Sekans benzerliği

temelinde farklı asit fosfataz genleri *B. cereus* grubu türler ve bazı *Bt* suşlarında genomik sekanslarında tanımlanmış, *B. cereus* ATCC 14579^T asit fosfataz geni ile bu suşlara ait genler arasında % 99 homoloji olduğu tespit edilmiştir.

1.2.1.5.13.5.1.2. Siderofor (Demir taşıyıcısı) Üretimi

Bitki büyümesi ve üremesi çeşitli biyotik ve abiyotik streslerden ciddi bir biçimde etkilenebilir. Abiyotik stresler arasında demir (Fe) eksikliği, özelliklede kalkerli topraklarda Fe çözünürlüğü oldukça zordur ve ürün veriminde azalmaya yol açan önemli bir faktördür [249]. Bitkiler genellikle Fe^{3+} bağlayan ve çözünürlüğünü sağlayan çözünebilir organik bileşikler (şelatörler ve fitosideroforlar) çıkarırlar. Şelatörler Fe^{3+} molekülünü bitki kök yüzeyine dağıtır ve Fe^{2+} molekülüne indirgeyerek bitkiler tarafından alınmasını sağlarlar. Fitosideroforlar çayırlar tarafından salgılanır ve plazmalemma boyunca Fe^{3+} molekülü ile absorbe ederler [250]. Bazı rizosferik bakterilerde ribozomal olmayan sentetik peptit yoluyla siderofor üretirler [251]. Birçok bitki demir bakteriyal siderofor kompleksi boyunca demir alımı için heterolog demir taşıma mekanizmasına sahiptir [252, 253]. Steril toprak ekosistemlerinin aksine steril olmayan toprak ekosistemlerinde bitkilerin demir eksikliği semptomları göstermediği ve köklerinde oldukça iyi düzeyde demir bulundurdukları rapor edilmiştir. Bu durum bitki büyümesi ve demir alınımında mikrobiyal aktivitenin varlığını desteklemektedir [254]. Siderofor üretimi *B. cereus* [255] *B. anthracis* [256] ve *Bt* [257] örneklerinde olduğu gibi *B. cereus* grubu bakteriler için karakteristiktir. *Bt* türünde bu durum bitkiye demir sağlamak için veya demirin yarışmacı etkisi yüzünden fitopatojenik funguların biyolojik kontrolü ile ilişkili olabilir.

1.2.1.5.14. *Bacillus thuringiensis*'in Önemi

Bacillus cinsine ait birçok tür tarım, gıda, çevre ve ilaç endüstrisinde çok önemli yere sahiptir. Örneğin *Bt* ve *B. sphaericus* iki insektisidal bakteri olup, ürettikleri kristal inklüzyonlar sayesinde böcek ve vektör kontrolünde seçicilikle kullanılmaktadır. [258]. *B. cereus* gıda kaynaklı patojen bir bakteri olup sindirim sistemi hastalıklarını ve göz enfeksiyonlarına neden olur. *B. antracis* ölümcül hastalıklara (şarbon) neden olur [63, 259]. *Bacillus* (öreğin; *B. subtilis*, *B. likeniformis*) türleri endüstriyel öneme sahip protein salgılama kapasitesinde olduklarından için genellikle insan sağlığına zararlı olmayan

heterolog protein (Ŭ-amilaz, pulllunanase, Ŭ-asetolaktat, deoksikorboksilaz vb.) [260] ya da antifiriz proteinleri gibi potansiyel uygulama alanē olan proteinlerin ifadesinde kullanēlmaktadēr lar. Antifiriz proteinleri donma noktasēnē dükürdükleri için gēda ürünlerin korunmasēnda kullanēlēr [261].

Bt insan saŷlēğēnē tehtit etmemesi nedeniyle en önemli entomopatojen mikroorganizmadēr [258, 262]. *Bt*ónin Cry proteinleri dünya çapēnda birçok arakütērmacē tarafēndan detaylēca arakütērēlmēktēr, fakat bu çalēkmalarēn çoŷu yeni veya yüksek aktiviteli Cry protein üreten suklarēn taranmasēna yönelik olmukütur. Bu çalēkmalarēn amacē Cry proteinlerin rekombinant çalēkmalarla aktivite spekturumunu genikletmek, transgenik bitki gelikütirmek, böceklerin Cry proteinlerine gelikütirdikleri direnci ortadan kaldērmaya yönelik yeni stratejiler gelikütirmektir [263, 264]. *Bt*ónin gēda kaynaklē patojen bakteriler veya fitopatojen mikroorganizmalar (bakteri, fungus) inhibisyonu, ayrēca antimikrobiyel aktivite gösteren enzim salgēlamalarē ve besi ortamēna protein salgēlama potansiyeli nedeniyle bu sēradakē mikroorganizma üzerindeki arakütērmalar sadece insektisidal aktivitesiyle kalmamak potansiyel kullanēmē olan enzim ve proteinlerin üretimine de yoŷ unlakmēktēr [265].

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşunun Kültüre Alınması ve Çoğaltılması

Böcekler üzerindeki insektisidal aktivitesi önceki çalışmalarla belirlenmiş olan *Bacillus thuringiensis* SY49-1 suşunun -80 °C'de saklanan stok kültürü çoğaltma işlemi yapılmak üzere çözünmeye bırakılmıştır. Çözünme işlemi yapılırken ependorf tüplerde saklanan kültür önce -20 ºC'ye alınmış bir süre burada tutulduktan sonra 4 ºC'de bekletilmiştir. Çözünme işlemi gerçekleştirildikten sonra stok kültür oda sıcaklığına alınmıştır. Oda sıcaklığında bulunan stok kültürden yaklaşık 100 µl alınarak sıvı LB besi yerine ekilmiştir. Ekim işlemi yapılan besi yeri 30 ºC'de 200 rpm'de çalkalamalı inkübatörde bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı besi yerinde bir gece çoğalan bakteri kültüründen 10 µl alınarak LB agar besi yerine ekilmiş ve bir gece 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

2.1.2. Çalışmalarda Kullanılan Bakteri Suşları

Çalışmalarda *Bacillus thuringiensis* SY49-1, *Escherichia coli* DH5Ű ve *Escherichia coli* BL21(DE3) suşları kullanılmıştır.

2.1.3. Oligonükleotid Primerler

Bt SY49-1 suşunun *cry1Ab* ve *cry2* genlerinin ORF (açık okuma çerçevesi) içeren gen bölgesini çoğaltmak amacıyla spesifik *cry1Ab* ve *cry2* primerleri kullanılmıştır. Ayrıca *Bt* SY49-1 suşunun kromozomal DNA'sı 16S ITS rDNA primeriyle çoğaltılarak dizi analizi yaptırılmak üzere kullanılmıştır (Tablo 2.1)

Tablo 2.1. Kullanılan primer çiftleri ve özellikleri

Primer	Dizi	ES (°C)	Ürün boyutu
cry1Ab F	5'-**GGA TCC** ATG GAT AAC AAT CCG AAC ATC-3'	52	3,5 kb
cry1Ab R	5'- **GTC GAC** TTA TTC CTC CAT AAG AAG TAA-3'		
cry2 F	5'- **GAA TTC** GGA TCC ATA TGA ATA GTG TAT TGA AT-3'	50	1,937 kb
cry2 R	5'- **GTC GAC** GTA CGG ATC CTA CTC AAA CCT TAA TAA-3'		
16S ITS	5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	48	500 bp
16S ITS	5'- CAA GGC ATC CAC CGT -3'		

BamHI kesim enzim bölgesi **GGATCC**
SalI kesim enzim bölgesi **GTCGAC**
EcoRI kesim enzim bölgesi **GAATTC**

2.1.4. Çalışmalarda Kullanılan Besi Ortamları

Bakterilerin yetiştirilmesi işlemleri sırasında aşağıda belirtilen besi ortamları kullanılmıştır.

Luria Bertani (LB) sıvı besiyeri (pH 6.8±2): 1 lt distile su içerisinde 10 gr kazein hidrolizat, 5 gr maya özütü ve 5 gr NaCl çözülerek 121 ºC'de 15 dk. otoklav edilmiştir.

Luria Bertani (LB) Agar besiyeri (pH 6.8±2): 1 lt distile su içerisinde 10 gr kazein hidrolizat, 5 gr maya özütü, 5 gr NaCl ve 15 gr agar olacak şekilde çözelti hazırlanmış ve 121 ºC'de 15 dk. otoklav edilmiştir.

Nutrient Agar (NA) besiyeri (pH 6.8±2): 1 lt distile su içerisinde 1 gr et özütü, 2 gr maya özütü, 5 gr pepton, 5 gr NaCl ve 15 gr agar olacak şekilde çözelti hazırlanmış ve 121 ºC'de 15 dk. otoklav edilmiştir.

Nutrient Broth (NB) sıvı besiyeri (pH 6.8±2): 1 lt distile su içerisinde 1 gr et özütü, 2 gr maya özütü, 5 gr pepton, 5 gr NaCl olacak şekilde çözelti hazırlanmış ve 121 ºC'de 15 dk. otoklav edilmiştir.

T3 Sıvı sporlanma besiyeri (pH 6.8±2): 1 lt distile su içerisinde 3 gr tripton, 2 gr triptoz, 1.5 gr maya özütü, 0.005 gr mangan klorür ($MnCl_2$), 6 gr monobazik sodyum fosfat (NaH_2PO_4), 7.1 gr dibazik sodyum fosfat (Na_2HPO_4) olacak şekilde çözelti hazırlanmış ve 121 ºC'de 15 dk. otoklav edilmiştir.

T3 Agar sporlanma besiyeri (pH 6.8±2): 3 gr tripton, 2 gr triptoz, 1.5 gr maya özütü, 0.005 gr mangan klorür ($MnCl_2$), 6 gr monobazik sodyum fosfat (NaH_2PO_4), 7.1 gr dibazik sodyum fosfat (Na_2HPO_4), 15 gr agar olacak şekilde çözelti hazırlanmış ve 121 ºC'de 15 dk. otoklav edilmiştir.

SOC besiyeri (pH 6.8±2): % 0.5 Yeast Extract , % 2 Tryptone, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM Glikoz olacak şekilde çözelti hazırlanmıştır. Glikoz eklemeden önce besi ortamı 121 ºC'de 15 dk. otoklav ile steril hale getirilmiştir. Glikoz çözeltisi 0.2 µm filtreden geçirilerek steril edilmiş ve daha sonra çözeltiye eklenmiştir. 5 gr Yeast Extract, 20 gr Tryptone, 0.5 gr NaCI, 2,5 ml 1M KCI, 10 ml 1 M $MgCl_2$, 10 ml 1 M $MgSO_4$, 100 ml 1 M glikoz eklenerek hacim 1L tamamlanmıştır.

2.1.5. Klonlama Çalışmalarında Kullanılan Çözelti ve Materyaller

Ampisilin çözeltisi: 20 mg/ml stok çözeltisi hazırlamak için 20 mg katı ampisilin 1 ml steril ddH_2O içersinde çözdürülür 0.2 µm filtreden geçirilerek steril hale getirilir. Stok çözelti -20 ºC'de saklanmıştır.

Kanamisin çözeltisi: 20 mg/ml stok çözeltisi hazırlamak için 20 mg katı kanamisin 1 ml steril ddH_2O içersinde çözdürülür 0.2 µm filtreden geçirilerek steril hale getirilir. Stok çözelti -20° C'de saklanmıştır.

X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside) çözeltisi: 20 mg/ml stok çözeltisi hazırlamak için 20 mg katı X-Gal 1 ml steril ddH_2O içersinde çözdürülür 0.2 µm filtreden geçirilerek steril hale getirilir. Stok çözelti -20° C'de saklanmıştır.

IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) çözeltisi: 100 mM, 1 ml stok çözelti hazırlamak için 0,02383 gr katı IPGT tartılır, 1 ml steril ddH_2O içersinde çözdürülür 0.2 µm filtreden geçirilerek steril hale getirilir. Stok çözelti -20 ºC'de saklanmıştır.

$CaCI_2$ çözeltisi:100 ml (1M) stok çözelti hazırlamak için 14.7014 gr katı $CaCI_2$ tartılır. 100 ml steril ddH_2O içersinde çözdürülür. 0.2 µm filtreden geçirilerek steril hale getirilir. Stok çözelti 4 ºC'de saklanmıştır.

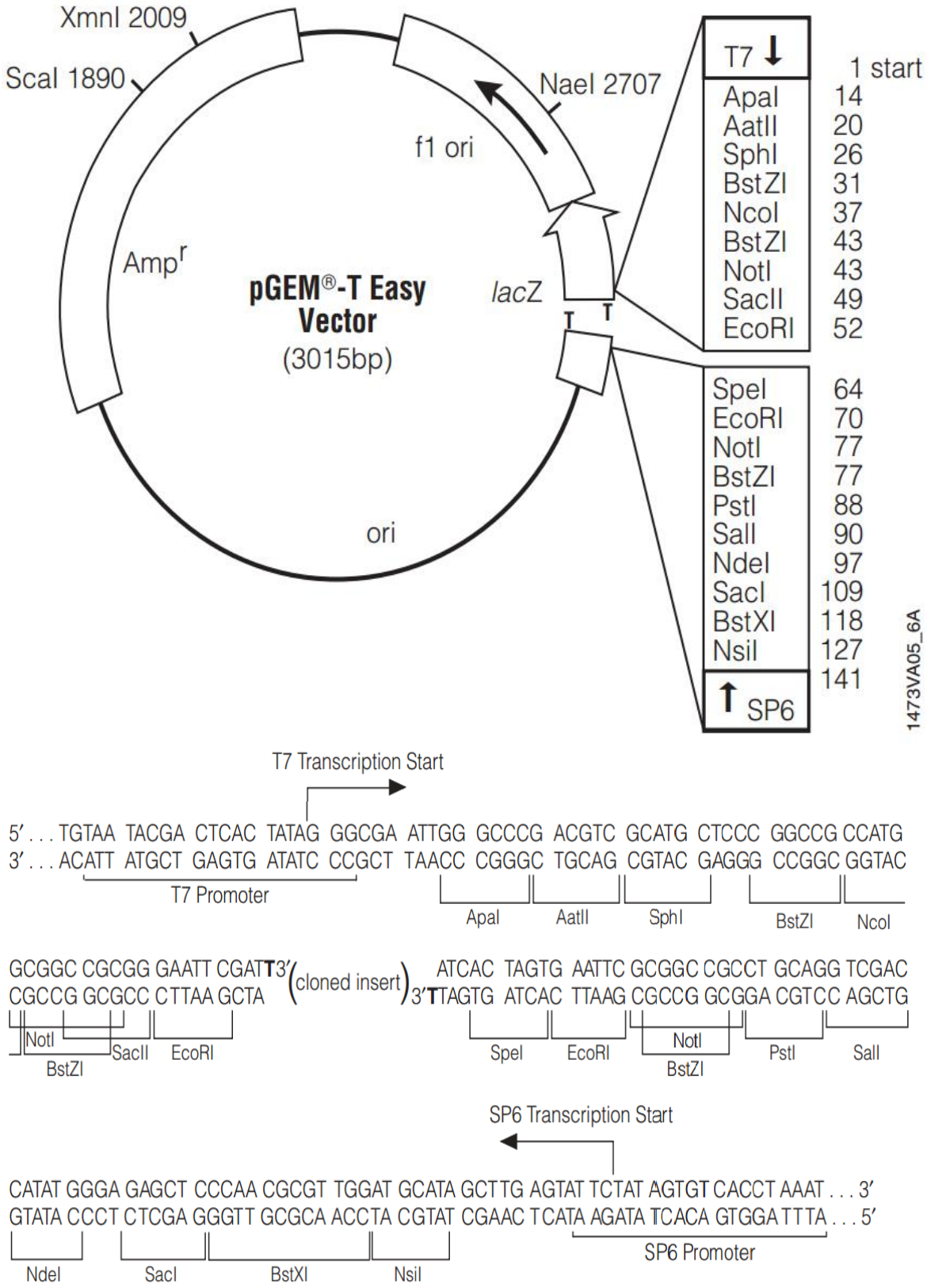
***Bam*HI kesim enzimi**: 1X Tampon *Bam*HI**:** 10 mM Tris-HCl (pH 8.0 37 ºC), 5 mM MgCl2, 100 mM KCl, 0.02% Triton X-100, ve 0.1 mg/mL BSA, *Bam*HI enzimi (5u/ε l) : 10 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 25°C), 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, % 0.15Triton X-100, 0.2 mg/mL BSA, ve % 50 (v/v) gliserol, örnekler -20° Cde saklanmaktadır.

***Eco*RI kesim enzimi:** 1X Tampon *Eco*RI**:** 50 mM Tris-HCl (pH 7.5 37 ºC), 10 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 0.02% Triton X-100, ve0.1 mg/mL BSA, *Eco*RI enzimi (5u/ ε l) : 10 mM potassium phosphate (pH 7.4 at 25°C), 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mg/ml BSA, % 0.15 Triton X-100, ve %50 (v/v) gliserol, örnekler -20 ºCde saklanmaktadır.

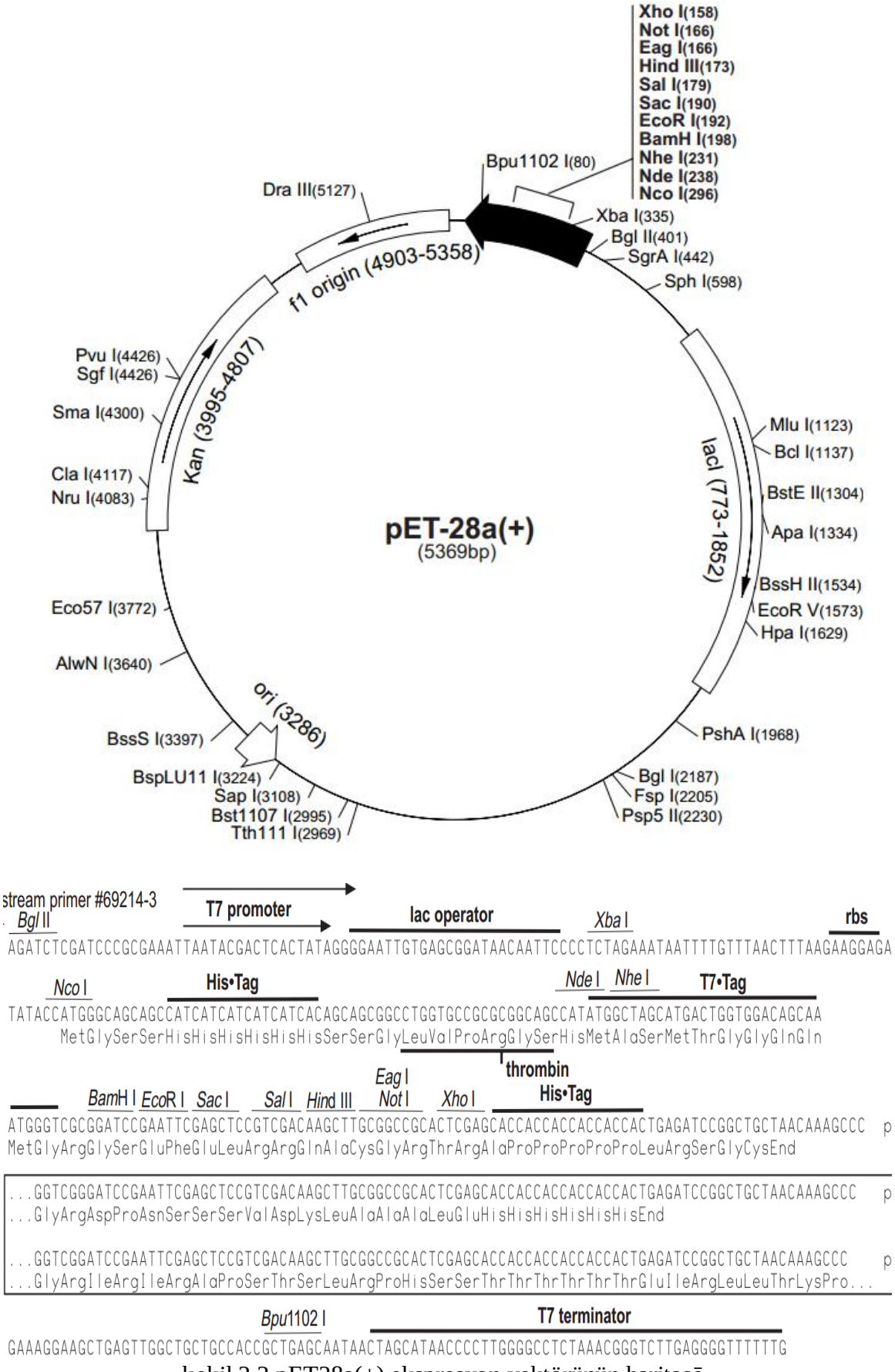
***Sal*I kesim enzimi**: 1X Tampon O**:** 50 mM Tris-HCl (pH 7.5 37 ºC), 10 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, ve 0.1 mg/mL BSA. *Sal*I enzimi (5u/ ε l) 10 mM Tris-HCl (pH 7.4 25 ºC),100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.2 mg/ml BSA, ve 50% (v/v) gliserol. Örnekler -20 º Cde saklanmaktadır.

pGEM-T Easy vektör sistemi: 1,2 ε g vektör, 12 ε l kontrol DNA, 200 ε l 2X ligasyon tamponu, 100 u T4 DNA ligaz, örnekler -20 ºCde saklanmaktadır.

pET28a(+) vektör sistemi: 10 ε g pET28a (+), Induction kontrol E, 1.5 ml steril su, 100 u T4 DNA ligaz, 500 ε l 10X ligasyon tamponu, 500 ε l ligaz seyreltme tamponu, 250 ε l 100 mM DTT, 250 ε l 10 mM ATP.



ķekil 2.1 pGEM-T Easy plazmit vektörünün haritasē



ķekil 2.2 pET28a(+) ekspresyon vektörünün haritasē

2.1.6. Plazmit DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

Sıvı LB besiyeri: 20 gr LB distile su içerisinde çözülerek 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklav edilmiştir.

Tris-EDTA (TE) tamponu: 40 mM tris-HCI, 2 mM EDTA, (pH 7.9)

Lizis çözeltisi: % 3 SDS, % 15 sükroz, 50 mM tris-hidroksit, (pH 12.5).

Proteinaz K: 20 mg/ml

Fenol: kloroform: izoamil alkol: 25 ml fenol, 24 ml kloroform, 1 ml izoamil alkol karıştırılarak hazırlanmış ve çözelti +4°C'de saklanmıştır.

Kloroform: izoamil alkol: 24 ml kloroform, 1 ml izoamil alkol karıştırılarak hazırlanmıştır

2.1.7. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Çözeltiler

Agaroz (% 0.05, % 1)

Tris-asetik asit EDTA (TAE) tamponu, pH 8.0 (50x/litre): 242 gr trizma bazı, 57.1 ml glasiyel asetik asit, 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0).

Tris-borik asit EDTA (TBE) tamponu, pH 8.0 (5x/litre): 54 gr trizma bazı, 27.5 gr borik asit, 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0).

Etidyum bromür (10 mg/ml).

2.1.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

10X Taq DNA polimeraz tamponu: 750 mM tris-HCI (pH 8.8), 200 mM $(NH_4)_2SO_4$, %0.1'lik tween 20.

$MgCI_2$ (25 mM)

dNTPmix (10 mM)

Taq DNA polimeraz (5 u/µl)

Oligonükleotid primerler (Tablo 2.1)

2.1.9. Protein İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

Örnek uygulama tamponu (2x stok): 4ml % 10'luk SDS, 2 ml gliserol, 1.2 ml 1 M tris (pH 6.8), % 0.01 bromfenol mavisi 2.8 ml distile su ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır. 100 µl stok, 90 µl su ve 10 µl ß-merkaptoetanol karıştırılarak kullanılmıştır.

Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF): Absolü etanolda 100 mM stok çözelti (174 mg/10 ml) hazırlanarak -20°C de saklanmıştır.

2.1.10. SDS-PAGE Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

Monomer (akrilamid/bis) çözeltisi (% 30 T, % 2.7 C_{bis}): 30 gr akrilamid, 0.8 gr bis 100 ml olacak şekilde su içerisinde çözülmüş ve 0.22 µmlik filtrede süzüldükten sonra 4 °C de saklanmıştır.

4X Ayırma jeli tamponu (1.5 M tris, pH 8.8): 18.15 gr tris distile su ile 100 mlye tamamlanmıştır. pH konsantre HCI ile ayarlanarak filtre edilip 4 °C de saklanmıştır.

8X Yükleme jeli tamponu (1 M tris, pH 6.8): 12 g tris distile su içerisinde çözülerek 100 mlye tamamlanmıştır. Konsantre HCI ile pH ayarlanarak filtre edilip 4 °Cde saklanmıştır.

% 10luk SDS: 10 gr SDS 100 ml distile su içerisinde çözülmüştür.

% 10luk amonyum persülfat (APS): 0.1 gr amonyum persülfat 1 ml distile su da çözülmüştür. Bu çözelti kullanımdan hemen önce hazırlanmıştır.

TEMED (tetra metil etilen diamin): 4 °Cde saklanmıştır.

Ayırma jeli yüzey çözeltisi (0.375 M tris, % 0.1 SDS, pH 8.8): 25 ml 1.5 M tris ve 1 ml % 10luk SDS distile su ile 100 mlye tamamlanmıştır.

2X Örnek uygulama tamponu: 4 ml % 10luk SDS, 2 ml gliserol, 1.2 ml 1 M tris 2.8 ml su içerisinde çözülerek pH 6.8e ayarlanmıştır. Ardından 0.001 gr bromfenol mavisi eklenerek oda sıcaklığında saklanmıştır. Kullanım esnasında 100 µl 2X stok örnek uygulama tamponuna 90 µl su ve10 µl ß-merkaptoetanol eklenerek hazırlanmıştır.

10x Tank tamponu: 30.3 gr tris ve 144.2 gr glisin 800 ml distile su içerisinde çözülerek pH 8.3e ayarlanmıştır. Daha sonra hacim 1000 ml ye tamamlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır. Kullanım esnasında 1/10 oranında sulandırılmıştır.

Fiksatif çözeltisi: 500 ml metanol, 100 ml glasiyel asetik asit, 400 ml ddH_2O eklenerek jeldeki poteinleri bağlama işleminde kullanılmıştır.

Boya çözeltisi: 500 ml metanol, 1 gr coomassie brillant R-250, 100 ml glasiyel asetik asit ddH_2O ile son hacim 1L tamamlanarak eklenerek jeli boyama işleminde kullanılmıştır.

Yıkama çözeltisi: 125 ml metanol, 175 ml glasiyel asetik asit, 2200 ml ddH_2O eklenerek jeli yıkama işleminde kullanılmıştır.

2.1.11. Böcek Kültürü

2.1.11.1. *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera, Pyralidae)

Sınıf	: Insecta
Takım	: Lepidoptera
Familya	: Pyralidae
Cins	: *Ephestia*
Tür	: *Ephesitia kuehniella*
Yaygın ismi	: Akdeniz un güvesi [268]

Ephesitia kuehniella dünyanın her yerinde yaygın olarak bulunabilen bir zararlıdır. Optimum yaşama sıcaklığı 26 ºC'dir. 26 ºC'de bir jenerasyonun gelişimi 43-72 gün arasında değişirken, 10ºC'de 140-243 gün arasında değişiklik gösterir. Fakat uygun sıcaklık (27±1 ºC) ve nem (% 70±5) koşullarında hayat döngüsü 3-4 haftada tamamlanır. Nem ve sıcaklığa bağlı olarak dişi ortalama 562 yumurta bırakır. Erginler yaklaşık olarak 14 gün yaşar ve beslenmezler. Larvaları polifag olup özellikle buğday unu olmak üzere tahıl, kabuklu meyve, kuru meyve, baklagil ve diğer depo ürünleriyle beslenirler [269, 270] (şekil 2.3).



Ergin



Larva Pupa

Şekil 2.3. *Ephestia kuehniella*'nın hayat evreleri [270]

E. kuehniella un değirmenlerinde zarar oluşturan en önemli zararlılardandır. Önlem alınmadığı takdirde oluşturduğu ağ yüzünden ekipmanlardan un akışını engeller. Tüketiciler içerisinde larva ağı bulunan unu kabul etmez [269].

2.1.11.2. *Ephestia kuehniella* Kültürü

E. kuehniella larvaları 1 kg buğday unu, 55 gr bira mayası ve 30 gr buğday özü karıştırılarak hazırlanan besi ortamında 27±1 ºC sıcaklık, % 65±5 nispi nem ve 14:10 saatlik (gündüz: gece) fotoperiyotta yetiştirilmiştir [271,272].

2.1.11.3. *Culex pipiens* Linnaeus (Diptera, Culicidae)

Sınıf	: Insecta
Takım	: Diptera
Familya	: Culicidae
Cins	: *Culex*
Tür	: *Culex pipiens*
Yaygın ismi	: Ev sivrisineği

Ev sivrisineği (*Culex* spp.) en yaygın sivrisinek türüdür. Cam saydamlığında kanatları vücudunun, sarımsı kahverengi orta bölümünde daha koyu iki uzunlamasına çizgi vardır. Dişi ev sivrisineği berrak veya bulanık durgun suların üzerine 100 kadar silindir biçimli, beyaz yumurtasını bırakır. Bunlar, dikey çekilde yan yana durarak, suyun yüzeyinde sal gibi durabilirler. Larvalar 16-24 saat sonra yumurtalarını terkederler.

Larvaların karınlarının ucunda bir soluk borusu bulunur. Rahat solunum yapabilmek için bu hortumla suyun yüzeyinde asılırlar. Suda en ufak bir kıpırtı olunca hepsi derine iner, fakat en kısa süre sonra yine ilk duruşlarına dönerler. Yiyecekleri, sudaki çürümüş organik maddelerdir. Larva dördüncü defa deri değiştirdikten sonra pupa olur. Pupa da göğsünden çıkan küçük boynuzlara benzer iki soluk borusuyla suyun yüzeyinde asılı durur. Pupalık 2-3 gün sürer. Daha sonra ergin sivrisinek meydana gelir. Erginler kanatları sertleşinceye kadar pupa derisine yapışır ve öylece kalır.

2.1.11.4. *Culex pipiens* Kültürü

Diptera takımında ait olan *C. pipiens* larvaları Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümünden Prof. Dr. Fatih Mehmet IŞIMLI'dan temin edilerek laboratuvar ortamında 27±1 ºC sıcaklık, % 65±5 nispi nem ve 14:10 saatlik (gündüz: gece) fotoperiyotta kültüre alınmıştır. Larva yetiştirme havuzuna alınan larvalar pul balık yemi ile beslenerek pupa evresine geçtikten sonra pupa havuzuna alınmıştır. 2-3 gün sonra ergin hale geçen *C. pipiens* ergin yetiştirme kafeslerine alınarak % 10'luk şekerli su ile beslenmiştir. Ergin yetiştirme kafesleri içerisine dişi erginlerin yumurtlaması için 25 ºC sıcaklığında temiz su bulunan kaplar bırakılarak yumurtlamaları sağlanmıştır. İçersinde yumurta bulunan kaplar larva çıkışı olduğunda alınarak larva yetiştirme havuzuna aktarılmıştır. Bu şekilde *C. pipiens* kültür devamlılığı sağlanmıştır.



Şekil 2.4. *Culex pipiens* larva yetiştirme havuzu



Şekil 2.5. *Culex pipiens* ergin yetiştirme kafesi

2.2. Yöntem

2.2.1. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşunun Kültüre Alınması ve Çoğaltılması

Böcekler üzerindeki insektisidal aktivitesi önceki çalışmalarla belirlenmiş olan *Bacillus thuringiensis* SY49-1 suşunun -80 ºC'de saklanan stok kültürü çoğaltma işlemi yapılmak üzere çözünmeye bırakılmıştır. Çözünme işlemi yapılırken ependorf tüplerde saklanan örnek -20 °C'ye alınmış bir süre burada tutulduktan sonra 4 ºC bekletilmiştir. Çözünme işlemi gerçekleştirildikten sonra stok kültür oda sıcaklığına alınmıştır. Oda sıcaklığında bulunan stok kültürden yaklaşık 100 µl alınarak sıvı LB besi yerine ekilmiştir. Ekim işlemi yapılan besi yeri 30 ºC'de 200 rpm'de çalkalamalı inkübatörde bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı besi yerinde bir gece çoğalan bakteri kültüründen 10 µl alınarak LB agar besi yerine ekilmiş ve bir gece 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

2.2.2. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşunun Gram Boyama Yöntemiyle Boyanması

Temiz lamlar üzerine birer damla serum fizyolojik ilave edilerek, bek ocağı alevi yanında öze ucu ile uygun miktarda bakteri alınmış ve lam üzerindeki serum fizyolojik içinde yayılarak preparat hazırlandıktan sonra açık havada kurutularak bek alevinde

tespit edilmiştir. Preparat ilk önce kristal viyole ile 1 dk. muamele edildikten sonra musluk suyunda yıkanmıştır. Sonra bir dk. lugol ile muamele edilmiş ve bu süre sonunda preparat tekrar yıkanmıştır. Aseton-alkol ile muamele edildikten sonra tekrar yıkanmış ve ardından bir dk. süreyle safraninle boyanmıştır. Son olarak tekrar su ile yıkandıktan sonra ve açık havada kurutulmuş ve ışık mikroskobunda incelenmiştir. İnceleme sonunda menekşe-mor renkli gram pozitif basiller gözlenmiştir.

2.2.3. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşunun Spor Boyama Yöntemiyle Boyanması

Temiz lamlar üzerine bakteri örneği yayıldıktan sonra 20 defa bek alevinden geçirilerek fiske edilmiştir. Fikse edilmiş olan bakteri örneğinin üzeri Malakit yeşili (5gr/100ml) ile kaplandıktan sonra 10 dk. boyunca buhar çıkana kadar alttan hafif ısıtılmış ve eksilen boya solüsyonunun yerine yenisi ilave edilmiştir. Daha sonra musluk altında 30 saniye süreyle yıkanmıştır. Zıt boyama olarak safranin solüsyonu (5gr/100ml) 1dk. süreyle uygulanmış ve musluk suyu ile yıkandıktan sonra kurumaya bırakılmıştır [273] Elde edilen preperatlar Olympus marka mikroskopla 4000 (10x100x2x2 = 4000) defa büyütülerek incelenmiş ve Olympus DP12 marka kamerayla fotoğraflarıçekilmiştir.

2.2.4. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşundan Total DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu Bravo *et al*,. [274] önerdiği metoda göre yapılmıştır. *Bt* SY49-1 suşu sıvı LB besiyerinde 30 ºC'de bir gece inkübasyona bırakıldıktan sonra saf koloniden öze ucuyla bir miktar bakteri alınarak 0.1 ml steril distile su içerisine konulmuş ve -80^{o}C de 20 dk. boyunca bekletilmiştir. Daha sonra karışım 10 dk. boyunca kaynar suda bekletilerek hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. Ardından 10.000 rpm de 10s süreyle santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatant PCR işlemlerinde kullanılmıştır.

2.2.5. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşundan Plazmit DNA İzolasyonu

Plazmit DNA izolasyonu, alkali lizis yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir [275, 276]. *Bt* SY49-1 5 ml LB besiyerinde 200 rpm'de 30 ºC'de bir gece inkübasyona bırakılmış ve 2 ml'lik ependorf tüplerde 10.000 rpm'de 2 dk. santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelet 100 µl TE (40 mM tris-HCI, 2 mM EDTA, pH 7.9) tamponunda yeniden çözdürülmüş ve ardından 200 µl liz çözeltisi [% 3 (w/v) SDS, % 15 (w/v) sükroz, 50 mM tris-hidroksit, pH 12.5] eklenmiştir. Elde edilen karışım 60 ºC'de 30 dk. inkübe

edildikten sonra her bir tüpe 2 µl Proteinaz-K (20 mg/ml) ilave edilmiştir. Daha sonra elde edilen karışım hafifçe çalkalandıktan sonra 41 ºC'de 90 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Ardından karışım içerisine 1 ml fenol: kloroform: izoamil alkol (25:24:1) ilave edilerek 15-20 defa ters çevrilerek karıştırılmıştır. Elde edilen örnek 6000xg de 7 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır. Daha sonra 500 µl kloroform: izoamil alkol (24:1) karışımı ilave edilmiş ve 6000xg de 7 dk. boyunca tekrar santrifüj edilmiştir. Plazmit DNA içeren süpernatant alınarak -20 ºC'de saklanmıştır.

Elde edilen örnekden 40'ar µl alınıp 6 µl jel yükleme boyasıyla karıştırılmış ve 1X TAE tamponunda hazırlanan % 0.5'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Jelin hazırlanması sırasında 400 ml TAE tamponu içerisine 16 µl etidyum bromid eklenmiştir. Elde edilen plazmitler elektroforezde yürütülerek (4 ºC, 50 Volt'ta 12 saat) görüntülenmiştir [275,276].

2.2.6. PCR yöntemiyle *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşunun 16S ITS rDNA Bölgesinin Çoğaltılması

DNA'sı izole edilen bakteri aşağıda verilen primer çifti kullanılarak PCR reaksiyonu yapılmıştır. PCR işlemi için 8.4 µl steril dH_2O, 1.5 µl $MgCl_2$ (25 mM), 1.5 µl taq tamponu (10X), 0.5 µl dNTP mix (10 mM), 0.5 R+ 0.5 F µl primer (100 nM), 0.1 µl DNA taq polimeraz (5u/ µl), 2 µl (5 ng/µl) DNA eklenerek son hacim 15 µl'ye tamamlanmıştır. Örnekler thermocycler (Sensoquest) cihazında reaksiyona bırakılmıştır (şekil 2.6).

Reaksiyonda kullanılan primer ve basamaklar;

16S ITS rDNA F 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'

R 5'- CAAGGCATCCACCGT -3'

94 ºC	5 dk.	Başlangıç denatürasyon aşaması
94 ºC	1 dk.	35 döngü
48 ºC	1 dk.	
72 ºC	1 dk.	
72 ºC	10 dk.	Son uzama aşaması



Şekil 2.6. Thermocycler (Sensoquest) cihazı

2.2.7. PCR Yöntemiyle *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşunun *cry1Ab* ve *cry2* Tüm Genom Bölgesinin Çoğaltılması

DNAsı izole edilen bakteri aşağıda verilen primer çifti kullanılarak PCR reaksiyonu yapılmıştır. PCR işlemi için 8.4 µl steril dH_2O , 1.5 µl $MgCl_2$ (25 mM), 1.5 µl taq tamponu (10X), 0.5 µl dNTP mix (10 mM), 0.5 R+ 0.5 F µl primer (100 nM), 0.1 µl DNA taq polimeraz (5 u/µl), 2 µl (5 ng/µl) DNA eklenerek son hacim 15 µlğye tamamlanmıştır. Örnekler thermocycler (Sensoquest) cihazında reaksiyona bırakılmıştır. Reaksiyonda kullanılan primerler ve basamaklar;

cry1Ab primeri Forward - **5ğ GGA TCC** ATG GAT AAC AAT CCG AAC ATC ğ3

Reverse -**5ğ GTC GAC** TTA TTC CTC CAT AAG AAG TAA-3ğ

94 ºC	5 dk.	Başlangıç denatürasyon aşaması
94 ºC	1 dk.	30 döngü
52 ºC	1 dk.	
72 ºC	3.5 dk.	
72 ºC	10 dk.	Son uzama aşaması

cry2 primeri Forward - 5ğ- **GAA TTC** GGA TCC ATA TGA ATA GTG TAT TGA AT-3ğ

Reverse - - 5ğ**GTC GAC** GTA CGG ATC CTA CTC AAA CCT TAA TAA-3ğ

94 ºC	5 dk.	Başlangıç denatürasyon aşaması
94 ºC	2 dk.	30 döngü
50 ºC	1 dk.	
72 ºC	2 dk.	
72 ºC	10 dk.	Son uzama aşaması

BamHI kesim enzim bölgesi **GGATCC**
SalI kesim enzim bölgesi **GTCGAC**
EcoRI kesim enzim bölgesi **GAATTC**

2.2.8. Agaroz Jelden DNA Saflaştırma İşlemi

Saflaştırma işleminde fermantas marka DNA ekstraksiyon kiti kullanılmıştır. Saflaştırma işlemi üretici firmanın tarif ettiği şekilde yapılmıştır.

2.2.8.1. Yıkama Tamponun (Wash Buffer) Hazırlanması

1.5 ml konsantre yıkama tamponu üzerine 28.5 ml dH_2O eklenerek toplam hacim 30 ml tamamlanmıştır. 30 mlʼlik çözelti üzerine % 95ʼlik etanol eklenerek daha sonra kullanılmak üzere -20 ºC saklanmıştır.

2.2.8.2. Saflaştırma Basamakları

Agaroz jelden UV-312 nm ışığı altında kesilen bantlar steril ependorf tüpler içerisine alınmıştır. Tüpler içerisindeki jel tartıldıktan sonra 1 hacim jele: 3 hacim bağlama (bunding) solüsyonu eklenip 55 ºCʼde 7 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda her bir tüpe 7 µl silica powder eklenmiş ve tekrardan 55^{o}Cʼde 10 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda tüpler 13000 rpmʼde 5 sn. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Pellet bulunan tüpler üzerine daha önce hazırlanmış soğuk yıkama tamponundan (washing buffer) 500 µl eklenerek pellet iyice çözülmüştür. Çözdürme işleminden sonra tüpler 13000 rpmʼde 5 snʼye santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı atılmıştır. Bu işlem 3 defa tekrarlanmıştır. En son yıkama işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve tüpler tekrardan 13000 rpmʼde 10 sn.ʼye santrifüj edilmiştir. Daha sonra elde edilen pellet oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Kuruyan pellet üzerine 10 µl dH_2O eklenerek 55 ^{o}Cʼde 5 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüpler 13000 rpmʼde 30 snʼye santrifüj edilmiş ve süpernatant yeni bir tüpe alınmıştır. DNA içeren süpernatant % 1ʼlik agaroz jelde yürütülerek DNAʼnın varlığı kontrol edilmiştir.

2.2.9. Klonlama İşlemleri ve Basamakları

2.2.9.1. *cry1Ab* Geninin pGEM-T Easy Klonlama Vektörüne Aktarılması

PCR reaksiyonundan sonra agaroz jelde yürütülen *cry1Ab* geni DNA eksraksiyon kiti kullanılarak temizlendikten sonra ligasyon reaksiyonunda kullanılmıştır. Ligasyon reaksiyonu için; Promega marka 1 µl pGEM-T Easy vektör (50 ng), 7.5 µl T-4 DNA ligaz tamponu (2X), 1 µl T-4 DNA ligaz enzimi (3 u/ µl), 5.5 µl *cry1Ab* geni (50 ng) steril ependorf tüpü içerisinde yavaşça karıştırıldıktan sonra 4°C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra ligasyon karışımının *E. coli* DH5Ű bakterisine transformasyonu gerçekleştirilmiştir.

2.2.9.2. *cry2* Geninin pGEM-T Easy Klonlama Vektörüne Aktarılması

PCR reaksiyonundan sonra agaroz jelde yürütülen *cry2* geni DNA eksraksiyon kiti kullanılarak temizlendikten sonra ligasyon reaksiyonunda kullanılmıştır. Ligasyon reaksiyonu için; Promega marka 1 µl pGEM-T Easy vektör (50 ng), 7.5 µl T-4 DNA ligaz tamponu (2X), 1 µl T-4 DNA ligaz enzimi (3 u/µl), 5.5 µl *cry2* geni (50 ng) steril ependorf tüpü içerisinde yavaşça karıştırıldıktan sonra 4 °C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra ligasyon karışımı *E. coli* DH5Ű bakterisine transformasyonu gerçekleştirilmiştir.

2.2.9.3. *Escherichia coli* DH5Ű Kompetan Hücre Hazırlama ve Transformasyon İşlemleri

2.2.9.3.1. *E. coli* DH5Ű Kompetan Hücre Hazırlama

E. coli DH5Ű içersinde 5 ml sıvı LB besi yeri bulunan steril 50 ml'lik falkon tüpüne ekilerek 37 °C'de 200 rpm'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda 250 ml'lik erlenlerin içerisine steril 25 ml sıvı LB konulduktan sonra gece kültürü *E. coli* DH5Ű bakterisinden 500 µl ekilip 37 ºC'de 200 rpm'de 90 dk. OD_{600}=0,450-0,550 oluncaya kadar inkübasyona bırakılmıştır. Kültür daha sonra santrifüj tüplerine alınarak 1 saat buzda bekletilmiştir. Süre sonunda kültür 4 ºC'de 3000xg'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 12 ml soğuk steril 100 mM $CaCl_2$ eklendikten sonra çok nazik bir şekilde pellet çözdürülüp 24 saat buzda bekletilmiştir. Süre sonunda kültür 4 °C'de 3000xg'de 5 dk. santrifüj edilmiştir.

Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 2 ml soğuk steril 50 mM $CaCl_2$ eklendikten sonra çok nazik bir şekilde pellet çözdürülüp 2 saat buzda bekletilmiştir. Kompetan hale getirilen bakteriler transformasyon işleminde kullanılmak üzere -80 ^{o}C'de saklanmıştır.

2.2.9.3.2. *E. coli* DH5Ű'a Rekombinant Plazmitlerin Transformasyonu

Kompetan hale getirilen *E. coli* DH5Ű bakterisinden 200 µl alınarak steril ve soğutulmuş mikrosantrifüj tüpü içerisine konulmuştur. Kompetan hücreler bulunan tüp üzerine 1 µl ligasyon karışımı 10 kez TE ile sulandırıldıktan sonra eklenmiş ve 30 dk. buzda bekletilmiştir. Süre sonunda 42 ^{o}C'de 90 sn. ısı şoku uygulanmıştır. Daha sonra tüp üzerine buz içerisinde 800 µl sıvı SOC besiyeri eklenerek 37 ^{o}C'de 30 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda tüp 10000xg'de 20 sn. santrifüj edilerek 850 µl besiyeri uzaklaştırılıp kalan süpernatant içerisinde pellet çözülüp 50 µg/ml ampisilin içeren LB agar petrilerine (üzerine 100 mg/ml IPTG çözeltisinden 40 µl ve 20 mg/ml X-gal çözeltisinden 40 µl sürülmüş petriler) yayılmıştır. Gece boyunca 37 ^{o}C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda içerisine rekombinant plazmit alan hücrelerin beyaz koloni oluşturmasından yararlanılarak klonlar seçilmiştir.

2.2.9.4. Rekombinant Plazmitlerin İzolasyonu ve Restriksiyon Endonükleazlar ile Muamelesi

Rekombinant *E. coli* pGEM-T*cry1Ab* ve *E. coli* pGEM-T*cry2* klonları *cry1Ab* ve *cry2* genlerini taşıyıp taşımadıklarını kontrol etmek için mavi/ beyaz koloni morfolojisine göre ayırım yapılarak seçilen beyaz kolonilerden içerdikleri plazmit DNA'larını izole etmek için 50 µg/ml ampisilin içeren LB besiyerine ekim yapılmış ve 37 ^{o}C 200 rpm'de gece boyu inkübe edilmiştir. Gece kültürü bakterilerden plazmit DNA izolasyonu E.Z.N.A plazmit miniprep kiti kullanılarak yapılmıştır.

2.2.9.4.1. Rekombinant Plazmitlerin İzolasyonu

Rekombinant *E. coli* pGEM-T*cry1Ab* ve *E. coli* pGEM-T*cry2* klonlarının *cry1Ab* ve *cry2* genlerini taşıyıp taşımadıklarını kontrol etmek için mavi/beyaz koloni morfolojisine göre ayırım yapılarak seçilen beyaz kolonilerden içerdikleri plazmit DNA'larını izole etmek için 50 µg/ml ampisilin içeren LB besiyerine ekim yapılmış ve

37 ^{o}C 200 rpmôde gece boyu inkübe edilmiştir. Büyüyen rekombinant bakteriler steril ependorf tüplere aktarılmıştır. Oda sıcaklığında 10000xgôde 1 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra pellet üzerine 250 µl solüsyon I/ RNAaz eklenerek ve pellet iyice çözdürülmüştür. Ardından bu karışım üzerine 250 µl solüsyon II eklenerek ve 4-6 kez ters düz edilerek karıştırılmış ve oda sıcaklığında 2 dk. bekletilmiştir. Süre sonunda bu karışım üzerine 350 µl solüsyon III eklenerek 4-6 kez ters düz edilerek karıştırılmış 10000xgôde 10 dk. santrifüj edilmiştir. Bu işlemden sonra karışım Type I Hind Bind Coloum içerisine aktarılarak 10000xgôde 1 dk. santrifüj edilmiştir. Kolon altındaki toplama tüpünün içerisindeki süpernatant atılarak Type I Hind Bind Coloum üzerine 500 µl HD tamponu eklenmiş ve 10000xgôde 1 dk. santrifüj edilmiştir. Tekrardan kolon altındaki toplama tüpünün içerisindeki süpernatant atılarak kolon üzerine etanol ile seyreltilmiş 700 µl wash tamponu eklenerek 10000xgôde 1 dk. santrifüj edilmiştir. Bu aşamadan sonra kolon steril santrifüj tüpünün içerisine konularak üzerine 50 µl elution tamponu eklenmiş ve santrifüj edilmiştir. Tüp içinde toplanan plazmit DNAôlar kesim enzimleriyle muamele edilmek üzere saklanmıştır.

2.2.9.4.2. Restriksiyon Endonükleazlar ile Muamele

İzole edilen rekombinant plazmit DNAôların *cry* geni içerip içermediği tespit etmek için plazmit DNAôlar *Eco*RI enzimi ile muamele edilmiştir. Kesim enzimleriyle reaksiyon yapılmadan önce *cry1Ab* ve *cry2* genlerinin kesim enzim haritaları çıkarılmıştır. Gen bankasında bulunan suşların gen dizileri referans alınarak kesim enzim haritaları çıkarılmıştır. Kesim enzim haritasına ve vektörler üzerinde bulunan klonlama kasetine göre kesim enzimleri belirlenmiştir. NCBIôdan alınan gen dizileri NEB cutterV2,0 programına eklenerek kesim enzim haritası çıkarılmıştır.

Reaksiyon 7,5 µl steril distile su, 2 µl *Eco*RI tamponu 10X, 10 µl rekombinant plazmit DNA, 0,5 µl *Eco*RI enzimi (5 u/ µl) hacim 20 µl olacak şekilde hazırlanmış ve 37 ^{o}Côde 2 saat inkübe edilmiştir. Ardından %1ôlik jelde elektroforez yapılmıştır.

2.2.9.5. *cry1Ab* Geninin pET28a (+) Ekspresyon Vektörüne Aktarılması

cry1Ab primeriyle yapılan PCR reaksiyon sonucunda oluşan PCR ürünü ve klonlama işleminde kullanılacak olan pET28a(+) vektörü *Bam*HI ve *Sal*I kesim enzimleriyle muamele edilmiştir. *BamH*I enzimi için reaksiyon; 13.5 µl steril distile su, 3 µl *Bam*HI

tamponu 10X, 2 µl pET28a(+) plazmit DNA, 1,5 µl *BamH*I enzimi (5u/ µl) hacim 20 µl olacak şekilde hazırlanmış, *cry1Ab* geni için reaksiyon 5.5 µl steril distile su, 3 µl *Bam*HI tamponu 10X, 10 µl *cry1Ab* geni, 1,5 µl *Bam*HI enzimi (5u/ µl) hacim 20 µl olacak şekilde hazırlanmış ve 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Reaksiyon sonucunda elde edilen ürünler % 1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra temizlenerek, *Sal*I kesim enzimleriyle muamele edilmiştir. *Sal*I enzimi için reaksiyon; 13.5 µl steril distile su, 3 µl *Sal*I tamponu 10X, 2µl pET28a(+) plazmit DNA, 1,5 µl *Sal*I enzimi (5u/ µl) hacim 20 µl olacak şekilde hazırlanmış, *cry1Ab* geni için reaksiyon 5.5 µl steril distile su, 3 µl *Sal*I tamponu 10X, 10 µl *cry1Ab* geni, 1,5 µl *Sal*I enzimi (5u/ µl) hacim 20 µl olacak şekilde hazırlanmış ve 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Reaksiyon ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra temizlenerek, ligasyon işleminde kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

2.2.9.6. *cry2* Geninin pET28a (+) Ekspresyon Vektörüne Aktarılması

cry2 primeriyle yapılan PCR reaksiyon sonucunda oluşan PCR ürünü ve klonlama işleminde kullanılacak olan pET28a(+) vektörü *Eco*RI ve *Sal*I kesim enzimleriyle muamele edilmiştir. *EcoRI* enzimi için reaksiyon; 13.5 µl steril distile su, 3 µl *Eco*RI tamponu 10X, 2µl pET28a(+) plazmit DNA, 1,5 µl *Eco*RI enzimi (5u/ µl) hacim 20 µl olacak şekilde hazırlanmış, *cry2* geni için reaksiyon 5.5 µl steril distile su, 3 µl *Eco*RI tamponu 10X, 10 µl *cry2* geni, 1,5 µl *Eco*RI enzimi (5u/ µl) hacim 20 µl olacak şekilde hazırlanmış ve 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Reaksiyon sonucunda elde edilen ürünler %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra temizlenerek, *Sal*I kesim enzimleriyle muamele edilmiştir. *SalI* enzimi için reaksiyon; 13.5 µl steril distile su, 3 µl *Sal*I tamponu 10X, 2µl pET28a(+) plazmit DNA, 1,5 µl *Sal*I enzimi (5u/ µl) hacim 20 µl olacak şekilde hazırlanmış, *cry2* geni için reaksiyon 5.5 µl steril distile su, 3 µl *Sal*I tamponu 10X, 10 µl *cry2* geni, 1,5 µl *Sal*I enzimi (5u/ µl) hacim 20 µl olacak şekilde hazırlanmış ve 37 ^{o}C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Reaksiyon ürünleri % 1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra temizlenerek, ligasyon işleminde kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

2.2.9.7. *cry1Ab* Geninin pET28a (+) Ekspresyon Vektörüyle Ligasyon İşlemi

Kesim enzimleriyle muamele edilen ve jelde yürütülerek temizlenen *cry1Ab* geni novagen marka ligasyon kiti kullanılarak ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon 2 µl 10X ligaz tamponu (200 mM Tris-HCl, 100 mM $MgCl_2$, 250 µg/ml acetylated BSA, pH 7.6), 2 µl 100 mM DTT, 1 µl 10 mM ATP, 2 µl (50 ng/µl) kesilmiş pET28a (+) vektör, kesilmiş 5µl *cry1Ab* geni, 1 µl T4 DNA ligaz enzimi (0.2ï 0.4 U/µl), 7 µl steril dH_2O olacak şekilde 20 µl tamamlanmıştır.

2.2.9.8. *cry2* Geninin pET28a (+) Ekspresyon Vektörüyle Ligasyon İşlemi

Kesim enzimleriyle muamele edilen ve jelde yürütülerek temizlenen *cry2* geni novagen marka ligasyon kiti kullanılarak ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon, 2 µl 10X ligaz tamponu (200 mM Tris-HCl, 100 mM $MgCl_2$, 250 µg/ml acetylated BSA, pH 7.6), 2 µl 100 mM DTT, 1 µl 10 mM ATP, 2 µl (50 ng/µl) kesilmiş pET28a(+) vektör, kesilmiş 5µl *cry2* geni, 1 µl T4 DNA ligaz enzimi (0.2ï 0.4 U/µl), 7 µl steril dH_2O olacak şekilde 20 µl tamamlanmıştır.

2.2.9.9. *Escherichia coli* BL21(DE3) Kompetan Hücre Hazırlama ve Transformasyon İşlemleri

2.2.9.9.1. *E. coli* BL21(DE3) Kompetan Hücre Hazırlama

Escherichia coli BL21(DE3) içerisinde 5 ml sıvı LB besi yeri bulunan steril 50 mlôlik falkon tüpüne ekilerek 37 ^oCôde 200 rpmôde bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda 250 mlôlik erlenlerin içerisine steril 25 ml sıvı LB konulduktan sonra gece kültürü *E. coli* BL21(DE3) bakterisinden 500 µl ekilip 37 ^oCôde 200 rpmôde 90 dk. OD_{600}=0,450-0,550 oluncaya kadar inkübasyona bırakılmıştır. Kültür daha sonra santrifüj tüplerine alınarak 1 saat buzda bekletilmiştir. Süre sonunda kültür 4 ^oCôde 3000xgôde 5 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 12 ml soğuk steril 100 mM $CaCl_2$ eklenerek nazik bir şekilde pellet çözdürülmüş ve 24 saat buzda bekletilmiştir. Süre sonunda kültür 4 ^oCôde 3000xgôde 5 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 2 ml soğuk steril 50 mM $CaCl_2$ eklenerek nazik bir şekilde pellet çözdürülmüş ve 2 saat buzda bekletilmiştir. Kompetan hale getirilen bakteriler transformasyon işleminde kullanılmak üzere -80 ^oCôde saklanmıştır.

2.2.9.9.2. *E. coli* BL21(DE3)'e Rekombinant Plazmitlerin Transformasyonu

Kompetan hale getirilen *E. coli* BL21(DE3) bakterisinden 200 µl alınarak steril ve soğutulmuş mikrosantrifüj tüpü içerisine konulmuştur. Kompetan hücreler bulunan tüp üzerine 1 µl ligasyon çözeltisi 10 kez TE sulandırıldıktan sonra eklenerek 30 dk. buzda bekletilmiştir. Süre sonunda 42 ^{o}C'de 90 sn ısı şoku uygulanmıştır. Daha sonra tüp üzerine buz içerisinde 800 µl sıvı SOC besiyeri eklenerek 37 ^{o}C'de 30 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda tüpler 10000xg'de 20 sn santrifüj edilerek 850 µl besi yeri uzaklaştırılmış, kalan süpernatant içerisinde pellet çözdürülerek ve 30 µg/ml kanamisin içeren LB agar petrilerine yayılmıştır. Petriler gece boyunca 37 ^{o}C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda içerisine rekombinant plazmit alan klonlar koloni PCR ile taranarak belirlenmiştir.

2.2. 10. Rekombinant Plazmit Taşıyan *E.coli* BL21(DE3) Bakterisinde Koloni PCR ile Genlerin Varlığının Tespit Edilmesi

İnkübasyon sonucunda içerisine rekombinant plazmiti aldığı düşünülen koloniden alınarak PCR reaksiyonuna tabi tutulmuştur. Koloni PCR işlemi için, 8.4 µl steril dH_2O, 1.5 µl $MgCl_2$ (25 mM), 1.5 µl taq tamponu (10X) , 0.5 µl dNTP mix (10 mM), 0.5 R+ 0.5 F µl primer (100 nM), 0.1 µl DNA taq polimeraz (5u/ µl), kürdan uçu ile koloni eklenerek son hacim 15 µl'ye tamamlanmıştır. *cry1Ab* ve *cry2* gen taraması için kanamisinli ortamda büyüyen her bir koloni taranmıştır. Koloni PCR sonunda pozitif sonuç veren koloniler tekrardan kanamisinli LB ortamında yetiştirilerek rekombinant protein izolasyonu yapılmıştır.

2.2.11. Rekombinant Protein Ekspresyonu ve İzolasyonu

Koloni PCR işlemi sonunda pozitif sonuç veren kolonilerin 30 µg/ml kanamisin içeren 5 ml sıvı LB besi yerine ekimi yapılmıştır. Elde edilen gece kültürü, tekrardan 100 ml 30 µg/ml kanamisinli besi yerine ekilmiştir. OD_{600}=0,5-1 olduğunda 100 ml besiyerleri steril ortamda 50 ml olacak şekilde ikiye ayrılmıştır. Ayrılan 50 ml'lik kültürlerden biri protein indüklemesi için diğeride indükleme yapılmaksızın kontrol için kullanılmıştır. Gen ekspresyonunu indüklemek için son konsantrasyon 1mM olacak şekilde IPTG besi yerine ilave edilerek bakteri kültürleri tekrar büyümeye bırakılmıştır. Yaklaşık 4 saat sonra kültür 50 ml'lik falkon tüpe aktarılarak 4 ^{o}C'de 5000 rpm'de 5 dk. santrifüj

edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılarak pellet 12 ml 20 mM Tris-Cl pH=7,5'da çözdürülmüş ve tekrar aynı şekilde santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 5 ml 20 mM Tris-Cl pH=7,5 tamponu eklenerek hücreler iyice karıştırılmıştır. Daha sonra karışım üzerine 50 µl lizozim (10 mg/ml) eklenerek 30 ^{o}C'de 15 dk. inkübe edilmiş ve bu süre sonunda hücreler 1 dk. boyunca sonikatörde parçalanmıştır. Son olarak karışım 4 ^{o}C'de 14.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Kalan pellet 2 ml 20 mM Tris-Cl pH=7,5 tamponunda çözüdürülerek SDS PAGE analizinde kullanılmak üzere -20 ^{o}C'de saklanmıştır. Plazmit taşımayan *E.coli* BL21(DE3)'ün kendisinden de aynı yöntemle protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen proteinler özel tüplere yerleştirilmiş, vakum kapakları takılmış ve liyofilizatör cihazına yerleştirilmiştir (şekil 2.7). Proteinler -45 ^{o}C'de 3 saat boyunca vakumlanarak kurutulmuştur. Liyofilize protein karışımı daha sonra belirlenen oranlarda tartılıp steril distile suda homojenize edilerek laboratuar ortamında zararlılara karşı uygulanmıştır.



Şekil 2.7. Rekombinant Cry proteinlerin ve spor-kristal karışımının liyofilize edilmesi

2.2.12. SDS-PAGE Analizi

Protein ekspresyonunun tespit edilmesi amacıyla SDS-PAGE yapılmıştır. Her bir örnekten 80 µg protein kullanılarak SDS poliakrilamid jel elektroforezinde yürütülmüştür. Her bir örnek üzerine muamele tamponu (60mM Tris-HCl (pH 6,8), % 25 Gliserol, % 2 SDS, % 5 β-merkaptoetanol, % 0,1 bromofenol blue) ilave edildikten sonra numuneler kaynayan su içerisinde 10 dk. Bekletilmiştir. Daha sonra Laemmli (1970) tarafından tanımlanan % 10'luk SDS-PAGE'e yüklenmiş ve 30 mA'de 4 ^{o}C'de 12 saat akım uygulanarak ayırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Protein bantlarının moleküler ağırlığı standart ile kıyaslanarak belirlenmiştir [277].

2.2.12.1. SDS-PAGE Jellerin Boyanması

Coomassie parlak mavisi (brilliant blue) proteinlere rastgele bağlanan bir boyar maddedir. Bu yöntemde jeldeki proteinler alkol (metanol veya izopropanol) / asetik asit içeren fiksatifle çöktürülür. Jel üzerindeki proteinlerin çöktüğü bölgeler boya ile mavi renge boyanır. Alt zemindeki fazla boya yıkama (bağlanmamış boyayı uzaklaştırma) (destaining) çözeltisi ile uzaklaştırıldıktan sonra jel asetik asitli suda saklanır. SDS-PAGE jeli alkole ve asite dayanıklı plastik bir kap içerisine alınarak hacminin 3-5 katı kadar fiksatif çözeltisi eklenmiş ve 2 saat 20 devir/dk. hızda çalkalanmıştır. Fiksatif çözeltisi dökülerek boya çözeltisi katılarak oda sıcaklığında enaz 30 dk. bekletilmiştir. Boya çözeltisi uzaklaştırılarak jel 1-2 dk. fiksatifle muamele edildikten sonra fiksatif çözeltisi uzaklaştırılmış ve 2 saat yıkama çözeltisinde hafifçe çalkalanmıştır. Bu işlem sonunda yıkama çözeltisi yenilenerek jel yüzeyindeki fazla boya kalıntıları uzaklaştırılmış ve protein bantları netleşinceye kadar bu işlem tekrarlanmıştır. Yıkama işleminden sonra jel fotoğraflanarak % 7 'lik asetik asit çözeltisinde saklanmıştır [277].

2.2.13. Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Örneklerdeki protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. 25 gr Coomassie brillant blue G-250 boyası 12.5 ml % 95 etanolda çözdürülerek 25 ml % 85 H_3PO_4 eklendikten sonra hacim 250 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra boya 5 kez sulandırılarak Whatman no.1 filtreden geçirilip oda sıcaklığında saklanmıştır.

0.5 ml kör örnek ve yoğunlukları 5, 10, 15, 20, 25, 30 µl olan standart BSA (1 mg/ml) çözeltisi içerisine 5 ml boya eklenerek 595 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Protein

örneklerinde ise 490 µl su içerisine 10 µl protein eklenerek üzerine 5 ml bradford boyası ilave edilip karıştırıldıktan sonra 5 dk. bekletilmiş ve 595 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür [277]. Standart eğri grafiği hazırlandıktan sonra örneklerin protein derişimi belirlenmiştir.

2.2.14. *Ephestia kuehniella*'ya Karşı Rekombinant Proteinlerin İnsektisidal Etkisinin Belirlenmesi

İzolasyonu yapılan rekombinant Cry1Ab, Cry2, plazmit taşımayan *E. coli* BL21(DE3)'ün proteini ve *Bt* SY49-1 suşunun spor-kristal protein karışımı Akdeniz Un Güvesi *E. kuehniella* Zeller (Lepidoptera, Pyralidae), larvalarına uygulanmıştır. *E. kuehniella* larvalarına 10 µg/g, 25 µg/g, 50 µg/g, 100 µg/g, 250 µg/g, 500 µg/g ve 1000 µg/g oranlarında liyofilize edilmiş total proteinler uygulanmıştır. Denemeler üç tekerrür halinde yapılmıştır. 1 ml steril distile su içerisinde izole edilen proteinler çözdürülmüş ve içerisine 1 gr karıştırmak üzere eklenip 20 dk. bekletildikten sonra petri kaplarına aktarılarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kontrol grubuna ise 1 g üstüne 1 ml steril distile su eklenmiştir. Daha sonra 10'ar adet *E. kuehniella* larvası petrilere konmuş ve ölen larva sayısı 10 gün boyunca kaydedilmiştir.

2.2.15. *Culex pipiens*'e Karşı Rekombinant Proteinlerin İnsektisidal Etkisinin Belirlenmesi

İzolasyonu yapılan rekombinant Cry2 proteini, plazmit taşımayan *E. coli* BL21(DE3)'ün proteini ve *Bt* SY49-1 suşunun spor-kristal protein karışımı sivrisinek *C. pipiens* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvalarına uygulanmıştır. *C. pipiens* larvalarına 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml oranlarında liyofilize edilmiş total proteinler uygulanmıştır. Denemeler üç tekerrür halinde ve her bir tekerrürde 10 larva olacak şekilde yapılmıştır. 300 ml steril cam kavanozlar içerisine 25 ml steril musluk suyu olacak şekilde yukarıda berlirtilen dozlarda toksin karıştırılmıştır. Kontrol grubuna ise sadece steril musluk suyu konulmuştur. Uygulama yapılan larvalar günlük olarak pul balık yemi ile beslenmiştir. 10 gün boyunca larva ölümleri kayıt kaydedilmiş ve ölen larvalar cam kavanozdan uzaklaştırılmıştır.

2.2.16. İstatistiksel Analiz

Denemelerden elde edilen veriler SPSS for Windows version 17.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) istatistik programı kullanılarak varyans analizi (ANOVA) ve tabi tutulmuştur. Probit analizi kullanılarak her bir izolata ait spor-kristal karışımının LC_{50} ve LC_{95} değerleri hesaplanmıştır [278].

3. BÖLÜM

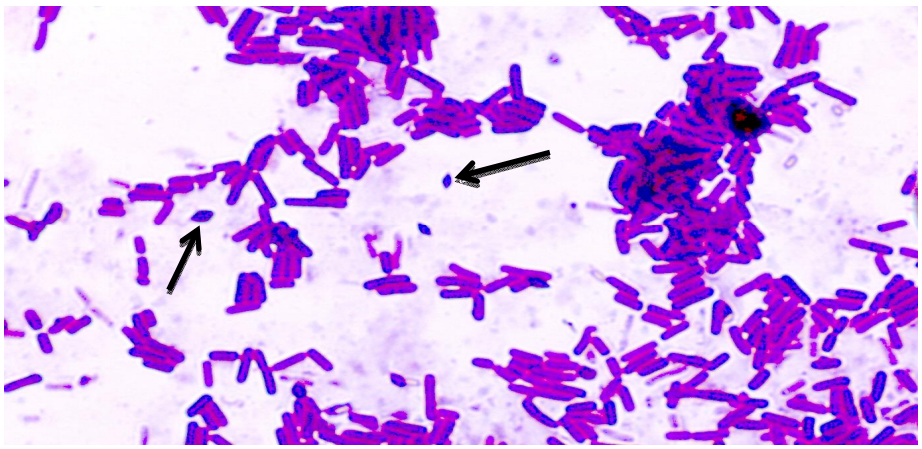
BULGULAR

3.1. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşu

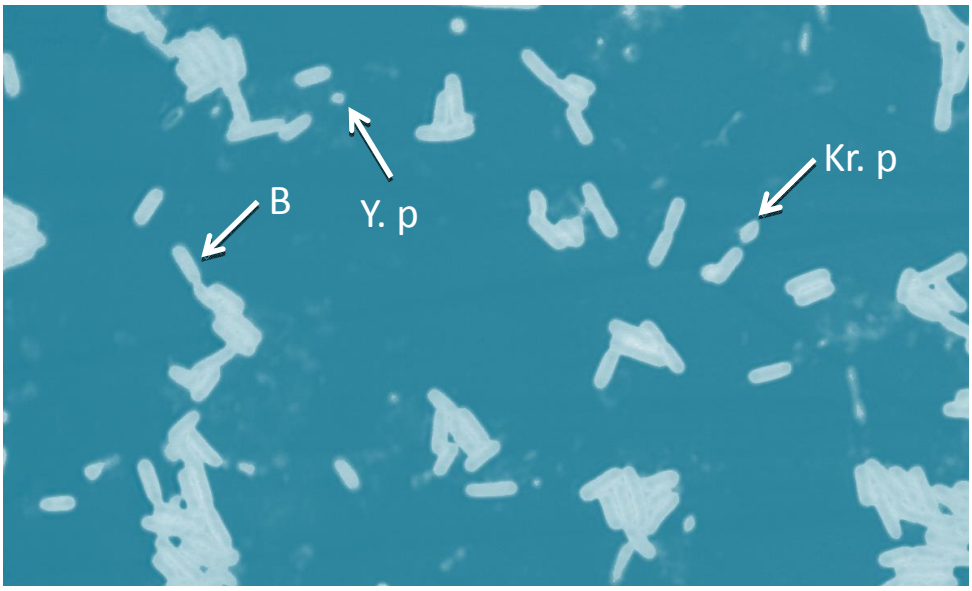
Bu çalışma insektisidal aktivitesi daha önceki çalışmalarda belirlenmiş fakat bu etkinliğin hangi Cry proteininden kaynaklandığı bilinmeyen *Bacillus thuringiensis* SY49-1 suşunun etkili Cry proteinlerinin bireysel olarak insektisidal aktivitesini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

3.2. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşunun Morfolojik Özelliği

Gram boyama sonrasında bakteriler ışık mikroskobunda incelenmiştir. İnceleme sonunda menekşe-mor olan basillerin gram pozitif oldukları belirlenmiştir. Gram pozitif *Bt* SY49-1 suşu total DNA izolasyonu yapılana kadar 4 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir. Gram boyamada *Bt* SY49-1 suşunun üretmiş olduğu kristal proteinlerde boyanmıştır (şekil 3.1.). Ayrıca *Bt* SY49-1'in sporlanması spor boyama yöntemi ile teşhis edilmiştir. Malakit yeşili ile boyanan sporların mikroskop altında yuvarlak yeşil renkli formları tespit edilmiştir.



Şekil 3.1. *B. thuringiensis* SY49-1 gram boyama ışık mikroskobu görüntüsü (X1000)

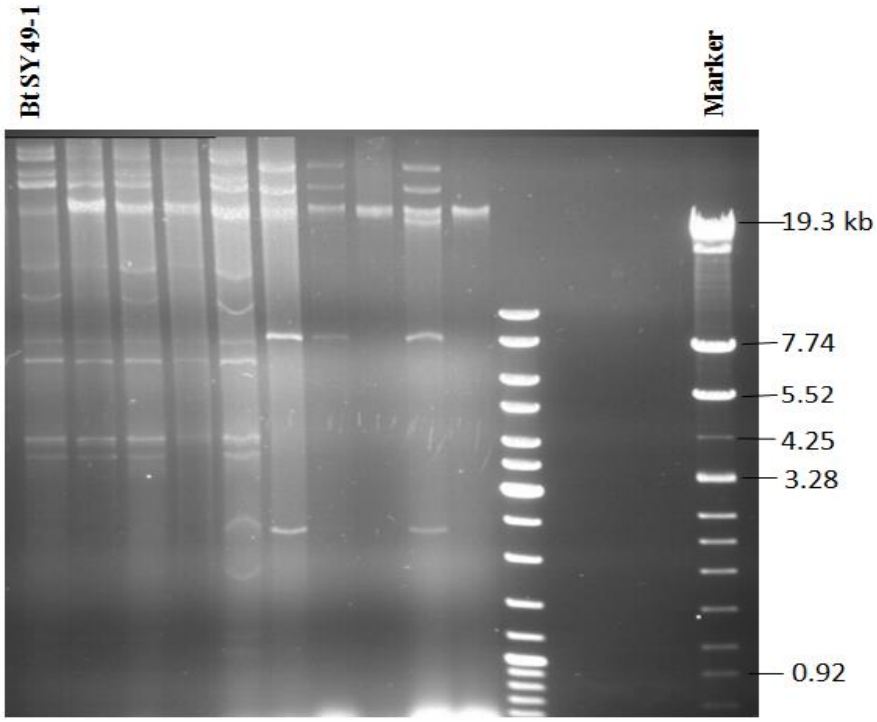


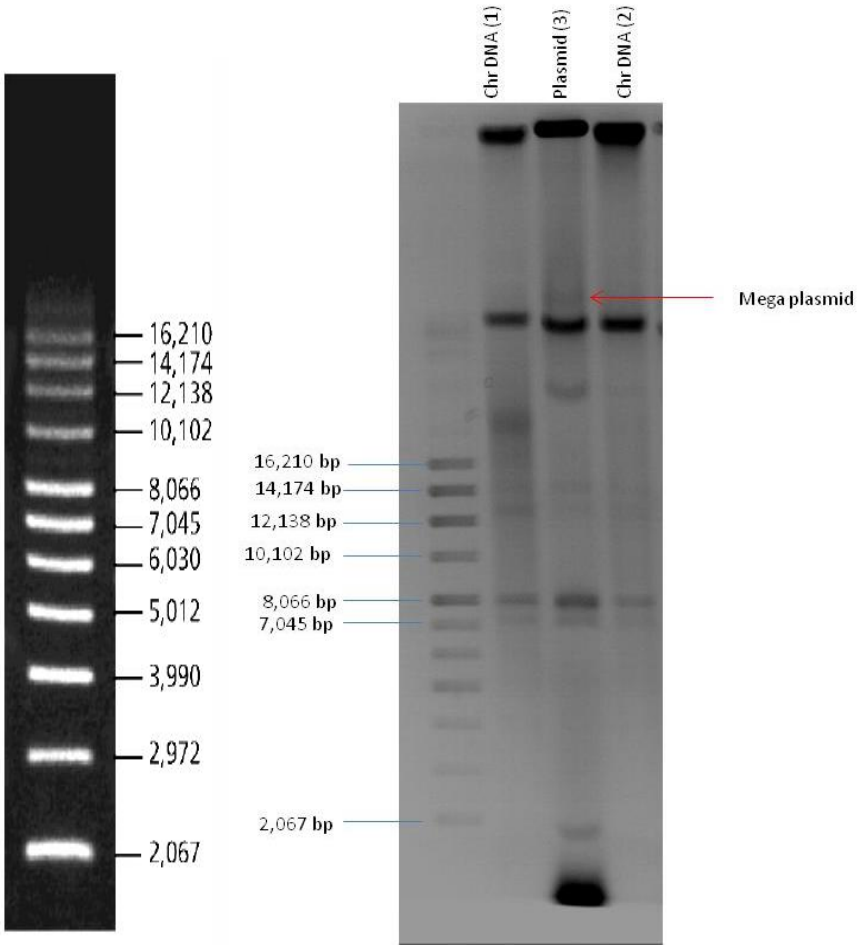
B: Bakteri Y.p: Yuvarlak protein Kr.p: Kristal protein

Şekil 3.2. *B. thuringiensis* SY49-1 Cry protein mikroskop görüntüsü (X1000)

3.3. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşunun Plazmit Profili

Alkali lizis yöntemine göre izolasyonu yapılan plazmit DNA örnekleri % 0.5'lik agaroz jelde 5 ºC'de 65 Volt'ta 8 saat yürütüldükten sonra görüntülenmiştir (şekil 3.3). Plazmit DNA boyutları ise pUC mix-marker ile kıyaslanarak belirlenmiştir.





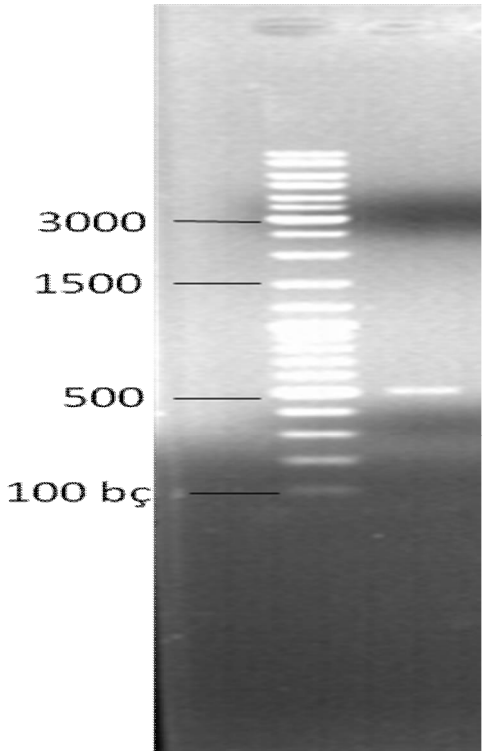
Şekil 3.3. Plazmit DNA'larının % 0.5'lik agaroz jel görüntüsü

Agaroz jel elektroforezi sonrasında yapılan değerlendirmede *Bt* SY49-1 suşunun farklı büyüklükte 11 plazmit taşıdığı belirlenmiştir. 4 plazmitin 19.3 kb'den büyük, 1 plazmitin 19.3 kb büyüklüğünde, 2 plazmitin 19.3-7.74 kb arasında, 1 plazmitin 7.74 kb, 1 plazmitin 7.74-5.52 kb arasında, 1 plazmitin 4.25 kb, 1 plazmitin ise 4.25-3.28 kb arasında büyüklüğüne sahip olduğu belirlenmiştir.

3.4. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşunun 16S-ITS rDNA Dizi Analizi Sonucu

16S rDNA geni ve ITS dizilerini içeren DNA bölgesi PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. PCR işlemi Tablo 2.1'de belirtilen primer çifti kullanılarak Bölüm 2.2.6'da belirtildiği şekilde yapılmıştır. PCR ürünü % 1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra 500 bç büyüklüğündeki spesifik bant Fermantas DNA Agaroz Jel Ekstraksiyon Kiti kullanılarak saflaştırıldıktan sonra dizi analizi Ankara REF Gen Biyoteknoloji Merkezine yaptırılmıştır. Belirlenen nükleotid dizileri NCBI/ BLAST programı

kullanılarak gen bankasındaki diğer *Bacillus* cinsi bakterilerle kıyaslanmak ve benzerlik oranları çıkarılmaktır.



Şekil 3.4 .*B. thuringiensis* SY49.1 suşunun 16S rDNA PZR ürünün saflaştırma işleminden sonra % 1'lik agaroz jel görüntüsü

F'AAATGCGGAGATGTGATAATACGCACGCTGCGGCATTTCGGTGACTGAAACGATTAAAAGCTAAGTA
TCCTCACCTAAAAACAATTATTTCCGTTGGTGGCTGGACTTGGTCTAACCGCTTTTCTGACATGGCCGCT
GATGAAAAAACAAGAAAAGTATTCGCTGATTCTACAGTCGATTTCCTACGCGAATATGGATTTGATGGC
GTTGATTTAGATTGGGAATATCCGGGCGTAGAAACGATTCCTGGTGGTAGTTATCGCCCTGAAGATAAA
CAAAACTTCACCCTACTCCTTCAGGATGTTCGAAACGCATTAACGAAAGCTGGTGCAGAAGATGGTAA
AAAATATTTACTAACAATTGCATCAGGTGCAAGCCAACGTTATGCTGATCATACAGAGCTAAGACATCT
CTCAATACTGGATTGGATTATATTATGACGTATGATTTCCACGTGGATTGCCTTGAAACATAATACACG
ATGAAAATTTCTTTGCTCTGTTGACCAAAGTTGCTCCGAGCATGTAAAAAATTTCACTCGCATTCTAAGC
TTCACGAGGAATAGGGAATTTGTTTTATTCGATATCAGAAGTTGCAAATCAACCCCCAAATGGGAGGAA
CGGGGA

R'CGGTCATATATAATCCAATCCAGTATTTGAGAGATTTTCTTTAGCTCTGTATGATCAGCATAACGTTG
GCTTGCACCTGATGCAATTGTTAGTAAATATTTTTTACCATCTTCTGCACCAGCTTTCGTTAATGCGTTTC
GAACATCCTGAAGGAGTAGGGTGAAGTTTTGTTTATCTTCAGGGCGATAACTACCACCAGGAATCGTTT
CTACGCCCGGATATTCCCAATCTAAATCAACGCCATCAAATCCATATTCGCGTAGGAAATCGACTGTAG
AATCAGCGAATACTTTTCTTGTTTTTTCATCAGCGGCCATGTCAGAAAAGCGGTTAGACCAAGTCCAGC
CACCAACGGAAATAATTGTTTTTAGGTGAGGATACTTAGCTTTTAATCGTTTCAGTTCACCGAAATTGCC
GCAGCGTGCGTATTTATCACAATCTTCCCAAGATGTACCTGAGCGGGGACAAAACTCTAT

Tablo 3.1. *Bt* SY49-1 suşunun *Bacillus thuringiensis andalousiensis* BGSC 4AW1 contig00024 (ACNG01000016.1) suşu ile 16S-ITS rDNA dizi eşleştirme sonucu [270].

```
İzolat  4     CTTGGGGAA-A-TGTGA-AAATACGCACGCTGCGG-CATTTCGGTGAACTGAAACGATTA  59
              ||| ||||| | ||||| ||||||||||||||||  ||||||| ||||||||||||||||
Sbjct 109918 CTT-GGGAAGATTGTGATAAATACGCACGCTGCGGAAATTTCGGCGAACTGAAACGATTA  109860

İzolat 60     AAAGCTAAGTATCCTCACCTAAAAACAATTATTTCCGTTGGTGGCTGGACTTGGTCTAAC  119
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Ref 109859    AAAGCTAAGTATCCTCACCTAAAAACAATTATTTCCGTTGGTGGCTGGACTTGGTCTAAC  109800

İzolat 120    CGCTTTTCTGACATGGCCGCTGATGAAAAAACAAGAAAAGTATTCGCTGATTCTACAGTC  179
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Ref 109799    CGCTTTTCTGACATGGCCGCTGATGAAAAAACAAGAAAAGTATTCGCTGATTCTACAGTC  109740

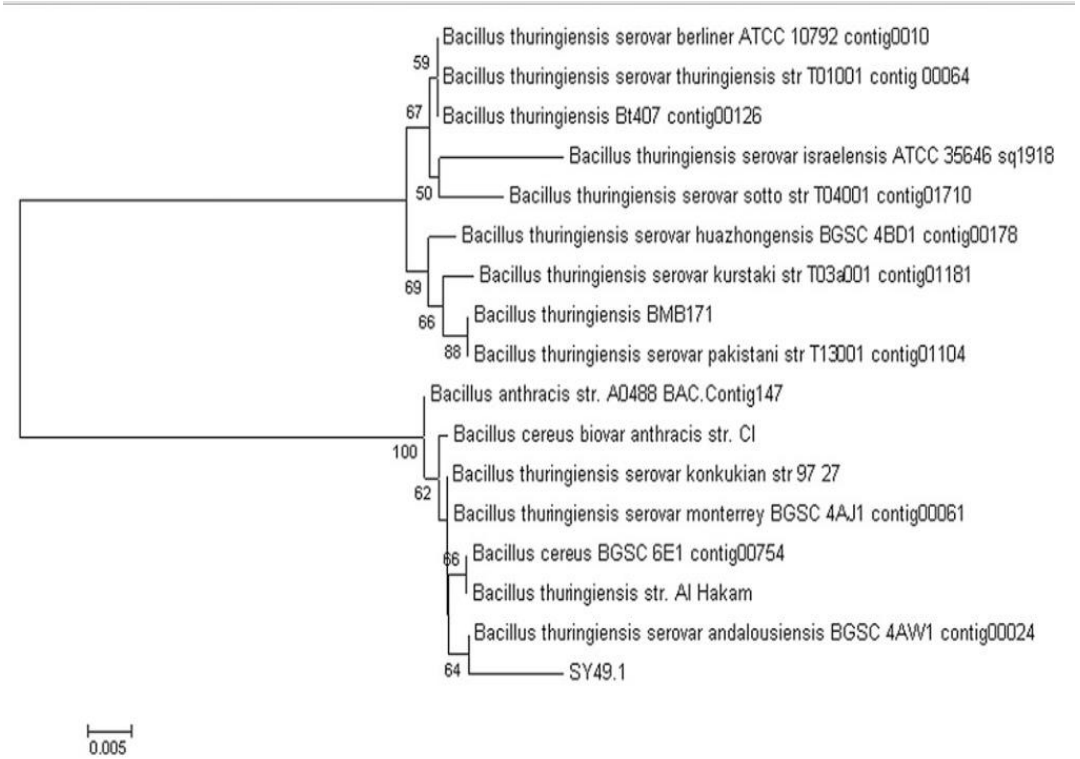
İzolat 180    GATTTCCTACGCGAATATGGATTTGATGGCGTTGATTTAGATTGGGAATATCCGGGCGTA  239
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Ref 109739    GATTTCCTACGCGAATATGGATTTGATGGCGTTGATTTAGATTGGGAATATCCGGGCGTA  109680

İzolat 240    GAAACGATTCCTGGTGGTAGTTATCGCCCTGAAGATAAACAAAACTTCACCCTACTCCTT  299
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Ref 109679    GAAACGATTCCTGGTGGTAGTTATCGCCCTGAAGATAAACAAAACTTCACCCTACTCCTT  109620

İzolat 300    CAGGATGTTCGAAACGCATTAACGAAAGCTGGTGCAGAAGATGGTAAAAAATATTTACTA  359
              ||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Ref 109619    CAGGATGTTCGAAATGCATTAACGAAAGCTGGTGCAGAAGATGGTAAAAAATATTTACTA  109560

İzolat 360    ACAATTGCATCAGGTGCAAGCCAACGTTATGCTGATCATACAGAGCTAAAGAAAATCTCT  419
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Ref 109559    ACAATTGCATCAGGTGCAAGCCAACGTTATGCTGATCATACAGAGCTAAAGAAAATCTCT  109500

İzolat 420    CAAATACTGGATTGGATTAATATTATGACGTATGATTTCCACGGTGGATG  469
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Ref 109499    CAAATACTGGATTGGATTAATATTATGACGTATGATTTCCACGGTGGATG  109450
```

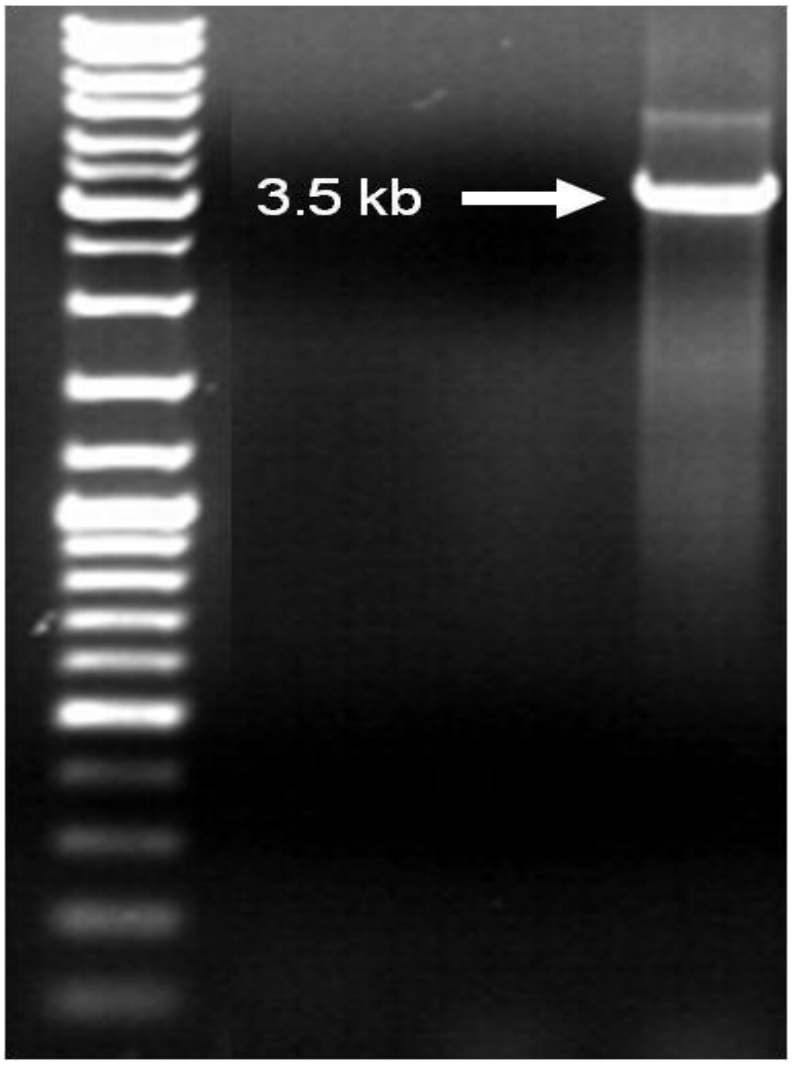


Şekil 3.5. *B. thuringiensis* SY49-1 suşunun 16S rDNA nükleotid dizisi ile yapılan soyağacı [270]

Bt SY49-1 suşunun 16S-ITS rDNA dizileri *Bacillus* cinsi bakterilerle kıyaslanmış ve % 98 oranında *Bacillus thuringiensis andalousiensis* BGSC 4AW1 contig00024 (ACNG01000016.1) suşu ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir [270].

3.5. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşunun *cry1Ab* Geninin Analizi

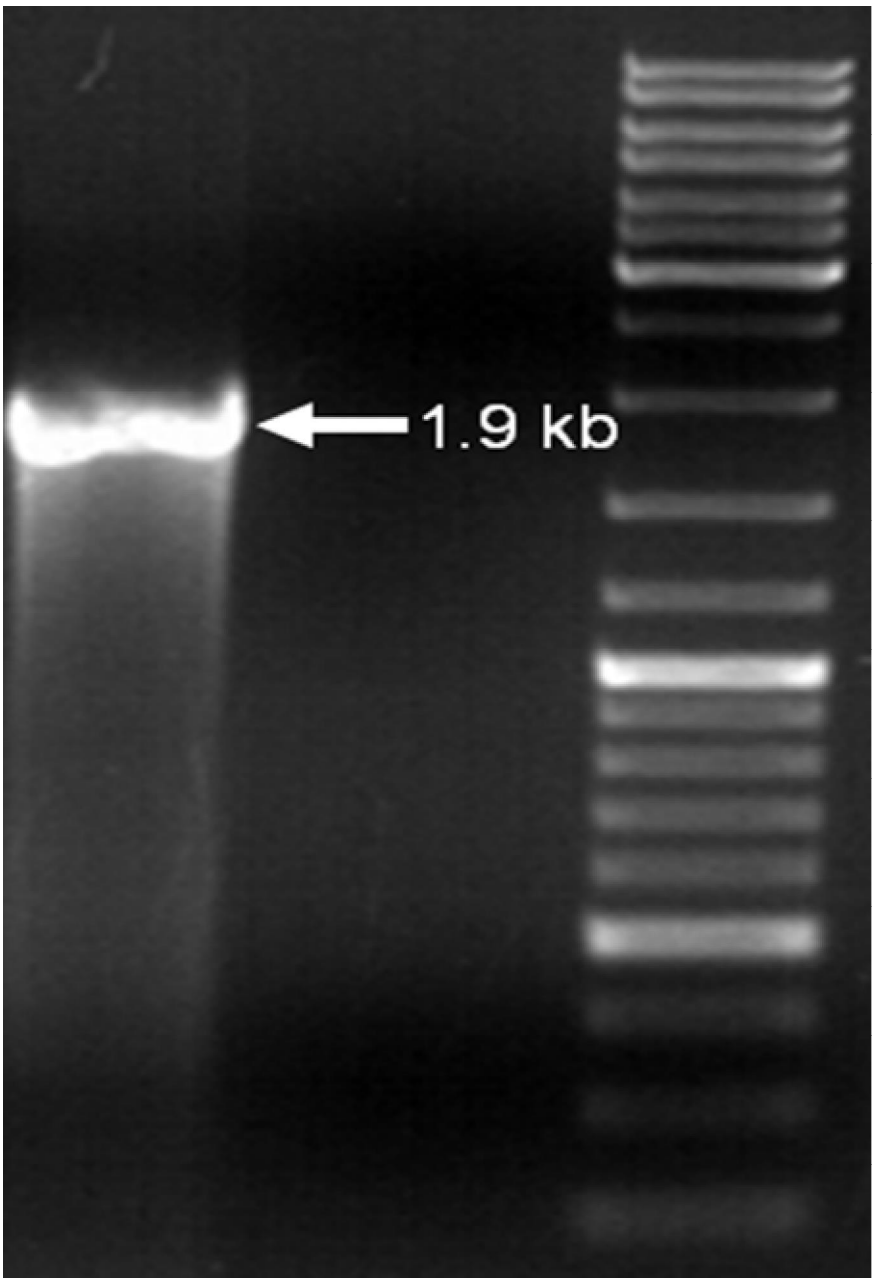
cry1Ab primeri ile yapılan PCR işlemi, Tablo 2.1'de belirtilen primer çifti kullanılarak Bölüm 2.2.7'de belirtildiği şekilde yapılmıştır. PCR ürünü %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra *Bt* SY49-1 suşunun yaklaşık olarak 3.5 kb büyüklüğünde ve beklenen boyutta bant oluşturduğu görülmüştür (şekil 3.6). Çoğaltılan *cry1Ab* gen bölgesi Fermantas DNA Agaroz Jel Ekstraksiyon Kiti kullanılarak saflaştırıldıktan sonra klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere -20 ºC'de saklanmıştır.



Şekil 3.6. *B. thuringiensis* SY49.1 suşunun *cry1Ab* primeri ile yapılan PCR ürünün % 1'lik agaroz jel görüntüsü

3.6. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşunun *cry2* Geninin Analizi

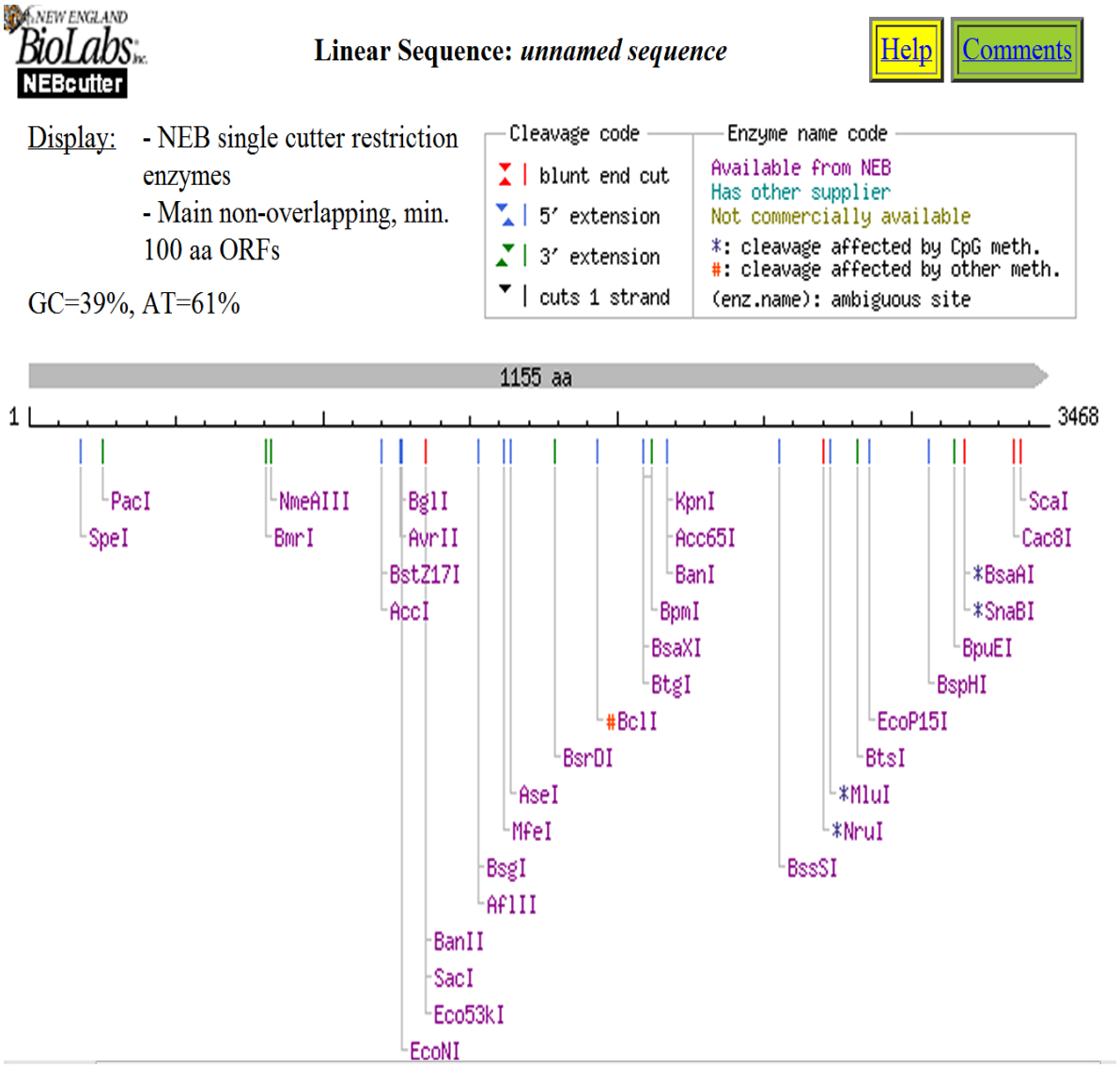
cry2 primeri ile yapılan PCR işlemi, Tablo 2.1'de belirtilen primer çifti kullanılarak Bölüm 2.2.7'de belirtildiği şekilde yapılmıştır. PCR ürünü %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra *Bt* SY49-1 suşunun yaklaşık olarak 1.9 kb büyüklüğünde ve beklenen boyutta bant oluşturduğu görülmüştür (şekil 3.7). Çoğaltılan *cry2* gen bölgesi Fermantas DNA Agaroz Jel Ekstraksiyon Kiti kullanılarak saflaştırıldıktan sonra klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere -20 ºC'de saklanmıştır.



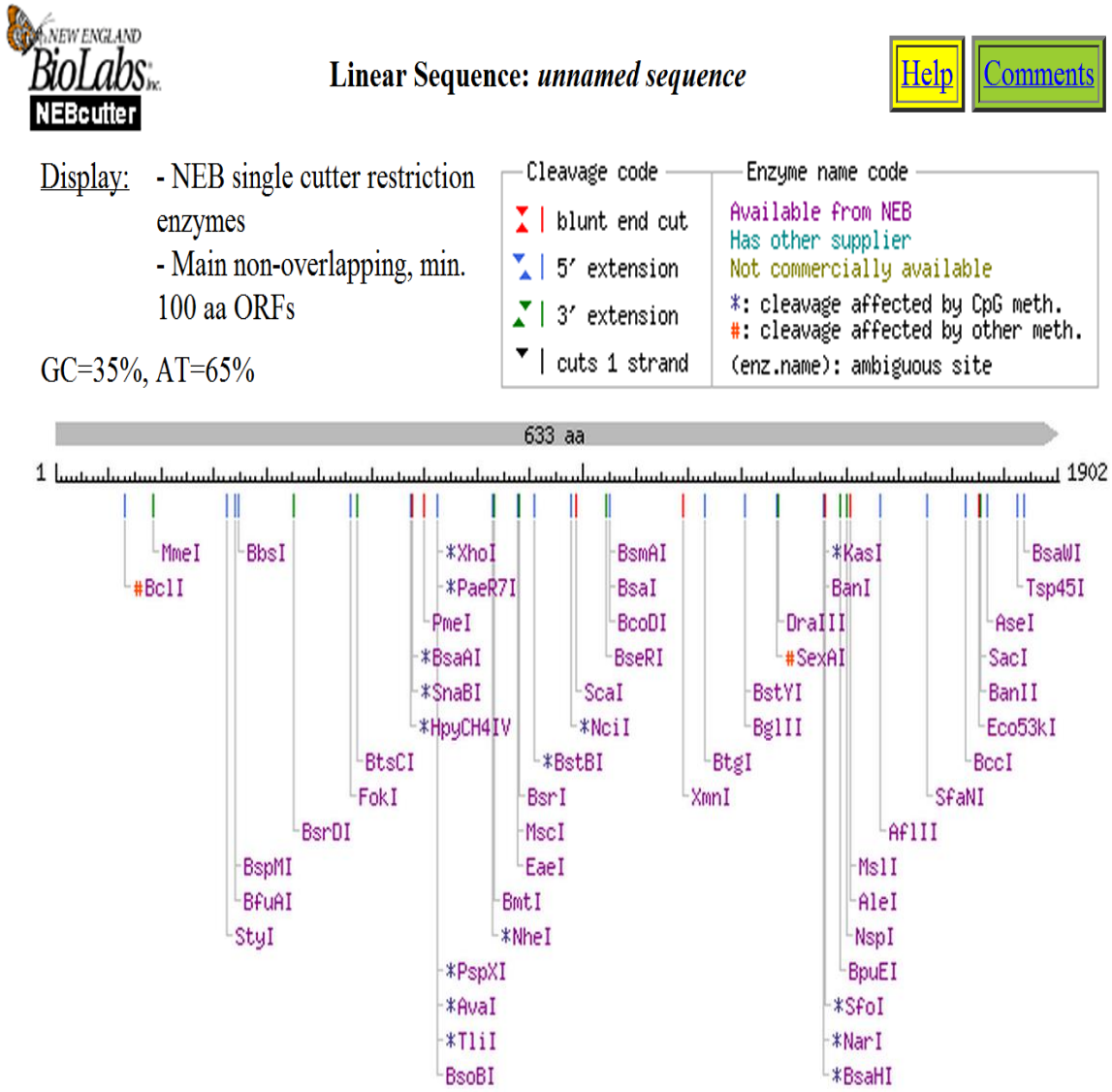
Şekil 3.7. *B. thuringiensis* SY49.1 suşunun *cry2* primeri ile yapılan PCR ürünün % 1'lik agaroz jel görüntüsü

3.7. *cry1Ab* ve *cry2* Genlerinin Kesim Enzim Haritalarının Belirlenmesi

Kesim enzimleriyle reaksiyon yapılmadan önce *cry1Ab* ve *cry2* genlerin kesim enzim haritaları çıkarılmıştır (şekil 3.8, şekil 3.9) Gen bankasında bulunan *Bt* suşlarının *cry1Ab* ve *cry2* gen dizileri referans alınarak kesim enzim haritaları çıkarılmıştır. Kesim enzim haritasına ve vektörler üzerinde bulunan klonlama kasetine göre kesim enzimleri belirlenmiştir. NCBI ‘dan alınan gen dizileri NEBcutterV2,0 programına kullanılarak kesim enzim haritası çıkarılmıştır.



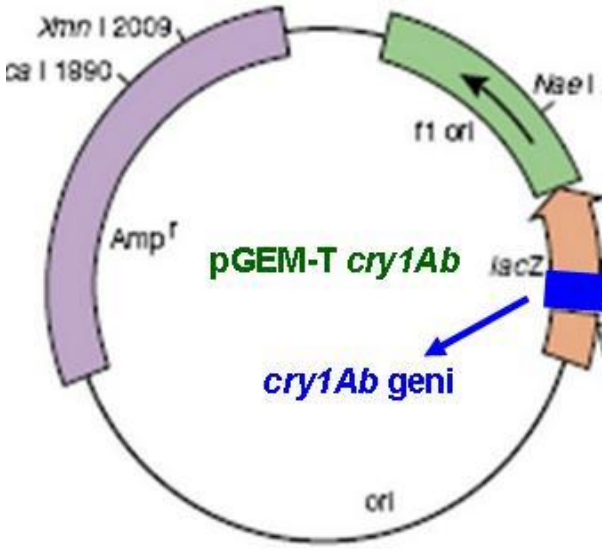
Şekil 3.8. *cry1Ab* geninin kesim enzim haritası



Şekil 3.9. *cry2* geninin kesim enzim haritasē

3.8. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşunun *cry1Ab* Geninin Klonlanmasē

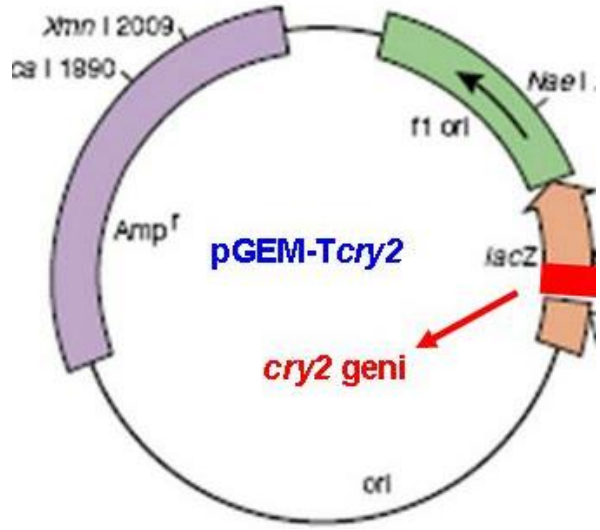
cry1Ab geni PCR ile çoğaltēldēktan sonra pGEM-T-Easy klonlama vektörüne aktarēlmēştēr. Klonlama basamaklarē Bölüm 2.2.9.1'de anlatēldığē şekilde gerçekleştirilmiştir. pGEMT-Easy klonlama vektörünün uzamēş TTTTC kuyruğu özelliği sayesinde direk olarak *cry1Ab* genin PCR ürünün klonlanmasēsağlanmēştēr. Taq polimeraz PCR reaksiyonunda genin 3'ucuna ekstra AAAG kuyruğu eklemektedir. Bu sayede direk olarak kolay bir şekilde genin vektörle ligasyonu gerçekleştirilmiştir. Ligasyon işlemi sonrasēnda rekombinant pGEM-T*cry1Ab* plazmiti elde edilmiştir (şekil 3.10).



Şekil 3.10. Rekombinant pGEM-T*cry1Ab* plazmiti

3.9. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşunun *cry2* Geninin Klonlanması

cry2 geni PCR ile çoğaltıldıktan sonra pGEM-T-Easy klonlama vektörüne aktarılmıştır. Klonlama basamakları Bölüm 2.2.9.1'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. pGEMT-Easy klonlama vektörünün uzamış TTTTT kuyruğu özelliği sayesinde direk olarak *cry2* genin PCR ürünün klonlanması sağlanmıştır. Taq polimeraz PCR reaksiyonunda genin 3' ucuna ekstra AAA kuyruğu eklemektedir. Bu sayede direk olarak kolay bir şekilde genin vektörle ligasyonu gerçekleştirilmiştir. Ligasyon işlemi sonrasında rekombinant pGEM-T*cry2* plazmiti elde edilmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Rekombinant pGEM-T*cry2* plazmiti

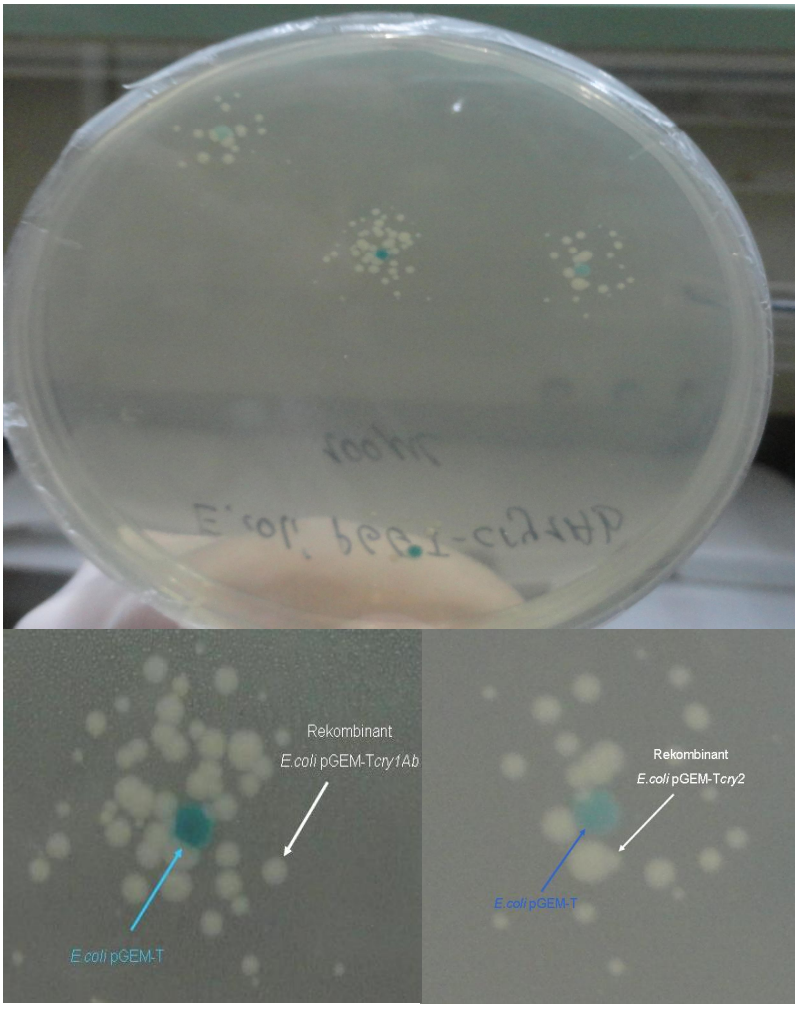
3.10. Rekombinant pGEM-T*cry1Ab* Plazmitinin *Escherichia coli* DH5Ŭ'ya Transformasyonu

Ligasyon ıklemi sonrasında elde edilen rekombinant pGEM-T*cry1Ab* plazmiti $CaCl_2$ ile kompetan hale getirilmiş *E. coli* DH5Ŭ bakterisine aktarılmıştır. Remkombinant plazmitleri taşıyan klonların seçimi için seciçi markerler kullanılmıştır. Transformasyon ıkleminde plazmit alamamış bakteriler vektör plazmit üzerinde bulunan ampisilin direnç genini taşımadığı için besi ortamında bulunan ampisilin antibiyotiğine direnç gösteremeyeceği için büyüyememiştir. Ayrıca ligasyon ıkleminde self ligasyon (kendi üzerine yapışma) olan ve transformasyon ile *E. coli* DH5Ŭ'ya aktarılan insert geni taşımayanlar ise X-gal parçalayıp parçalayamama özelliği sayesinde seçilmiştir. Klonlama ıkleminde LacZ mutant *E. coli* DH5Ŭ suşu kullanılmıştır. pGEM-T Easy plazmit vektöründe klonlama kaseti vektör plazmit üzerinde bulunan LacZ yapısal geni içerisinde bulunmaktadır. Böylece ligasyon ıklemi sırasında inset gen (*cry1Ab*) ile birleşen pGEM-T*cry1Ab* plazmitinin LacZ yapısal geni bozulduğu için LacZ genin ürünü olan ve X-gal parçalanmasında kullanılan ß-galaktosidaz enizimini üretememiştir. Böylecede seçici besi oratmında bulunan X-gal parçalayamadığı için beyaz koloni şeklinde görünmüştür. Kendi üzerine geni almadan ligasyon olan pGEM-T Easy plazmit vektörünün LacZ yapısal geni bozulmadığı için ß-galaktosidaz enizimini üretebilmiş ve ortamda bulunan X-gal parçalayarak mavi koloni rengini oluşturmuştur. Rekombinant pGEM-T*cry1Ab* plazmiti taşıyan bakteriler beyaz, geni taşımayan ancak pGEM-T plazmiti taşıyan bakteriler ise mavi renk oluşturmalarıı sayesinde pozitif klonlar (beyaz) seçilmiştir (şekil 3.12).

3.11. Rekombinant pGEM-T*cry2* Plazmitinin *Escherichia coli* DH5Ŭ'ya Transformasyonu

Ligasyon ıklemi sonrasında elde edilen rekombinant pGEM-T*cry2* plazmiti $CaCl_2$ ile kompetan hale getirilmiş *E. coli* DH5Ŭ bakterisine aktarılmıştır. Remkombinant plazmitleri taşıyan klonların seçimi için seciçi markerler kullanılmıştır. Transformasyon ıkleminde plazmit alamamış bakteriler vektör plazmit üzerinde bulunan ampisilin direnç genini taşımadığı için besi ortamında bulunan ampisilin antibiyotiğine direnç gösteremeyeceği için büyüyememiştir. Ayrıca ligasyon ıkleminde self ligasyon (kendi üzerine yapışma) olan ve transformasyon ile *E. coli* DH5Ŭ'ya aktarılan insert geni

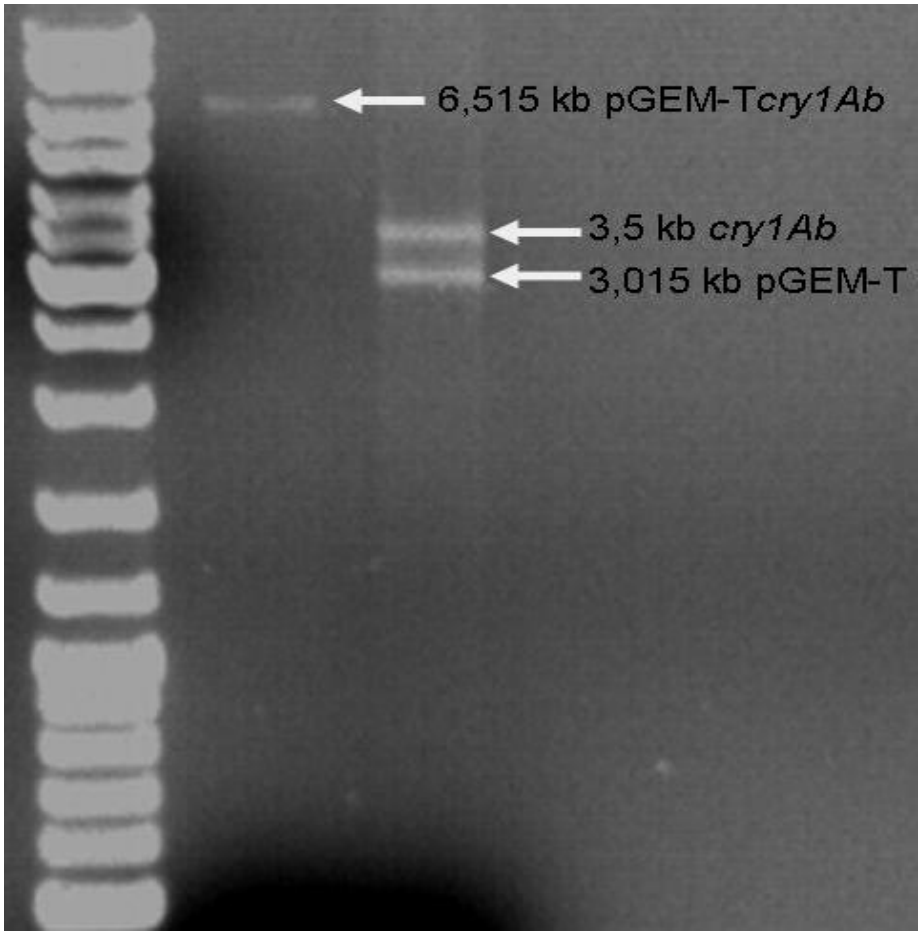
taşımayanlar ise X-galü parçalayıp parçalayamama özelliği sayesinde seçilmiştir. Klonlama işleminde LacZ mutant *E. coli* DH5Ű suşu kullanılmıştır. pGEM-T Easy plazmit vektöründe klonlama kaseti vektör plazmit üzerinde bulunan LacZ yapısal geni içerisinde bulunmaktadır. Böylece ligasyon işlemi sırasında inset gen (*cry2*) ile birleşen pGEM-T*cry2* plazmitinin LacZ yapısal geni bozulduğu için LacZ genin ürünü olan ve X-galün parçalanmasında kullanılan ß-galaktosidaz enzimini üretememiştir. Böylecede seçici besi ortamında bulunan X-galü parçalayamadığı için beyaz koloni şeklinde görünmüştür. Kendi üzerine geni almadan ligasyon olan pGEM-T Easy plazmit vektörünün LacZ yapısal geni bozulmadığı için ß-galaktosidaz enzimini üretebilmiş ve ortamda bulunan X-galü parçalayarak mavi koloni rengini oluşturmuştur. Rekombinant pGEM-T*cry2* plazmiti taşıyan bakteriler beyaz, geni taşımayan ancak pGEM-T plazmiti taşıyan bakteriler ise mavi renk oluşturmaları sayesinde pozitif klonlar (beyaz) seçilmiştir.



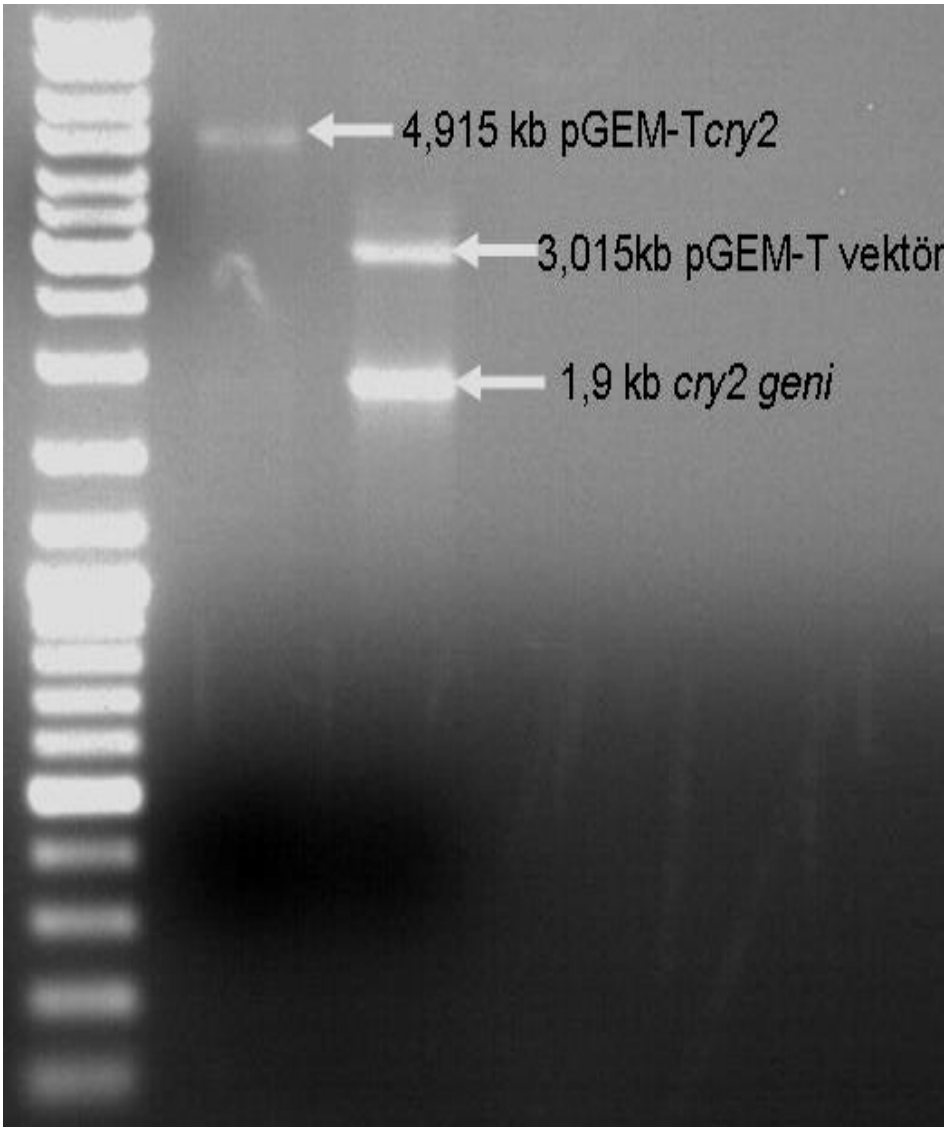
Şekil 3.12. Transformasyon işlemi sonrası mavi-beyaz koloni oluşumu

3.12. Klonlama İşleminin Doğruluğunun Test Edilmesi

Rekombinant *E. coli* pGEM-T*cry1Ab* ve *E. coli* pGEM-T*cry2* klonlarından *cry1Ab* ve *cry2* genlerini taşıyıp taşımadıklarını kontrol etmek için mavi/ beyaz koloni morfolojisine göre ayırım yapılarak seçilen beyaz kolonilerden rekombinant plazmit DNAlar izole edilmiştir. İzole edilen rekombinant plazmit DNAlar *Eco*RI enzimi ile muamele edilmiştir. Reaksiyon işlemi sonrasında kesilen rekombinant plazmit DNA agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur. 6,515 kb büyüklüğündeki pGEM-T*cry1Ab* plazmiti *Eco*RI enzimi ile kesildikten sonra 3,5 kb büyüklüğünde *cry1Ab* geni ve 3,015 kb büyüklüğünde pGEM-T vektör fragmentlerini vermiştir. Benzer şekilde 4,915 kb büyüklüğündeki pGEM-T*cry2* plazmiti *Eco*RI enzimi ile kesildikten sonra 3,015 kb büyüklüğünde pGEM-T vektör ve 1,9 kb büyüklüğünde *cry2* gen fragmentlerini oluşturmuştur (şekil 3.13, şekil 3.14).



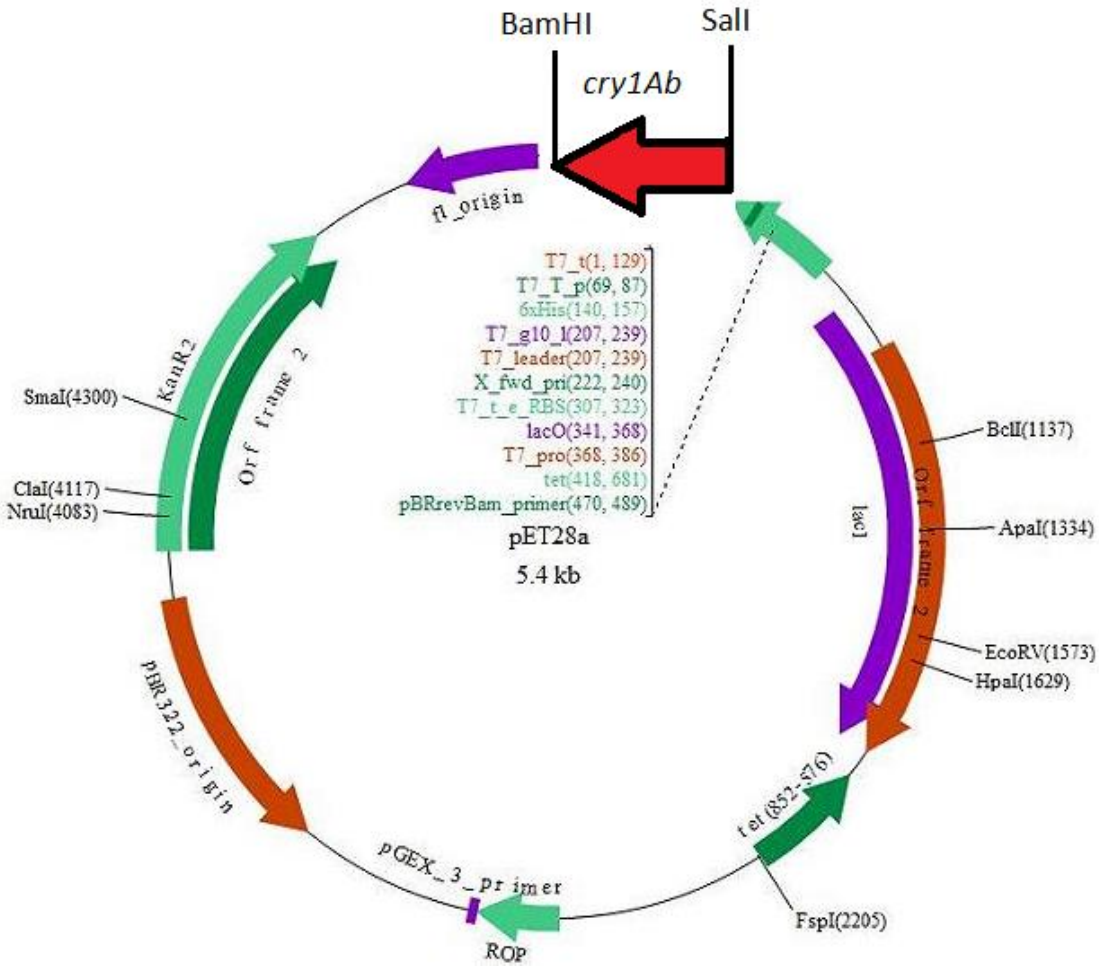
şekil 3.13. pGEM-T*cry1Ab* rekombinant plazmitin *Eco*RI enzimi ile kesildikten sonra% 1ôlik agaroz jel görüntüsü



Şekil 3.14. pGEM-T*cry2* rekombinant plazmitin *Eco*RI enzimi ile kesildikten sonra% 1'lik agaroz jel görüntüsü

3.13. *cry1Ab* Geninin pET28a (+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

cry1Ab primeriyle yapılan PCR reaksiyon sonuçunda oluşan PCR ürünü ve klonlama işleminde kullanılacak olan pET28a(+) vektörü *Bam*HI ve *Sal*I kesim enzimleriyle muamele edilmiştir. Reaksiyon sonucunda elde edilen ürünler %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra temizlenmiştir. Kesim enzimleriyle muamele edilen ve jelde yürütülerek temizlenen *cry1Ab* geni ve pET28a(+) vektörü ligasyon reaksiyonuyla birleştirilmiştir. Reaksiyon işlemi sonunda pET-*cry1Ab* rekombinant plazmit vektörü elde edilmiştir (şekil 3.15)



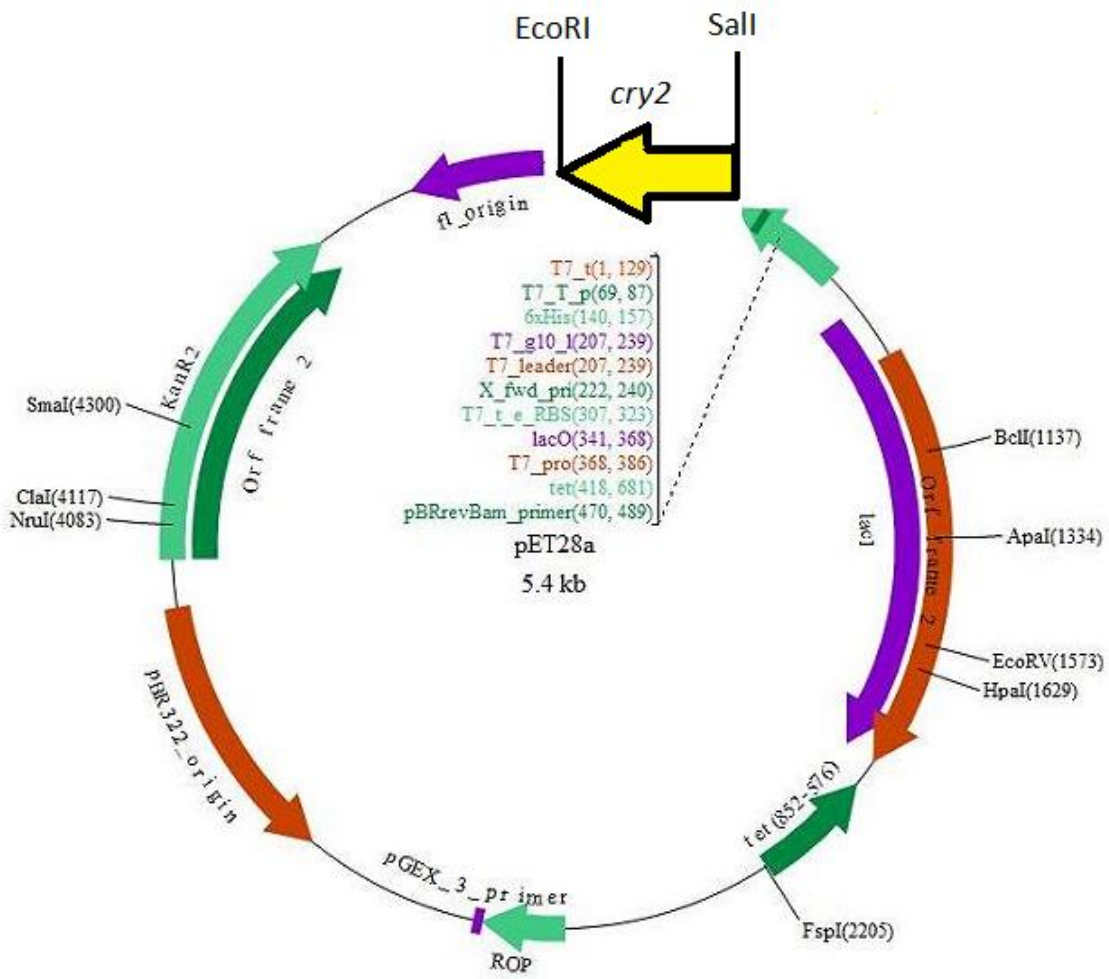
Şekil 3.15. Rekombinant pET-*cry1Ab* plazmiti

3.14. *cry2* Geninin pET28a (+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Cry2 primeriyle yapılan PCR reaksiyon sonuçunda oluşan PCR ürünü ve klonlama işleminde kullanılacak olan pET28a(+) vektörü *EcoRI* ve *Sal*I kesim enzimleriyle muamele edilmiştir. Reaksiyon sonucunda elde edilen ürünler %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra temizlenmiştir. Kesim enzimleriyle muamele edilen ve jelde yürütülerek temizlenen *cry2* geni ve pET28a(+) vektörü ligasyon reaksiyonuyla birleştirilmiştir. Reaksiyon işlemi sonunda pET-*cry2* rekombinant plazmit vektörü elde edilmiştir (Şekil 3.16)

Ligasyon reaksiyonu sonucunda 8.9 kb büyüklüğünde pET-*cry1Ab* rekombinant plazmiti ve 7.3 kb büyüklüğünde pET-*cry2* rekombinant plazmiti elde edilmiştir (Şekil 3.17). Ligasyon reaksiyonunda tüm DNA parçaları doğru şekilde birleşmeyebileceği

için reaksiyon sonunda doğru birleşen rekombinant plazmitler jelde yürütüldükten sonra kesilerek temizlenmiştir. Transformasyon işleminde kullanılmıştır.

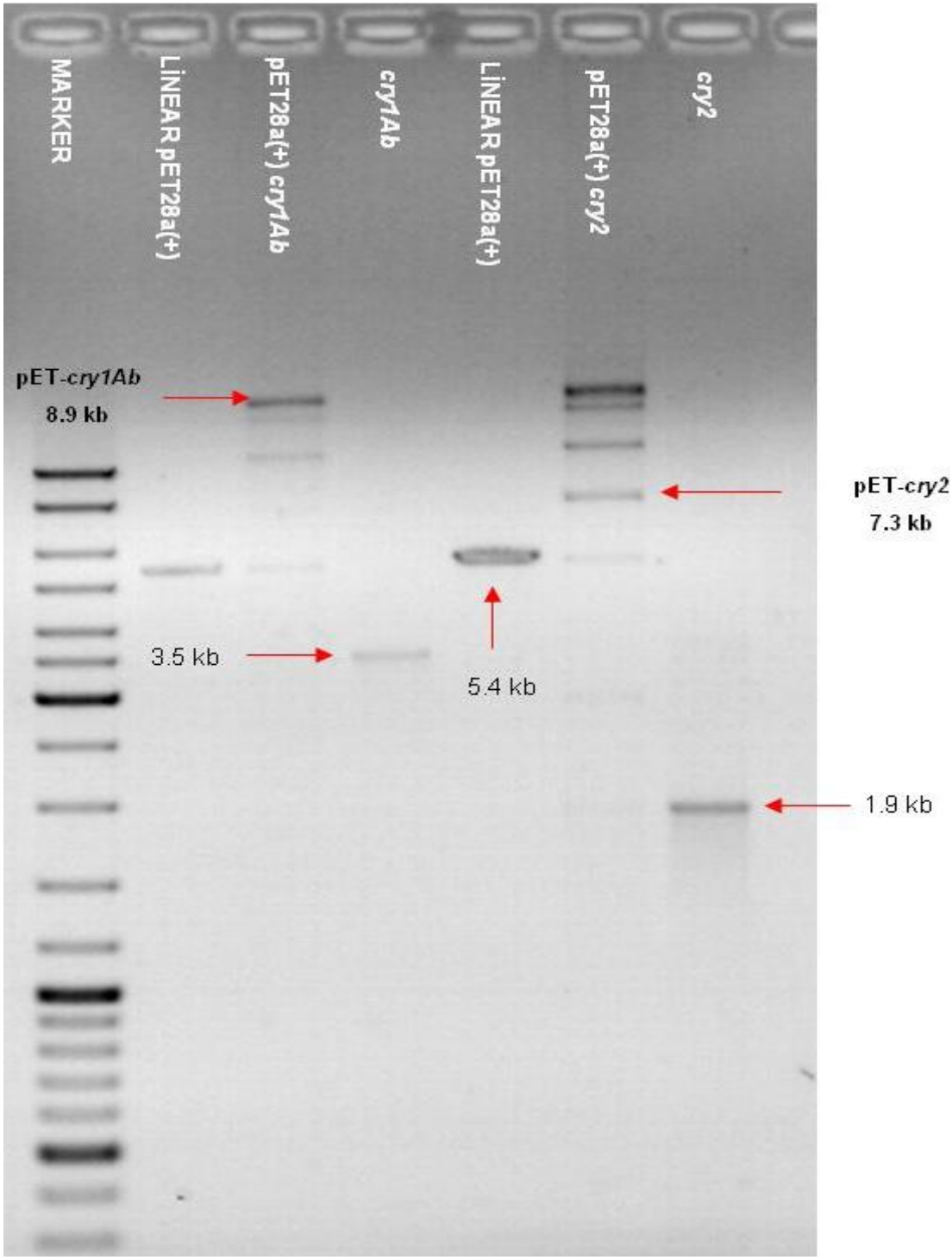


Şekil 3.16. Rekombinant pET-*cry2* plazmiti

3.15. Rekombinant pET-*cry1Ab* Plazmitinin *Escherichia coli* BL21(DE3)'e Transformasyonu

Ligasyon işlemi sonrasında elde edilen rekombinant pET-*cry1Ab* plazmiti $CaCl_2$ ile kompetan hale getirilmiş *E. coli* BL21(DE3) bakterisine aktarılmıştır. Remkombinant plazmitleri taşıyan klonların seçimi için seciçi marker kullanılmıştır. Transformasyon işleminde plazmit alamamış bakteriler pET vektör plazmiti üzerinde bulunan kanamisin direnç genini taşımadığı için besi ortamında bulununan kanamisin antibiyotiğine direnç gösteremeyerek büyüyememiştir. Klonlama işleminde kullanılan konukçu *E. coli* BL21(DE3) LacZ mutantı olmadığı için besi yerinde X-gal kullanılmamıştır. Sadece antibiyotik dirençliliği seçimi kullanılmıştır. Pozitif (insert; *cry1Ab* geni) olduğu

dükünülen klonlar ayrē ayrē kçilerek koloni PCR ile genin varlę ē doĵ rulanmēktē. Rekombinant olduĵ u belirlenen koloni ayrēlarak protein indüklemesi için kullanēlmēktē.



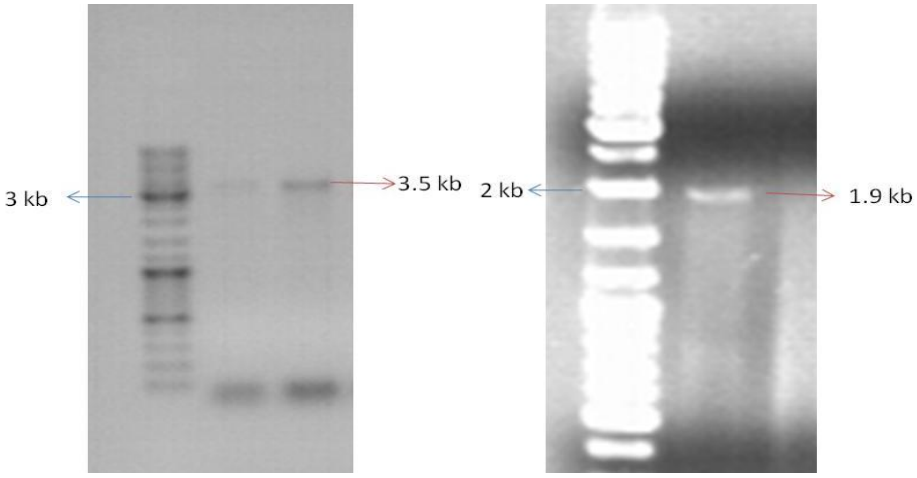
ķekil 3.17.*cry1Ab* ve *cry2* genlerinin pET28a(+) vektörüyle ligasyon iklemi sonrasē % 0.8ôlik agaroz jel görüntüsü

3.16. Rekombinant pET-*cry2* Plazmitinin *Escherichia coli* BL21(DE3)'e Transformasyonu

Ligasyon işlemi sonrasında elde edilen rekombinant pET-*cry2* plazmiti $CaCl_2$ ile kompetan hale getirilmiş *E. coli* BL21(DE3) bakterisine aktarılmıştır. Rekombinant plazmitleri taşıyan klonların seçimi için seciçi marker kullanılmıştır. Transformasyon işleminde plazmit alamamış bakteriler pET vektör plazmiti üzerinde bulunan kanamisin direnç genini taşımadığı için besi ortamında bulununan kanamisin antibiyotiğine direnç gösteremeyerek büyüyememiştir. Klonlama işleminde kullanılan konukçu *E. coli* BL21(DE3) LacZ mutantı olmadığı için besi yerinde X-gal kullanılmamıştır. Sadece antibiyotik dirençliliği seçimi kullanılmıştır. Pozitif (insert; *cry2* geni) olduğu düşünülen klonlar ayrı ayrı geçilerek koloni PCR ile genin varlığı doğrulanmıştır. Rekombinant olduğu belirlenen koloni ayrılarak protein indüklemesi için kullanılmıştır

3.17. Koloni PCR ile Genlerin Varlığının Tespit Edilmesi

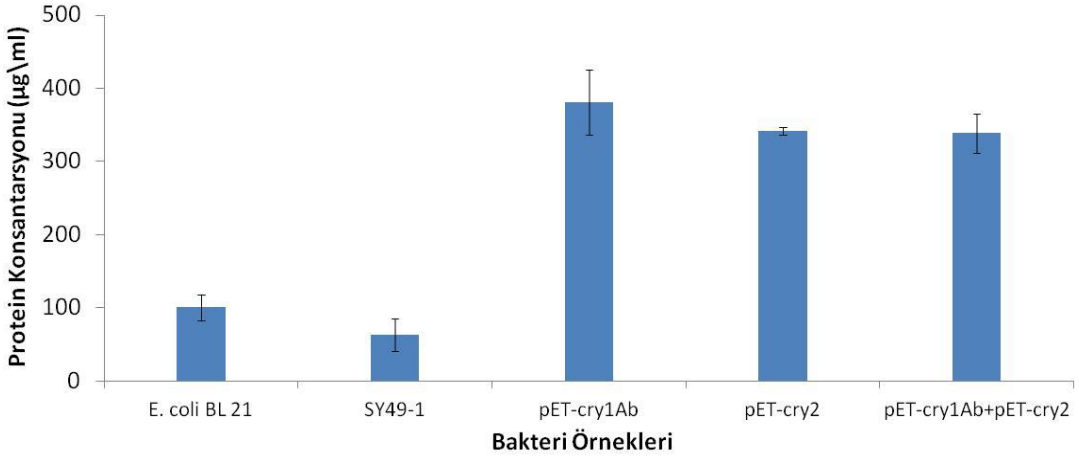
Rekombinant pET-*cry1Ab* ve pET-*cry2* plazmitini aldığı düşünülen koloniden alınarak PCR işlemine tabi tutulmuştur. PCR reaksiyonu Bölüm 2.2.10'da belirtildiği gibi yapılmıştır. PCR reaksiyonu sonunda oluşan ürünler agaroz jelde yürütülerek *cry1Ab* ve *cry2* genlerinin varlığı doğrulanmıştır. Rekombinant pET-*cry1Ab* plazmitini taşıdığı düşülen kolonin PCR reaksiyonu sonucunda 3.5 kb büyüklüğünde, rekombinant pET-*cry2* plazmitini taşıdığı düşülen kolonin ise 1.9 kb büyüklüğünde bant verdiği tespit edilmiştir (şekil 3.18).



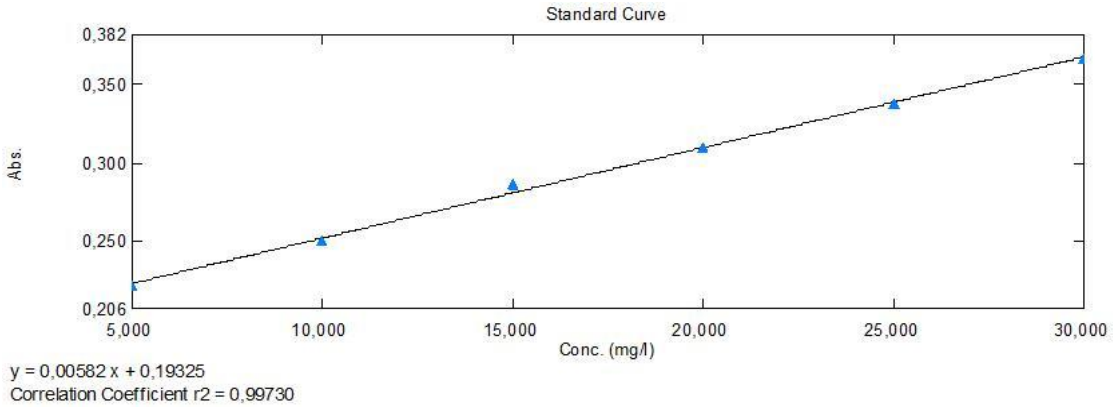
şekil 3.18. pET-*cry1Ab* ve pET-*cry2* plazmitini taşıyan bakterilerin koloni PZR reaksiyonu işlemi sonrası% 1'lik agaroz jel görüntüsü

3.18. Rekombinant Cry1Ab Proteinin Ekspresyonu ve SDS-PAGE Analizi

Rekombinant pET-*cry1Ab* plazmiti taşıyan *E. coli* BL21 (DE3) pET-*cry1Ab* kolonisinden alınarak 100 ml kanamisinli sıvı besi yerinde OD_{600}; 0.5-1 oluncaya kadar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besi yeri 50 ml olacak şekilde ikiye ayrılarak 50 ml'lik besi yerinin birtanesine son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG eklenmiştir. Diğer 50 ml'lik besi yerine ise IPTG eklenmemiştir. IPTG eklemesinin ardından protein ifadesi için 4 saat boyunca koloniler inkübasyona bırakılmıştır. Aynı işlem plazmit taşımayan *E. coli* BL21 (DE3) bakterisi içinde yapılmıştır. Süre sonunda bakterilerden protein izolasyonu yapılarak Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonları belirlenmiştir. Bradford analizinde standart olarak BSA kullanılmıştır (şekil 3.19). IPTG ile indükleme sonrası protein konsantrasyonları; *Bt* SY49-1 suşunda 63,7 µg/ml olarak belirlenmiştir. En yüksek protein konsantrasyonu ise *E. coli* BL21 (DE3) pET-*cry1Ab*'de 381,5 µg/ml olarak belirlenmiştir.

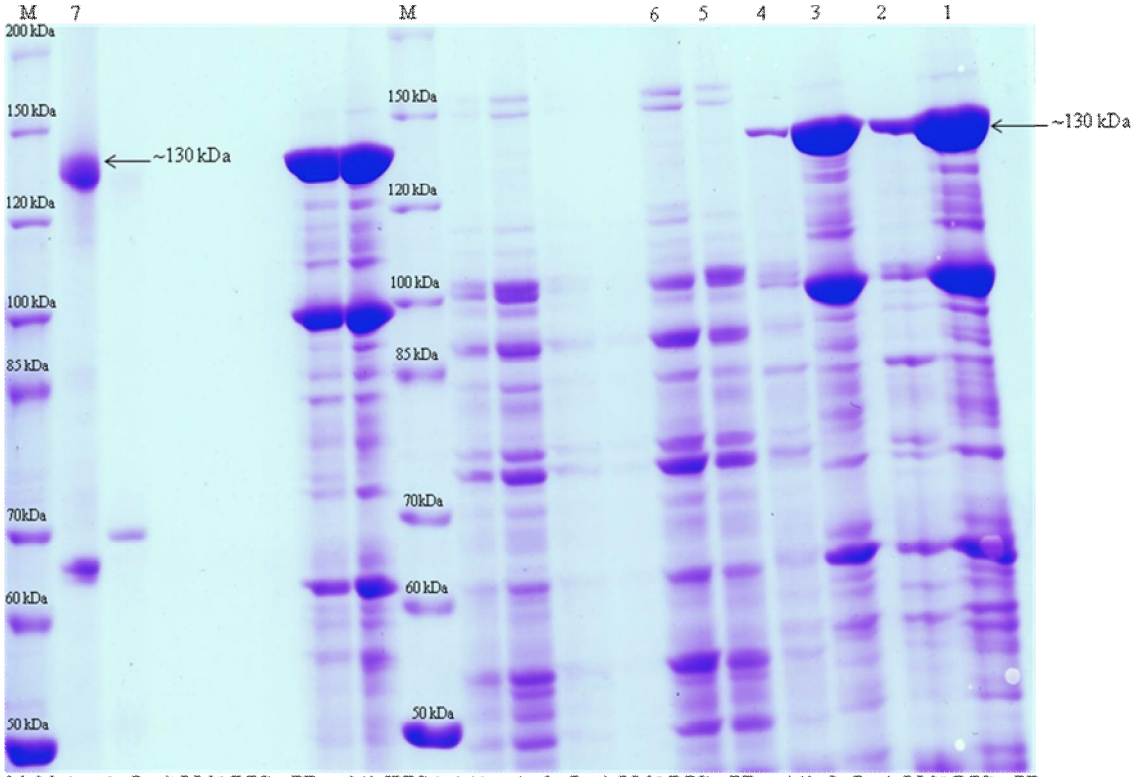


Şekil 3.19. IPTG ile indükleme sonrası protein konsantrasyonları



Şekil 3.20. Protein konsantrasyonunu belirlemede kullanılan standart eğri grafiği

IPTG ile yapılan indükleme sonucunda *E. coli* BL21 (DE3) pET-*cry1Ab* ünün yaklaşık 130 kDa büyüklüğünde *Bt* SY49-1 Cry1Ab proteini ile aynı büyüklükte bant verdiği tespit edilmiştir (şekil 3.21). Plazmit taşımayan *E. coli* BL21 (DE3)'ün ise bu proteini taşımadığı belirlenmiştir.



M, Marker, 1; *E.coli* BL21(DE3) pET-*cry1Ab* IPTG indüklenmiş, 2; *E.coli* BL21(DE3) pET-*cry1Ab*, 3; *E.coli* BL21(DE3) pET-*cry1Ab* IPTG indüklenmiş, 4; *E.coli* BL21(DE3) pET-*cry1Ab*, 5; *E.coli* BL21(DE3), 6; *E.coli* BL21(DE3) IPTG indüklenmiş, 7; *B. thuringiensis* SY49-1

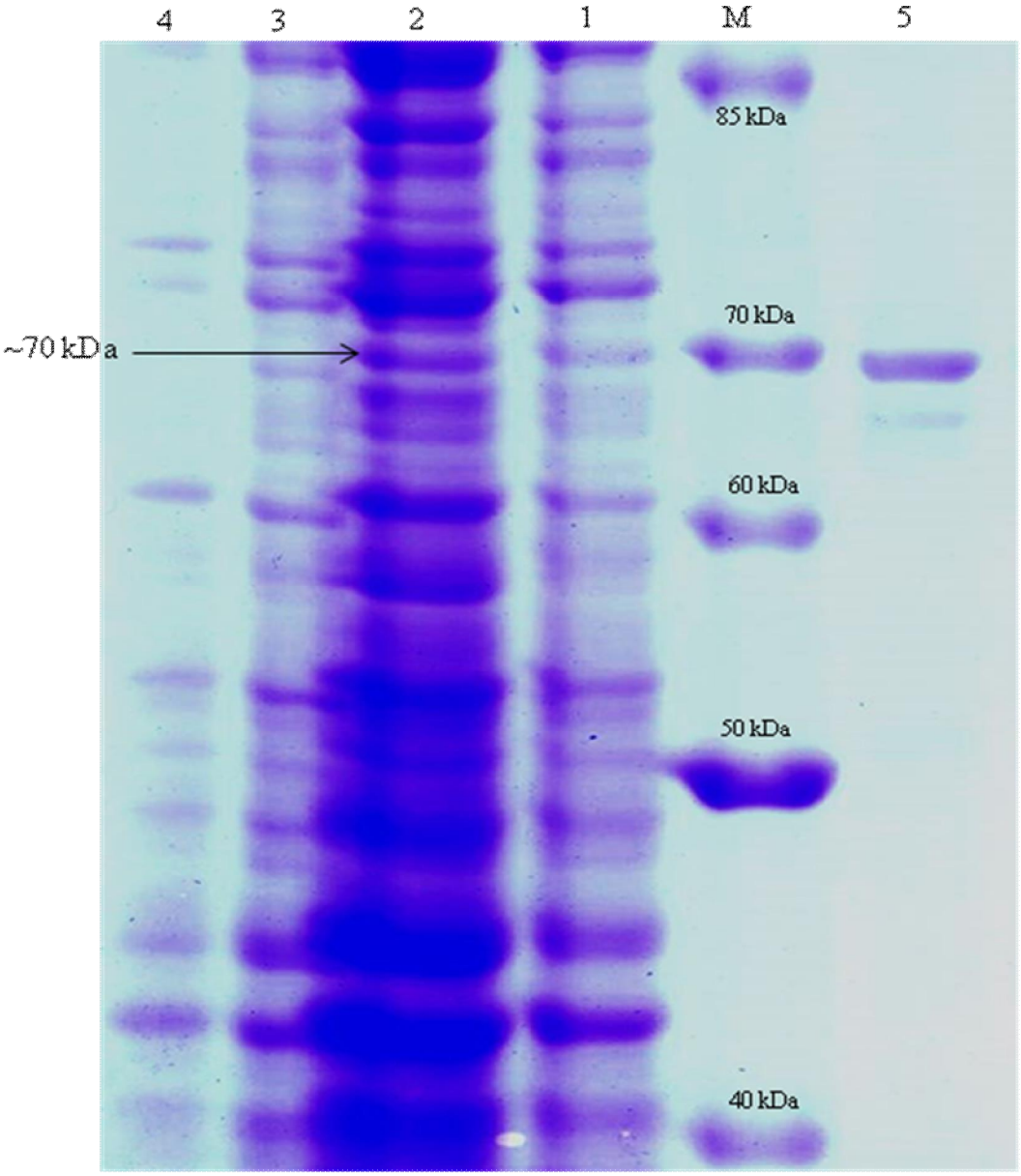
Şekil 3.21. IPTG ile indükleme sonrası Cry1Ab proteinin SDS-PAGE görüntüsü

3.19. Rekombinant Cry2 Proteinin Ekspresyonu ve SDS-PAGE Analizi

Rekombinant pET-*cry2* plazmiti taşıyan *E. coli* BL21 (DE3) pET-*cry2* kolonisinden alınarak 100 ml kanamisinli sıvı besi yerinde OD_{600}; 0.5-1 oluncaya kadar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besi yeri 50 ml olacak şekilde ikiye ayrılarak 50 ml'lik besi yerinin birtanesine son konsantarsyonu 1mM olacak şekilde IPTG eklenmiştir. Diğer 50 ml'lik besi yerine ise IPTG eklenmemiştir. IPTG eklemesinin ardından protein ifadesi için 4 saat boyunca koloniler inkübasyona bırakılmıştır. Aynı işlem plazmit taşımayan *E. coli* BL21 (DE3) bakterisi içinde yapılmıştır. Süre sonunda bakterilerden protein izolasyonu yapılarak Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonları belirlenmiştir. Bradford analizinde standart olarak BSA kullanılmıştır

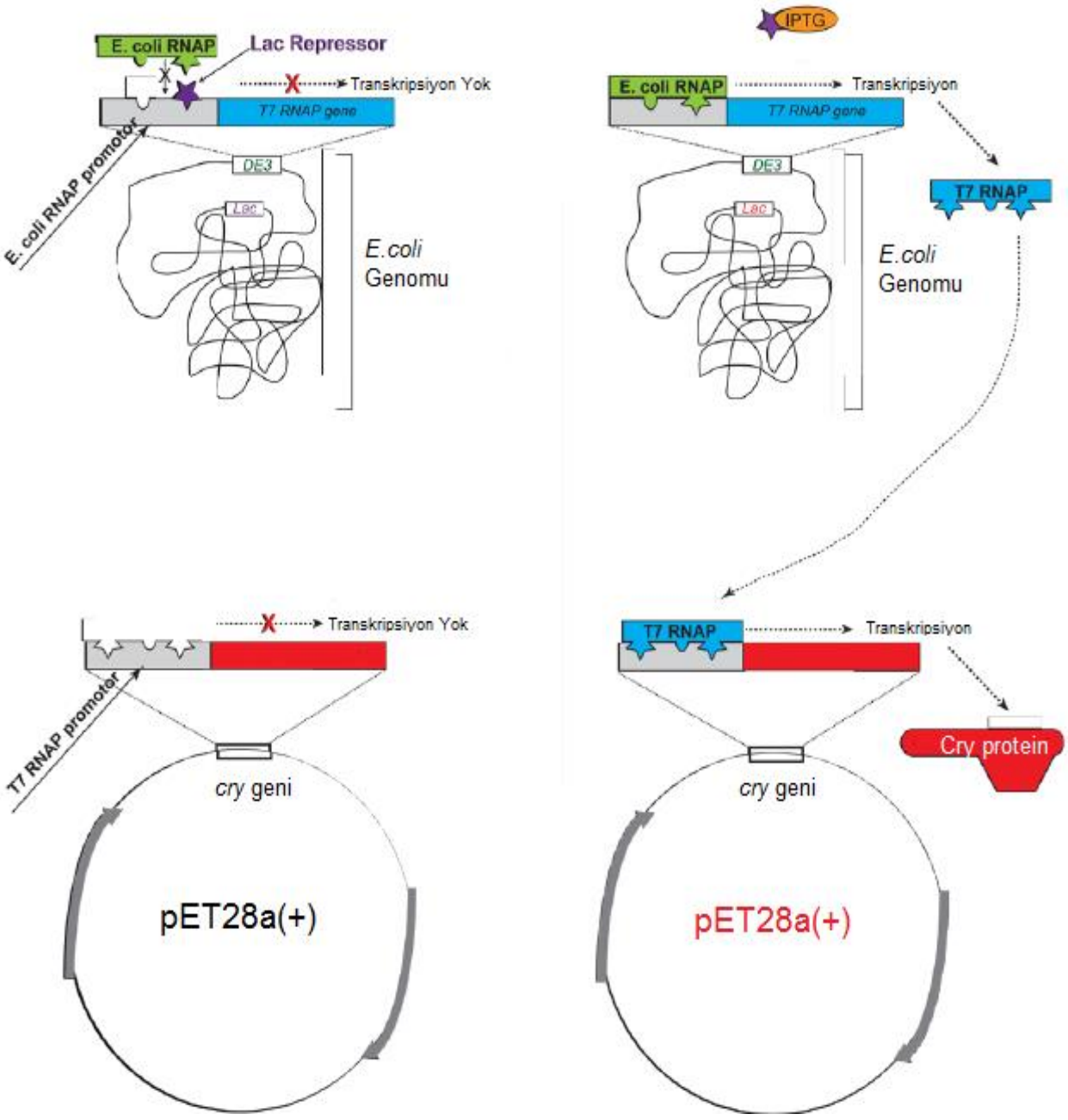
(şekil 3.19). IPTG ile indükleme sonrasē protein konsantrasyonlarē, *Bt* SY49-1 suşunda 63,7 µg/ml olarak belirlenmiştir. *E. coli* BL21 (DE3) pET-*cry2*âde ise 341,4 µg/ml olarak belirlenmiştir.

IPTG ile yapēlan indükleme sonucunda *E. coli* BL21 (DE3) pET-*cry2*ânin yaklaşēk 70kDa büyüklüğ ünde *Bt* SY49-1 Cry2 proteini ile aynē büyüklükte bant verdiğ i tespit edilmiştir (şekil.3.22). Plazmit taşēmayan *E. coli* BL21 (DE3)âün ise bu proteini taşēmadēğ ē belirlenmiştir.



M; Marker, 1; *E.coli* BL21(DE3) pET-*cry2*, 2;*E.coli* BL21(DE3) pET-*cry2* IPTG indüklenmiş, 3; *E.coli* BL21(DE3) IPTG indüklenmiş, 4; *E.coli* BL21(DE3) 5;*B. thuringiensis* SY49-1

şekil 3.22. IPTG ile indükleme sonrasē Cry2 proteinin SDS-PAGE görüntüsü



Şekil 3.23. *E. coli* BL21 (DE3)'de Cry proteinin IPTG ile indüklenmesinin şematik gösterimi (RNAP; RNA polimeraz enzimi).

3.20. *Ephestia kuehniella* Üzerinde Rekombinant Cry1Ab ve Cry2 Proteinlerinin İnsektisidal Aktivitesi

Rekombinant pET-*cry1Ab* ve pET-*cry2* plazmiti taşıyan bakterilerinden izole edilen total proteinlerin *E. kuehniella* larvaları üzerindeki insektisidal aktivitesi test edilmiştir. Toksik etkisinin araştırılması Obeidat'ın önerdiği metoda göre yapılmıştır [280]. Çalışmalar sonucunda kontrol suşu olarak kullanılan plazmitsiz *E. coli* BL21 (DE3)'ün,

Bt SY49-1'in, *E. coli* BL21 (DE3) pET-*cry1Ab* ve *E. coli* BL21 (DE3) pET-*cry2*'nin *E. kuehniella* larvaları üzerinde değişik oranlarda toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen öldürücü etkinin LD_{50} ve LD_{95} değerleri probit analiziyle hesaplanmıştır. Tablo 3.2'de LD_{50} ve LD_{95} değerleri gösterilmiştir.

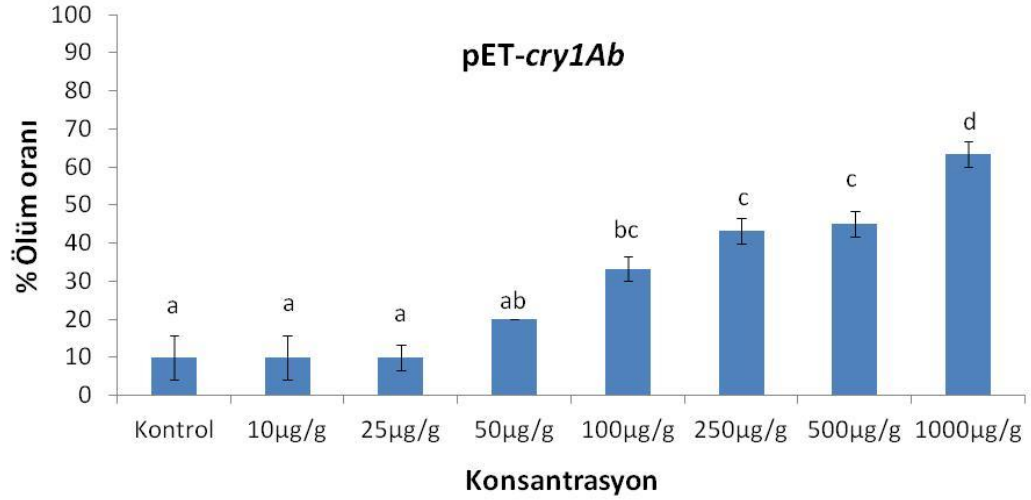
Tablo.3.2. Rekombinant Cry1Ab proteini ve *Bt* SY49-1'in *E. kuehniella* larvaları üzerindeki LD_{50} ve LD_{95} değerleri

Bakteri suşları	LD_{50}(µg\g)	LD_{95}(µg\g)
pET-*cry1Ab*	685.67	1839.69
pET-*cry2*	519.19	1944.06
pET-*cry1Ab*+pET-*cry2*	577.96	1716.55
Bt SY49-1	365.17	1119.69
E.coli BL21(DE3)	5334.35	11246.91

E. coli BL21 (DE3) pET-*cry1Ab*'nin LD_{50} değeri 519.19 µg\g, LD_{95} değeri 1839.69 µg\g olarak hesaplanmıştır. *Bt* SY49-1 için bu değerler ise LD_{50} 365.17 µg\g, LD_{95} değeri 1119.69 µg\g olarak hesaplanmıştır. *cry1Ab* geni taşımayan *E.coli* BL21(DE3) için LD_{50} 5334.35 µg\g, LD_{95} 11246.91 µg\g olarak hesaplanmıştır.

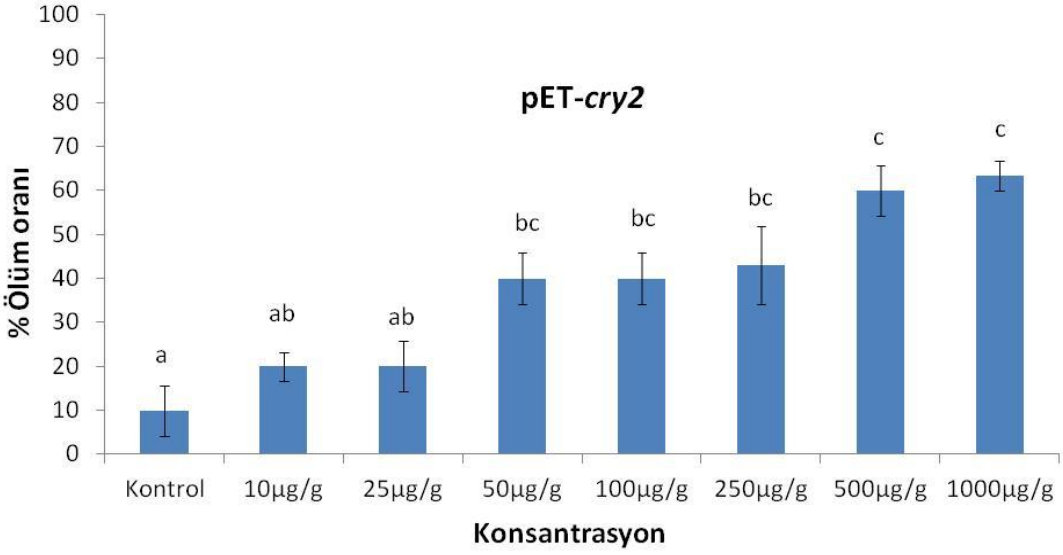
3.21. *Ephestia kuehniella* Üzerinde Rekombinant Cry1Ab ve Cry2 Proteinlerinin Sinerjistik Aktivitesi

Rekombinant pET-*cry1Ab* ve pET-*cry2* plazmiti taşıyan bakterilerinden izole edilen total proteinler eşit oranlarda karıştırıldıktan sonra *E. kuehniella* larvaları üzerinde üzerindeki sinerjistik insektisidal aktivitesi test edilmiştir. Toksik etkisinin araştırılması Obeidat'ın önerdiği metoda göre yapılmıştır [280]. Rekombinant Cry1Ab+Cry2 protein karışımı uygulamasında LD_{50} değeri 577.96 µg\g, LD_{95} değeri ise 1716.55 µg\g olarak hesaplanmıştır.



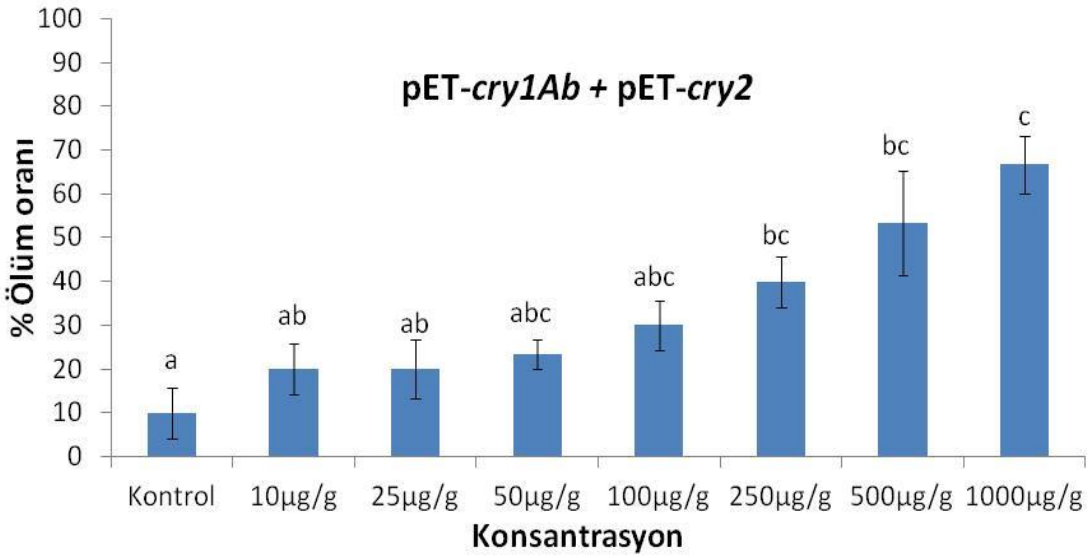
Şekil 3.24. Cry1Ab proteinin *E. kuehniella* larvaları üzerindeki % ölüm oranları

Rekombinant Cry1Ab proteinin *E. kuehniella* larvaları üzerindeki % ölüm oranları artan doza bağlı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile 10 µg\gdk doz uygulaması arasında istatistiksel olarak fark olmadığı belirlenmiştir. 50 µg\gdk doz uygulamasında % 20, 100 µg\gdk doz uygulamasında % 33, 250 µg\gdk doz uygulamasında % 44, 500 µg\gdk doz uygulamasında % 45 ve 1000 µg\gdk doz uygulamasında ise % 64 larva ölüm oranın olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.24).



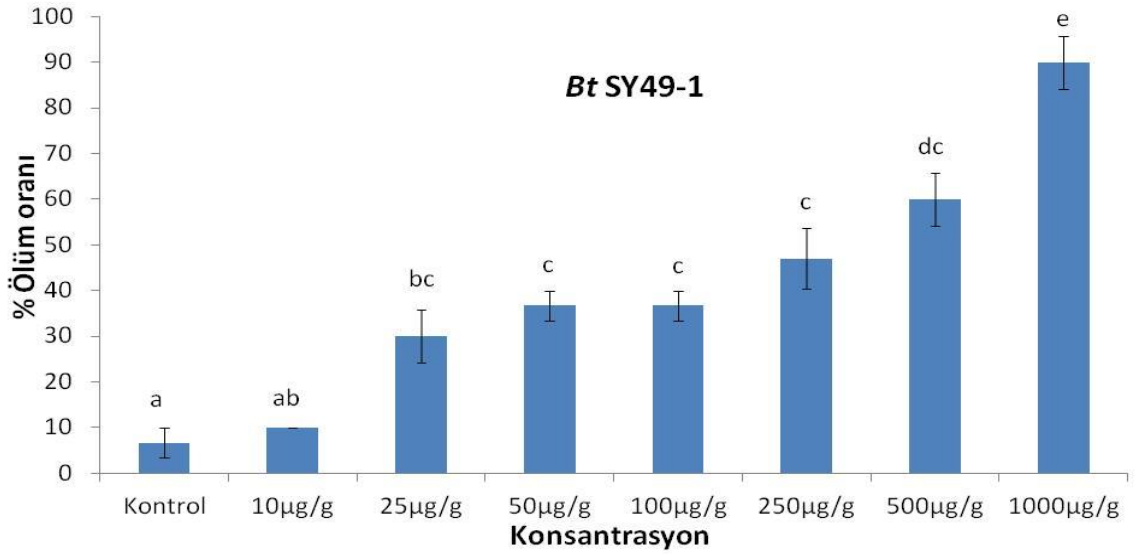
Şekil 3.25. Cry2 proteinin *E. kuehniella* larvaları üzerindeki % ölüm oranları

Rekombinant Cry2 proteinin *E. kuehniella* larvalarē üzerindeki % ölüm oranlarē artan doza baş lē olarak artēk gösterdiş i tespit edilmiktir. 10 µg\gdlēk doz uygulamasēnda % 20, 25 µg\gdlēk doz uygulamasēnda % 20, 50 µg\gdlēk doz uygulamasēnda % 40, 100 µg\gdlēk doz uygulamasēnda % 40, 250 µg\gdlēk doz uygulamasēnda % 43, 500 µg\gdlēk doz uygulamasēnda % 60 ve 1000 µg\gdlēk doz uygulamasēnda ise % 64 larva ölüm oranēn olduş u belirlenmiktir (ķekil 3.25).



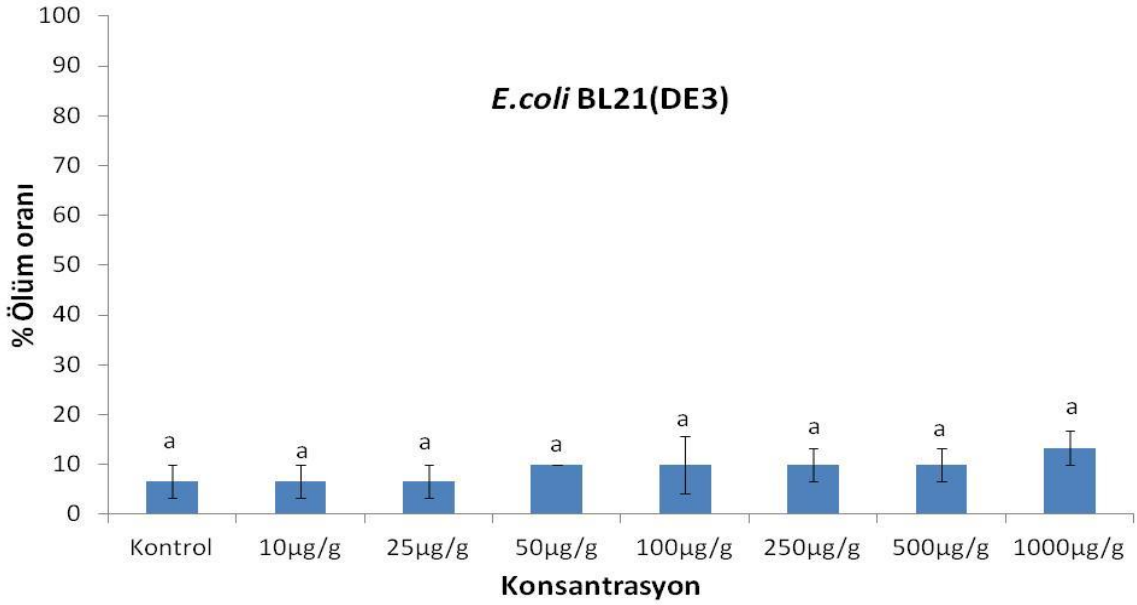
ķekil 3.26. Cry1Ab+Cry2 proteinin *E. kuehniella* larvalarē üzerindeki % ölüm oranlarē

Rekombinant Cry1Ab+Cry2 protein karēkēnē uygulamasēnda *E. kuehniella* larvalarē üzerindeki % ölüm oranlarē artan doza baş lē olarak sinerjistik etki gösterdiş i tespit edilmiktir. 250 µg\gdlēk doz uygulamasēnda % 40, 500 µg\gdlēk doz uygulamasēnda % 54 ve 1000 µg\gdlēk doz uygulamasēnda ise % 65 larva ölüm oranēn olduş u belirlenmiktir (ķekil 3.26).



Şekil 3.27. *Bt* SY49-1 suşunun spor-kristal karışımın *E. kuehniella* larvaları üzerindeki % ölüm oranları

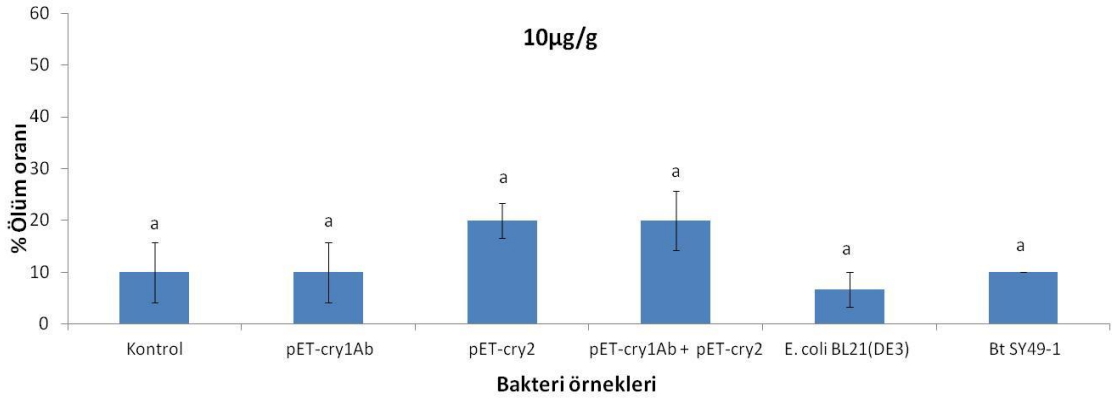
Bt SY49-1 suşunun spor-kristal karışımın *E. kuehniella* larvaları üzerindeki % ölüm oranları artan doza bağlı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir. 10 µg\gdük doz uygulamasında % 10, 25 µg\gdük doz uygulamasında % 30, 50 µg\gdük doz uygulamasında % 36, 100 µg\gdük doz uygulamasında % 36, 250 µg\gdük doz uygulamasında % 47, 500 µg\gdük doz uygulamasında % 60 ve 1000 µg\gdük doz uygulamasında ise % 90 larva ölüm oranın olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.27).



Şekil 3.28. *E. coli* BL21 (DE3)'ün *E. kuehniella* larvaları üzerindeki % ölüm oranları

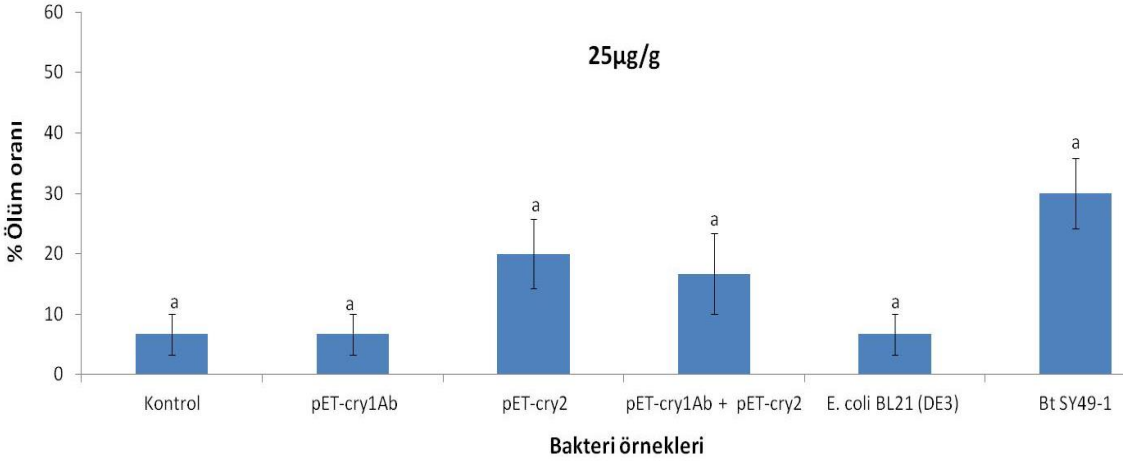
E. coli BL21 (DE3)'ün *E. kuehniella* larvaları üzerindeki % ölüm oranları kontrol grubu ile kıyaslandığında fark olmadığı gibi ayrıca uygulama dozları arasında da fark olmadığı belirlenmiştir (şekil 3. 28).

Uygulama dozlarının ölüm oranları karşılaştırılmasıhangi uygulama dozunda hangi grubun en etkili olduğunu belirlemek amacıyla yapılmıştır.



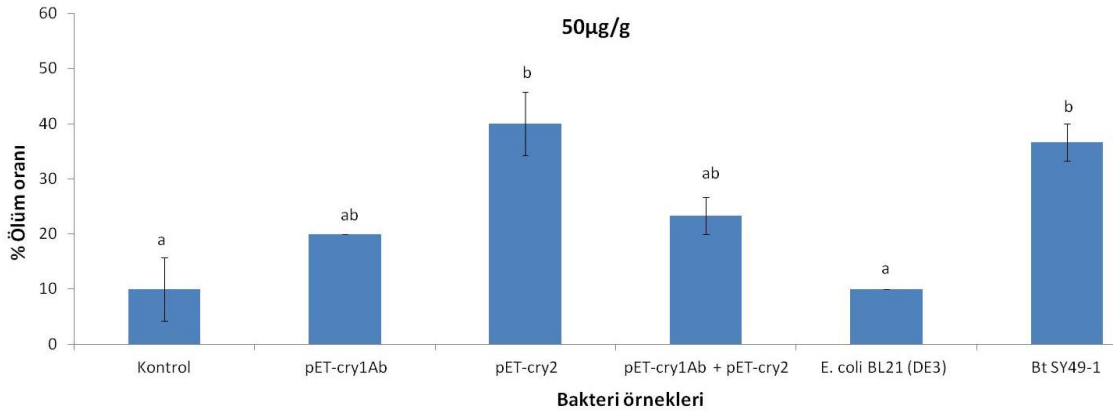
Şekil 3.29. *E. kuehniella* larvaları üzerindeki 10 µg\gıdık doz uygulamasının gruplar arası% ölüm oranları

10 µg\gıdık doz uygulamasında gruplar arasında istatistiksel olarak fark olmadığı ancak bu dozda en etkili gurbun *E. coli* BL21 (DE3) pET-*cry2* bakterisinden izole edilen rekombinant Cry2 proteinin olduğu belirlenmiştir. Cry2 proteini *E. kuehniella* larvaları üzerindeki 10 µg\gıdık doz uygulamasında % 20 larval ölüme sebep olduğu belirlenmiştir (şekil 3.29).



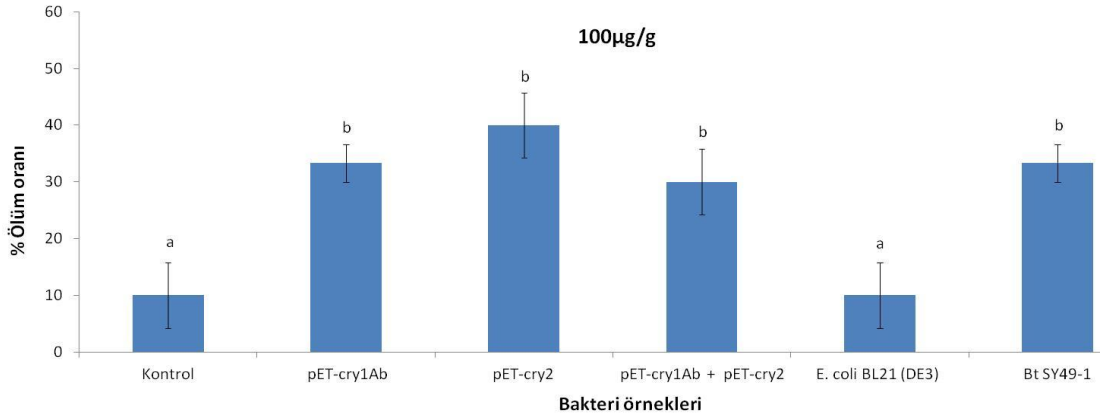
Şekil 3.30. *E. kuehniella* larvaları üzerindeki 25 µg\gıdık doz uygulamasının gruplar arası% ölüm oranları

25 µg\gdek doz uygulamasında gruplar arasında istatistiksel olarak fark olmadığı ancak bu dozda en etkili gurbun *Bt* SY49-1 suşundan izole edilen spor-kristal karışımının olduğu belirlenmiştir. Spor-kristal karışımının *E. kuehniella* larvaları üzerindeki 25 µg\gdek doz uygulamasında % 30 larval ölüme sebep olduğu belirlenmiştir (şekil 3.30). Rekombinant Cry2 proteini *E. kuehniella* larvaları üzerindeki 25 µg\gdek doz uygulamasıyle 10 µg\gdek doz uygulamasıarasında larval ölümü arasında fark bulunamamıştır.



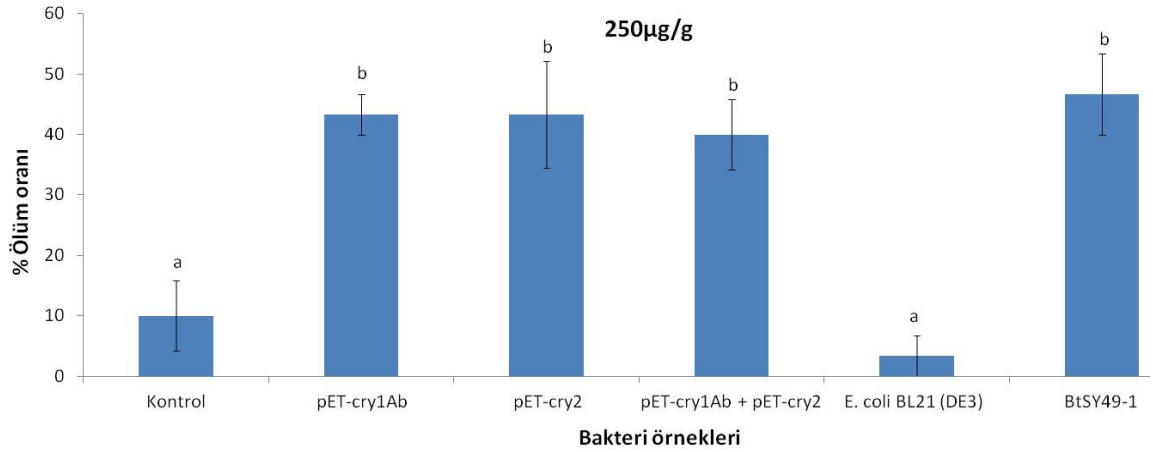
şekil 3.31. *E. kuehniella* larvaları üzerindeki 50 µg\gdek doz uygulamasının gruplar arası% ölüm oranları

50 µg\gdek doz uygulamasında kontrol grubu ve *E. coli* BL21 (DE3) arasında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir. Bu dozda en etkili gurbun *E. coli* BL21 (DE3) pET-*cry2* bakterisinden izole edilen rekombinant Cry2 proteinin olduğu belirlenmiştir. Rekombinant Cry2 proteinin *E. kuehniella* larvaları üzerindeki 50 µg\gdek doz uygulamasında % 40 larval ölüme sebep olduğu belirlenmiştir (şekil 3.31). *E. coli* BL21 (DE3)ünün *E. kuehniella* larvaları üzerindeki 50 µg\gdek doz uygulamasında ise % 10 larval ölüme sebep olduğu belirlenmiştir.



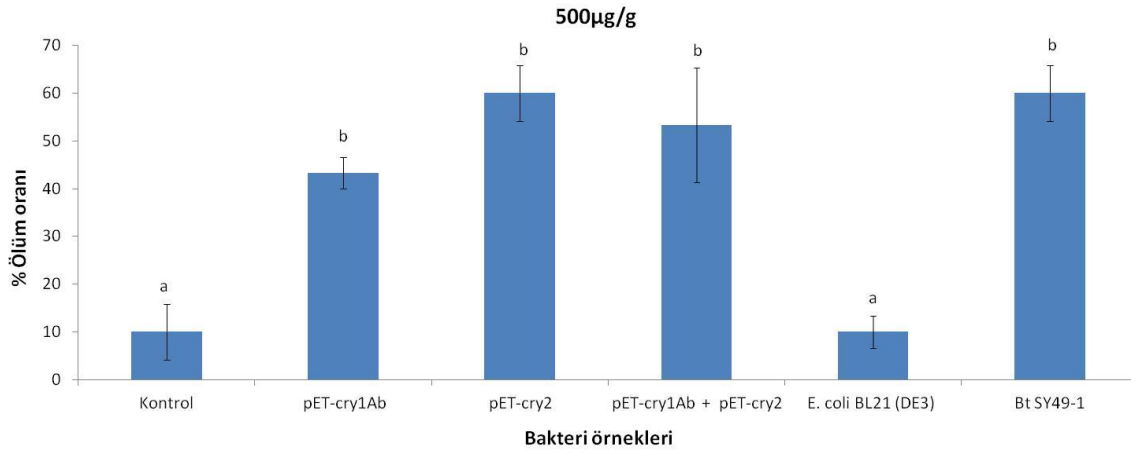
şekil 3.32. *E. kuehniella* larvaları üzerindeki 100 µg\gdek doz uygulamasının gruplar arası% ölüm oranları

100 µg\gðlık doz uygulamasında kontrol grubu ve *E. coli* BL21 (DE3) arasında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir. Bu dozda en etkili gurbun *E. coli* BL21 (DE3) pET-*cry2* bakterisinden izole edilen rekombinant Cry2 proteinin olduğu belirlenmiştir. Rekombinant Cry2 proteinin *E. kuehniella* larvaları üzerindeki 100 µg\gðlık doz uygulamasında % 40 larval ölüme sebep olduğu belirlenmiştir (şekil 3.32). *E. coli* BL21 (DE3)'ün *E. kuehniella* larvaları üzerindeki 100 µg\gðlık doz uygulamasında ise % 10 larval ölüme sebep olduğu belirlenmiştir.



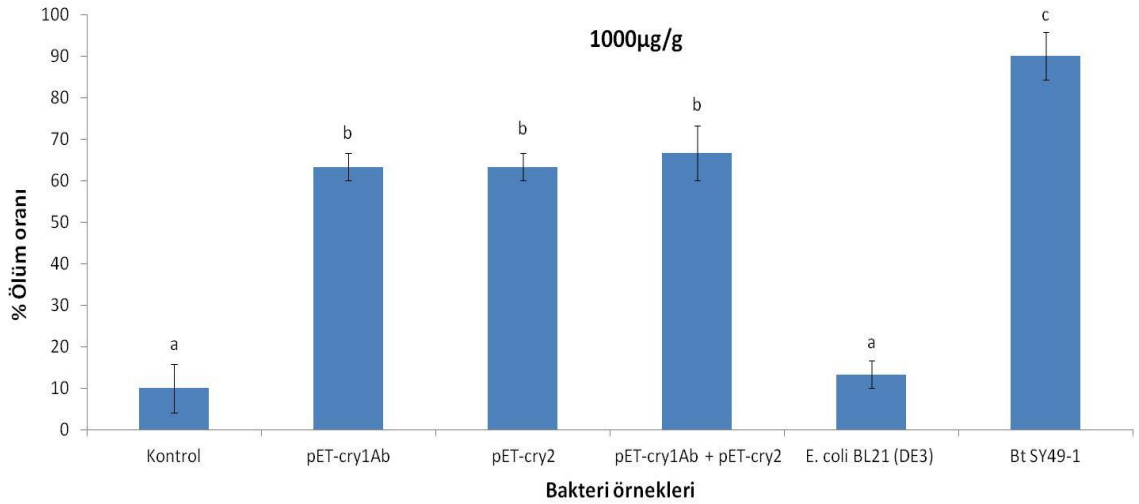
şekil 3.33. *E. kuehniella* larvaları üzerindeki 250 µg\gðlık doz uygulamasının gruplar arası % ölüm oranları

250 µg\gðlık doz uygulamasında kontrol grubu ve *E. coli* BL21 (DE3) arasında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir. *E. coli* BL21 (DE3) pET-*cry2* bakterisinden izole edilen rekombinant Cry2 proteinin, *E. coli* BL21 (DE3) pET-*cry1Ab* bakterisinden izole edilen rekombinant Cry1Ab proteinin, Cry1Ab+Cry2 protein karışımının ve *Bt* SY49-1 suşunun aynı oranda larval ölüme neden olduğu belirlenmiştir



şekil 3.34. *E. kuehniella* larvaları üzerindeki 500 µg\gðlık doz uygulamasının gruplar arası % ölüm oranları

500 µg\gdlık doz uygulamasında kontrol grubu ve *E. coli* BL21 (DE3) arasında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir. *E. coli* BL21 (DE3) pET-*cry2* bakterisinden izole edilen rekombinant Cry2 proteinin, *E. coli* BL21 (DE3) pET-*cry1Ab* bakterisinden izole edilen rekombinant Cry1Ab proteinin ve Cry1Ab+Cry2 protein karışımının aynı oranda larval ölüme neden olduğu belirlenmiştir. *Bt* SY49-1 suşunun ise *E. kuehniella* larvaları üzerindeki 500 µg\gdlık doz uygulamasında % 60 larval ölüme sebep olduğu belirlenmiştir (şekil 3.34).



Şekil 3.35. *E. kuehniella* larvaları üzerindeki 1000 µg\gdlık doz uygulamasının gruplar arası % ölüm oranları

1000 µg\gdlık doz uygulamasında kontrol grubu ve *E. coli* BL21 (DE3) arasında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir. *E. coli* BL21 (DE3) pET-*cry2* bakterisinden izole edilen rekombinant Cry2 proteinin, *E. coli* BL21 (DE3) pET-*cry1Ab* bakterisinden izole edilen rekombinant Cry1Ab proteinin ve Cry1Ab+Cry2 protein karışımının aynı oranda larval ölüme neden olduğu belirlenmiştir. *Bt* SY49-1 suşunun ise *E. kuehniella* larvaları üzerindeki 1000 µg\gdlık doz uygulamasında % 90 larval ölüme sebep olduğu belirlenmiştir (şekil 3.35).

3.22. *Culex pipiens* Üzerinde Rekombinant Cry2 Proteini ve *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşunun Spor-Kristal Protein Karışımının Insektisidal Aktivitesi

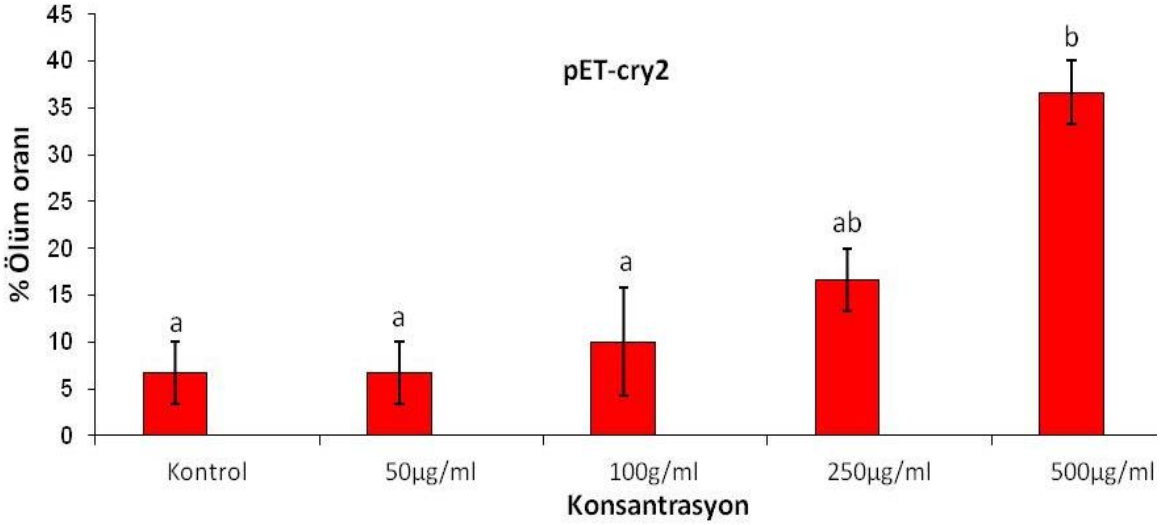
E. coli BL21 (DE3) pET-*cry2* bakterilerinden izole edilen total proteinlerin *C. pipiens* larvaları üzerinde üzerindeki insektisidal aktivitesi test edilmiştir. Çalışmalar sonucunda kontrol suşu olarak kullanılan plazmitsiz *E. coli* BL21 (DE3)'ün, *Bt* SY49-1'in ve *E.*

coli BL21 (DE3) pET-*cry2*ûnin *C. pipiens* larvalarē üzerinde deĵ ikik oranlarda toksik etki gösterdiĵ i tespit edilmikdir. Elde edilen öldürücü etkinin LD_{50} ve LD_{95} deĵ erleri probit analiziyle hesaplanmākdā. Tablo 3.3ûde LD_{50} ve LD_{95} deĵ erleri gösterilmikdir.

Tablo.3.3. Rekombinant Cry2 proteini ve *Bt* SY49-1ûin *C. pipiens* larvalarē üzerindeki LD_{50} ve LD_{95} deĵ erleri

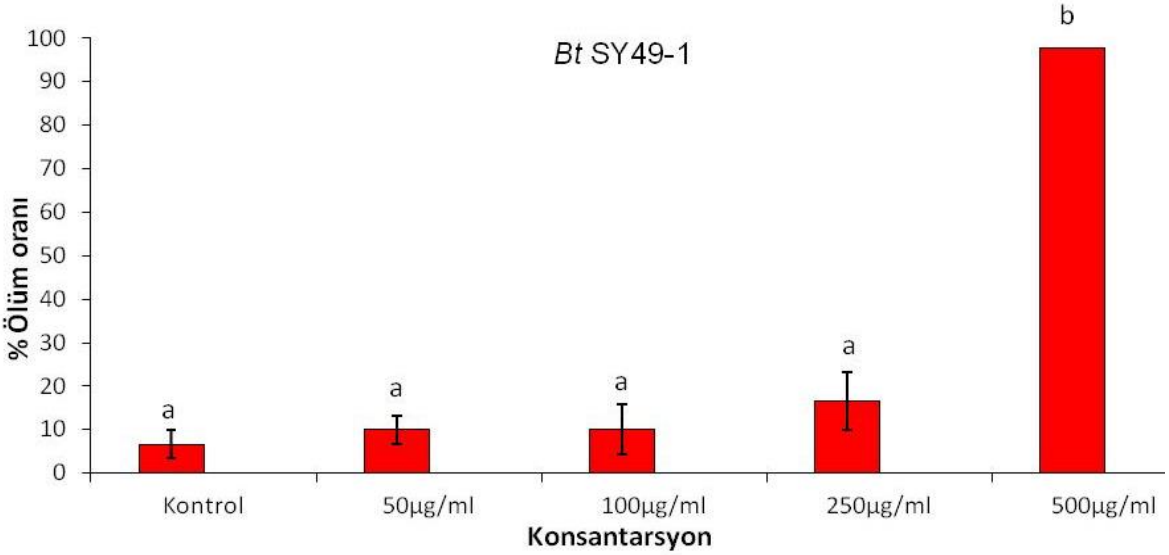
Bakteri sukları	LD_{50}(µg\ml)	LD_{95}(µg\ml)
pET-*cry2*	630.093	1310.363
Bt SY49-1	295.520	534.743
E.coli BL21(DE3)	957.280	1939.130

E. coli BL21 (DE3) pET-*cry2*ûnin LD_{50} deĵ eri 630.093 µg\ml, LD_{95} deĵ eri 1310.363 µg\ml olarak hesaplanmākdā. *Bt* SY49-1 için bu deĵ erler ise LD_{50} 295.520 µg\ml, LD_{95} deĵ eri 534.743 µg\ml olarak hesaplanmākdā. *cry2* geni takēmayan *E.coli* BL21(DE3) için ise 957.280 µg\ml, LD_{95} 1939.130 µg\ml olarak hesaplanmākdā.



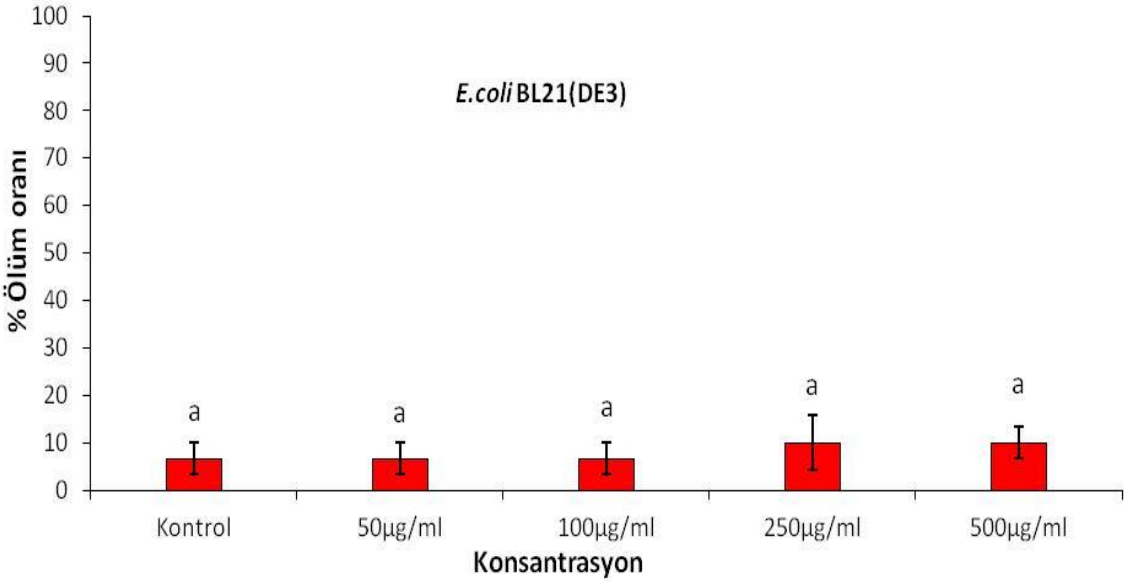
ķekil 3.36. Cry2 proteinin *C.pipiens* larvalarēüzerindeki % ölüm oranlarē

Rekombinant Cry2 proteinin *C.pipiens* larvalarēüzerindeki % ölüm oranlarē artan doza baĵ lē olarak artēk gösterdiĵ i tespit edilmikdir. 50 µg\mlûlik doz uygulamasēnda % 7, 100 µg\mlûlik doz uygulamasēnda % 10, 250 µg\mlûlik doz uygulamasēnda % 17, 500 µg\mlûlik doz uygulamasēnda ise % 37 larva ölüm oranēn olduĵ u belirlenmikdir (ķekil 3.36).



Şekil 3.37. *Bt* SY49-1 suşunun spor-kristal karışımın *C.pipiens* larvaları üzerindeki % ölüm oranları

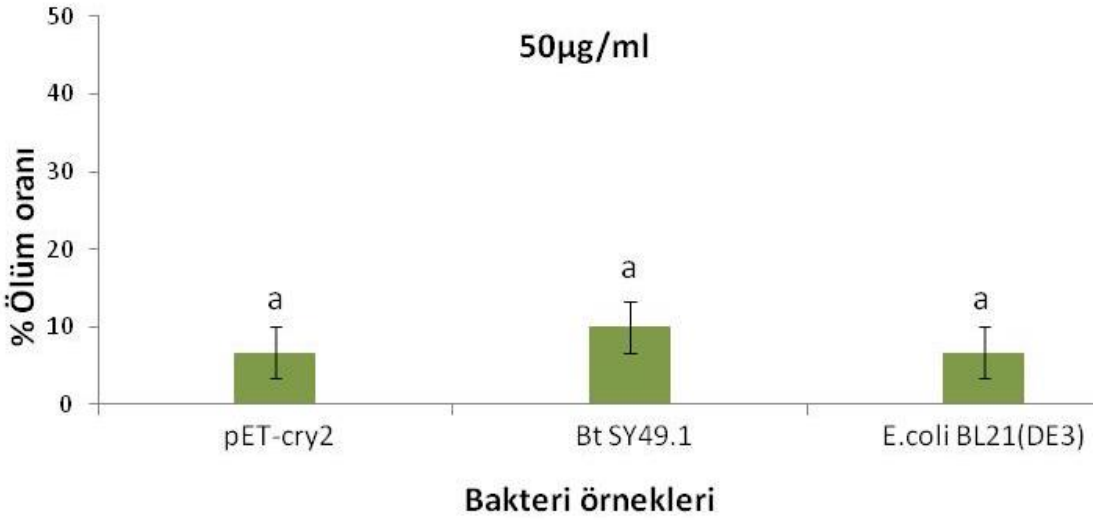
Bt SY49-1 suşunun spor-kristal karışımın *C.pipiens* larvaları üzerindeki % ölüm oranlarında 50 µg\ml, 100 µg\ml ve 250 µg\ml'lik doz uygulamaları arasında fark olmadığı tespit edilmiştir. Ancak 500 µg\ml'lik doz uygulamasında % 97 larva ölüm oranın olduğu belirlenmiştir (şekil 3.37).



Şekil 3.38. *E. coli* BL21 (DE3)'ün *C.pipiens* larvaları üzerindeki % ölüm oranları

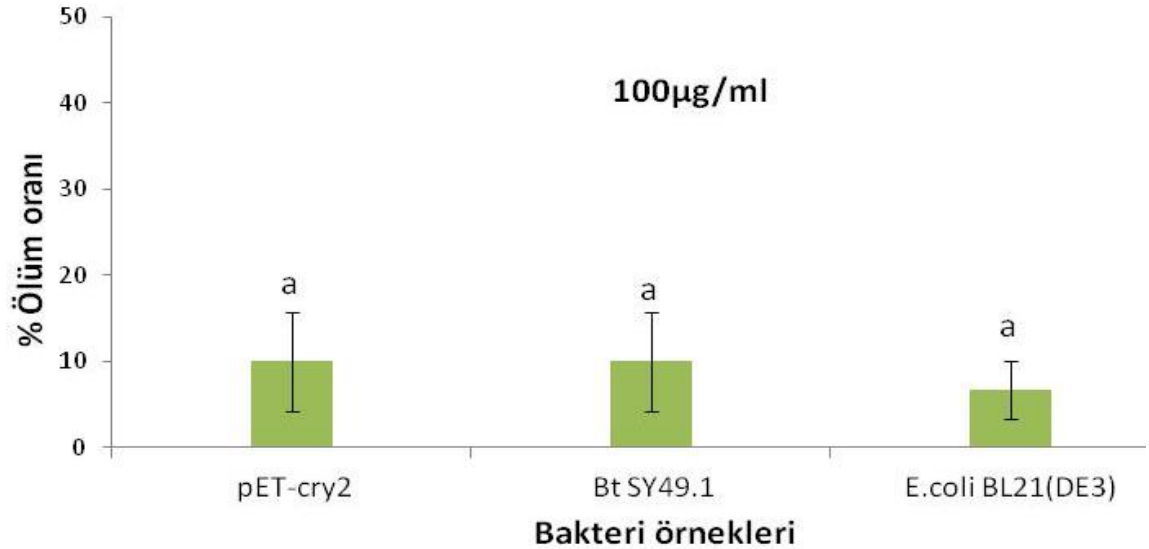
E. coli BL21 (DE3)'ün *C. pipiens* larvaları üzerindeki % ölüm oranları kontrol grubu ile kıyaslandığında fark olmadığı ayrıca uygulama dozları arasında da fark olmadığı belirlenmiştir (şekil 3. 38).

Uygulama dozlarının ölüm oranlarıkarşılaştırılmasıhangi uygulama dozunda hangi grubun en etkili olduğunu belirlemek amacıyla yapılmıştır.



Şekil 3.39. *C. pipiens* larvalarıüzerindeki 50 µg\mldeki doz uygulamasının gruplar arası % ölüm oranları

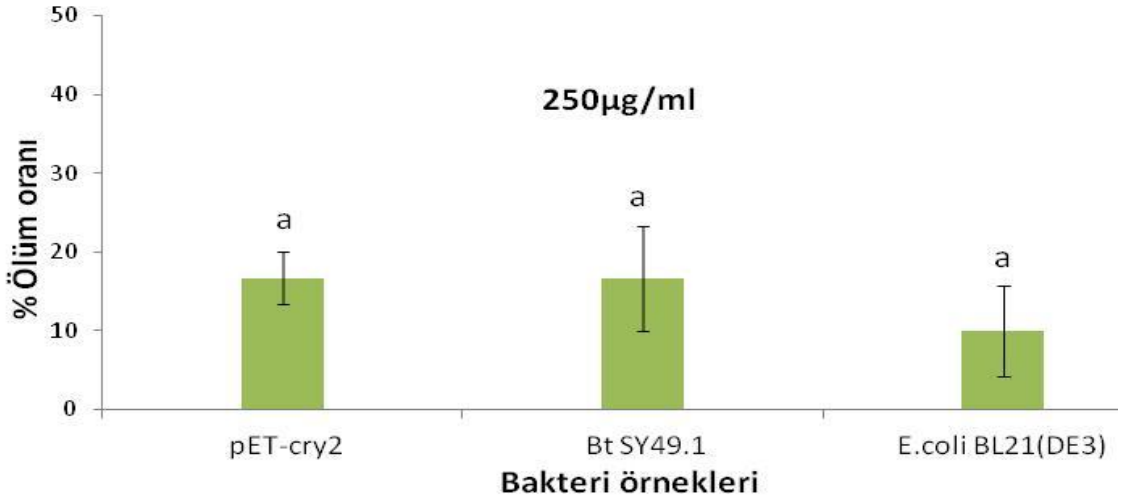
50 µg\mldeki doz uygulamasında kontrol grubu ve *E. coli* BL21 (DE3) arasında istatistiksel olarak gruplar arasında fark olmadığı tespit edilmiştir (şekil 3.39).



Şekil 3.40. *C. pipiens* larvalarıüzerindeki 100 µg\mldeki doz uygulamasının gruplar arası% ölüm oranları

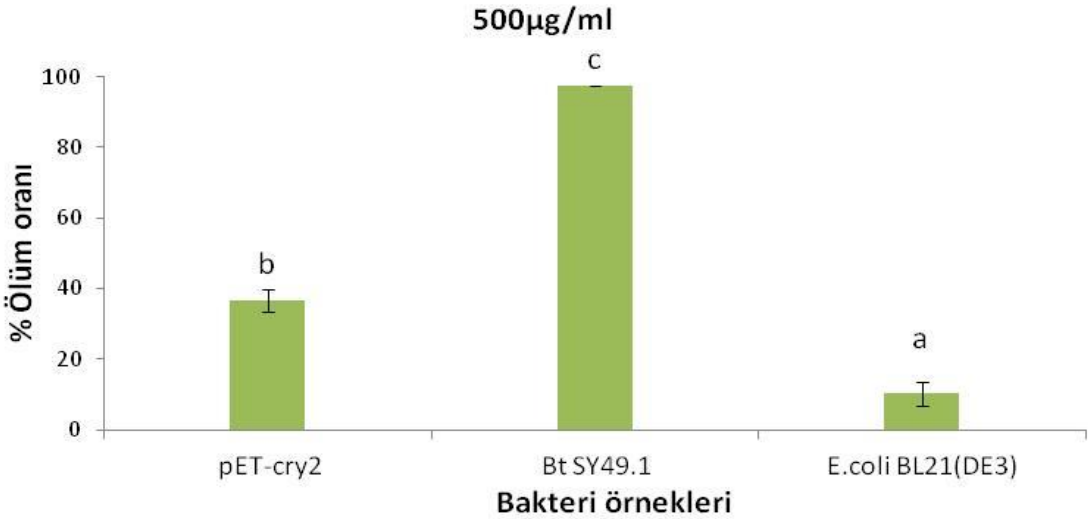
100 µg\mldeki doz uygulamasında kontrol grubu ve *E. coli* BL21 (DE3) arasında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir. Bu dozda en etkili gurbun *E. coli*

BL21 (DE3) pET-*cry2* bakterisinden izole edilen rekombinant Cry2 proteinin olduğu belirlenmiştir (şekil 3.40).



Şekil 3.41. *C. pipiens* larvalarē üzerindeki 250 µg\mlôlīk doz uygulamasēnēn gruplar arasē% ölüm oranlarē

250 µg\mlôlik doz uygulamasēnda gruplar arasēnda istatistiksel olarak fark olmadığē tespit edilmiştir (şekil 3.41).



Şekil 3.42. *C. pipiens* larvalarē üzerindeki 500 µg\mlôlik doz uygulamasēnēn gruplar arasē% ölüm oranlarē

500 µg\mlôlik doz uygulamasēnda *E. coli* BL21 (DE3) pET-*cry2* bakterisinden izole edilen rekombinant Cry2 proteinin % 37 larval ölüme sebep olduğu belirlenmiştir. *Bt* SY49-1 suşunun ise *C. pipiens* larvalarē üzerindeki 500 µg\mlôlik doz uygulamasēnda % 97 larval ölüme sebep olduğu belirlenmiştir (şekil 3.42).

4. BÖLÜM

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma *Bacillus thuringiensis* SY49-1'in *cry1Ab* ve *cry2* genlerinin *E. coli* BL21(DE3)'ye klonlanması ve ifadesiyle elde edilen rekombinant Cry1Ab ve Cry2 proteinlerinin *E. kuehniella* ve *C. pipiens* zararlılarına bireysel ve birlikte uygulanması, yerel kaynaklı bir suş kullanılması ve bu yerel ırkın biyo inseksitisit olarak kullanılabilme-üretilebilme potansiyelinin araştırılması bakımından özgün değer taşımaktadır.

Bt SY 49-1 suşundaki *cry1Ab* geni NCBI'da bilinen *cry1Ab* genlerine göre düzenlenmiş olan primer çiftleriyle çoğaltılmış ve Stobdan *et al.*, [279]'ün yaptığı çalışmada olduğu gibi yaklaşık 3,5 kb büyüklüğünde bant elde edilmiştir. *cry1Ab* geni agaroz jelden izole edildikten sonra temizlenerek klonlama vektörü pGEMT-Easy'e aktarılmıştır. Klonların doğrulanması amacıyla pozitif klonlardan izole edilen 6.5 kb boyutundaki pGEMT-*cry1Ab* plazmiti *Eco*RI ile kesilip agaroz jelde yürütüldüğünde, *cry1Ab* ve pGEM-T'nin bilinen boyutları olan 3.5 ve 3 kb büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir. Benzer şekilde *Bt* SY49-1 suşundaki *cry2* geni NCBI da bilinen *cry2Aa* genlerine göre düzenlenmiş olan primer çiftleriyle çoğaltılmıştır. Mısra *et al.*, [280]'nın yaptığı çalışmada olduğu gibi yaklaşık 1.9 kb büyüklüğünde bant elde edilmiştir. *cry2* geni pGEMT-Easy vektörüne aktarılmış olup klonların doğrulanması amacıyla *Eco*RI ile kesilip agaroz jelde yürütüldüğünde pGEMT-*cry2*, *cry2*, pGEM-T'nin bilinen boyutları olan 4.9, 1.9 ve 3 kb büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir.

pET28a(+) ifade vektörüne aktarılan genlerin ürünleri IPTG ile indüklenmiş *E. coli* kültürlerinden saflaştırılarak % 10'luk SDS-PAGE'de yürütülmüş ve plazmit taşımayan kültürlere göre yüksek oranda Cry1 ve Cry2 proteini üretildiği görülmüştür.

Mısra *et al*., [280]'in belirttiği gibi protein boyutlarının (130 kDa ve 70 kDa) gen boyutlarıyla (3.5 kb ve 1.9 kb) uyumlu olduğu görülmüştür. IPTG ile indüklenmiş pET-*cry1Ab* ve pET-*cry2* taşıyan BL21(DE3) kültüründen elde edilen rekombinat Cry1Ab proteini *E. kuehniella* (Lepidoptera) larvalarına ve Cry2 proteini ise hem *E. kuehniella* (Lepidoptera) ve hem de *C. pipiens* (Diptera) larvalarına uygulanmıştır. Rekombinant Cry1Ab proteinin 1 mg (1000 µg)'lık dozu *E. kuehniella* larvalarının % 64'ünü öldürmüşken, larvaların % 95'ini öldürmek için yaklaşık 1.9 mg'lık doz gerekmiştir. Rekombinant Cry2 proteini ile yaptığımız çalışmalarda 1.9 mg'lık dozu (LD_{95}) *E. kuehniella* larvalarının tamamına yakınını öldürmüştür. Mısra *et al*., [280] rekombinant Cry2A proteinin 2,5 mg dozunun *Spodoptera litura* (Lepidoptera) ve *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera) larvalarında % 90 'dan fazla ölüme neden olduğunu fakat *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera) larvaları üzerinde etki göstermediğini belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar 5 mg'lık dozun ise *H. armigera* larvalarını çok az etkilediğini belirtmişlerdir. Görüldüğü gibi Cry2 proteinin Lepidoptera zararlılarına karşı etkili olduğu fakat bazı Lepidoptera zararlılarının bu proteinden aynı düzeyde etkilenmediği görülmektedir.

Aynı zamanda Mısra *et al*., [280] rekombinant Cry2A proteinin 100 µg/ml dozunun *Aedes aegypti* (Diptera) larvalarının tamamını öldürdüğünü belirtmiştir. Oysa bizim çalışmamızda elde edilen rekombinant Cry2 proteinin 500 µg/ml'lik dozu bir başka Dipter olan *C. pipiens* larvalarında ancak % 37 oranında etkili olmuştur.

Reddy *et al*., [281] Cry1Ab proteinin *H. armigera* (2.32 µg toksin/cm^2 besin)'ya ve Kandibane *et al*., [282] ise *H. armigera*, *Achaea janata ve S. litura* larvalarına karşı etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Bir başka çalışmada Widner ve Whitiley [283] *Bt kurstaki* rekombinant Cry2A proteinin hem Lepidoptera hem de Diptera larvalarına etkili olduğunu fakat rekombinant Cry2B'nin sadece Lepidoptera larvalarını etkilediğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde yaptığımız çalışmada da rekombinant Cry2 proteinin her iki takıma ait larvalar üzerinde insektisidal etki gösterdiği belirlenmiştir. Mısra *et al*., [280]'da rekombinant Cry2A proteinin *S. litura* ve *P. operculella* gibi Lepidopter zararlılarıyla Dipter larvalarından olan *C. fatigans, A. stephensi* ve *A. eagypti* 'ye karşı etkili olduğunu ifade etmiştir.

Cheng *et al*., [284] *E. coli*'de ifade edilen rekombinant Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C ve Cry1Da proteinlerinin LC_{99} değerlerini sırasıyla 640, 1700, 1400 ve 1500 µg/ml olarak

belirlemiştir, Cry1Ab proteinin 3. dönem *P. xylostella* (Lepidoptera) larvalarında % 94, 2. dönem *Trichoplusia ni* (Lepidoptera) larvalarında % 96 oranında ölüme neden olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmamız ile karşılaştırıldığında *E. kuehniella* üzerinde rekombinant Cry1Ab proteini LD_{95} (1839 µg/g) değeri Cheng *et al.*, [284]'ün bulduğu LC_{99} (1700 µg/ml) değeri ile yakın bulunmuştur. Cry2 proteinin ise *C. pipiens* 1. Dönem larvaları üzerinde 1310 µg/ml (1.310 mg) Cry2 protein uygulamasının yeterli olduğu belirlenmiştir.

Saleem *et al.*, [285]'ün Pakistan'dan izole ettikleri 56 yerel izolatın 11'inin *cry2* geni taşıdığını belirlemişlerdir. Kullanılan CMBL *Bt*1 suşunun *cry1*, *cry2Aa*, *cry2Ab*, *cry2Ac* ve *cry4* genini taşıdığını belirlemişlerdir. Yıldırmaz [270] yerel suşumuz olan *Bt* SY49-1'in *cry1Ab* (bu çalışmada) *cry1C, cry1Aa/Ad, cry1B, cry2* (bu çalışmada) *cry5, cry9A, cry9C* genlerini taşıdığını belirtmiştir. CMBL *Bt*1 suşunun *H. armigera*, *Musca domestica* (Diptera) larvaları üzerinde spor (%10)-kristal protein karışımının LC_{50} değerini sırasıyla 327 µg/ml ve 692 µg/ml olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda ise *E. kuehniella* ve *C. pipiens* larvaları üzerinde *Bt* SY49-1 için spor-kristal protein karışımının LC_{50} değerleri sırasıyla 365.17 µg/g, 295.520 µg/ml olarak belirlenmiştir. Her iki çalışma karşılaştırıldığında CMBL *Bt*1 suşunun Lepidoptera zararlısında daha etkili olduğu ancak Diptera takımına ait zararlı üzerinde ise yerel suşumuzun daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Zhang *et al.*, [286] izole ettikleri *Bt* BJJX suşunun PCR-RFLP ile 3.5 kb büyüklüğünde *cry8Ab1* geni taşıdığını belirlemiştir. *cry8Ab1* genini klonlama vektörüyle birleştirerek 6.5 kb büyüklüğünde rekombinant pBlue-*cry8* vektörü elde etmişlerdir. Aktarım işleminde sonra sonrasında rekombinant pBlue-*cry8* plazmitini izole ederek *BamHI* ve *SalI* enzimleriyle kesilerek gen çıkarılmış ve ifade vektörü olan pSXY aktarılmıştır. 10.8 kb büyüklüğünde rekombinant pSXY-*cry8* plazmitini *E. coli* SCS110 ve kristal üretmeyen *Bt* $HD73^-$ suşuna elektroporasyonla aktarmışlardır. SDS-PAGE analizi ile gen büyüklüğüyle uyumlu 133 kDa büyüklüğünde rekombinant Cry8Ab1 proteinin varlığını belirlemişlerdir. HD73-cry8Ab1 pozitif klonu sporlanana kadar 72 saat kültüre inkübe edilmiştir. Cry8Ab1'in morfolojisi elektron mikroskobu ile incelendiğinde yabanıl suş olan *Bt* BJJX'in ürettiği proteine benzer yuvarlak şekilli parasporal protein üretildiği görmüşlerdir. Mutant $HD73^-$ 'ün ise kristal protein üretmediği belirlenmiştir.

Cry8Ab1'in SDS-PAGE analizi sonucunda beklenen boyutta (130kDa) protein bandının varlığını belirlemişlerdir. HD73-'de ise böyle bir bant gözlenmemiştir. Rekombinant Cry8Ab1 proteini 3 günlük *Holotrichia oblita* (Coleoptera) ve *Holotrichia parallela* (Coleoptera) larvalarına uygulandığında LC_{50} değerleri sırasıyla 5.72 µg toksin /g toprak ve 2 µg toksin /g toprak olarak hesaplanmıştır. Bezer şekilde *Bt* BJJX suşunun 3 günlük *H. oblita* ve *H. parallela* larvalarında sırasıyla 1.72 µg toksin /g toprak ve 0.96 µg toksin /g toprak LC_{50} değerleri elde edilmiştir. Bunun aksine HD73- 'nin bu larvalar üzerinde herhangi bir toksik etkisi görülmemiştir. *Bt* BJJX'in Cry8Ab1 proteini Coleoptera larvaları *T. molitor* ve Lepidoptera larvaları olan *H. armigera, S. exigua, M. separata* 'da 500 µg toksin/g besin dozunda toksisite göstermediği belirlenmiştir.

Bt'nin ürettiği farklı ICP'ler çok çeşitli zararlı grubu üzerinde insektisidal aktivite gösterir [15]. Bu nedenle *cry* genlerinin türünün belirlenmesi kodladıkları ICP'nin insektisidal etkisi veya özgüllüğü tahminin de faydalı olabilir [287,288]. Zhang *et al*., [286] öncelikle *Bt* BJJX suşunun *cry8Ab1* geni taşıdığını göstererek kristalsiz HD73- klonlayarak ifade ettirmişlerdir. Bilinen *cry8* genleri scarabeid larvalarında spesifik toksisite aktivite gösterdiği önceki çalışmalarla gösterilmiştir [289,290]. Zhang *et al*., [285] Çin'de en yaygın görülen scarabeid zararlısı *H. oblita* ve *H. parallela* larvaları üzerinde *Bt*-JJX ve HD73-*cry8Ab1*'in insektisidal aktivitesini test etmişlerdir. Scarabide familyasının 30.000 türünün olduğu bilinmektedir. Dünyada farklı noktalarda baskın türün çeşitli olmasına nedeniyle ICP'lerin tüm türler üzerinde standart bir metodu yoktur. Biyolojik aktivite verileri *cry8Ab1* geni taşıyan yeni bir B-JJX suşunun bulunduğunu ve test edilen *H. oblita* ve *H.parallela* zararlılarına üzerinde yüksek toksisite gösterdiği belirlenmiştir. Fakat HD73 ürettiği Cry8Ab1'in aktivitesi *Bt*-JJX'den daha düşük bulunmuştur. Bunun sebebi HD73- 'nin daha düşük oranda Cry8Ab1 proteinini üretiyor olabilmesinden kaynaklanıyor olabileceği belirtilmiştir. Diğer bir nedeni ise *Bt*-JJX suşunun yuvarlak ve kübik kristal protein üretmesinden kaynaklanabileceğidir. Benzer şekilde yaptığımız çalışmada da yabanıl suş olan *Bt* SY49-1'in üretmiş olduğu Cry proteini spor karışımın *E. coli* BL21(DE3)'de ifade edilen Cry proteinlerinden (rekombinant Cry1Ab ve Cry2) daha etkili olduğu tespit edilmiştir. *Bt* SY49-1'in daha yüksek toksisite göstermesinin nedenin birçok *cry* genini bir arada taşımasına ve bu genlerin ürünü olan bipramidal, yuvarlak, kübik ve düzensiz şekilli kristal protein üretmesinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir. Buna ilaveten *Bt* SY49-1'in

sporlarının zararlıların vücut boşluğunda çimlenerek septisemiye neden olarak toksisiteyi de arttırdığı düşünülmektedir [290-295]. Bu durumu total protein konsantrasyonlarında desteklemektedir. IPTG ile indüklenmiş rekombinant gen taşıyan *E. coli* BL21(DE3) suşu *Bt* SY49-1'den daha fazla protein üretmesine rağmen yabanıl suşumuzun daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Bir başka çalışmada Liu *et al*., [296] W015-1 suşuna ait *cry1Ac* genini klonlamış IPTG ile protein indüklemesi yaptıktan sonra 133 kDa büyüklüğünde Cry1Ac proteinini SDS-PAGE analizi ile gözlemişlerdir Cry1Ac proteini ifade eden *E. coli* M15 hücreleri sonikatörle parçalanarak total proteinler açığa çıkarılmış ve ikinci instar *P. xylostella* (Lepidoptera) larvaları üzerinde test edilmiştir. *E. coli* M15 hücre lizatının larvalar üzerinde yüksek oranda öldürücü etki gösterdiği belirtmişlerdir. Ayrıca Liu *et al*., [296] Cry1Ac22 proteinini X ray analizi ile 3 boyutlu yapısını incelediklerinde Cry1Aa, Cry1Ab ve Cry3Aa proteinleriyle yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirtmişlerdir. Benzer şekilde *Bt* SY49-1 suşunda bulunan Cry1Ab proteininde Liu *et al*., [296]'ün önerdiği Cry1Ac22 proteinin 3 boyutlu yapısıyla benzerlik göstermesi muhtemeldir.

Bt'nin Cry2A toksini bu ailenin mevcut üyeleriyle % 70 dizi benzerliği göstermesinin yanında oldukça farklı aktivite spektrumu göstermesi yönüyle ilginçtir [66, 297]. Günümüze kadar test edilen Cry2A toksinlerinin tamamı *H. armigera*'ya karşı, çoğuda *H. punctigera* ve *H. zea* karşı toksisite göstermiş olmasına rağmen Cry2Ac'nin *H. punctigera* ve *H. zea* karşı aktivite göstermemesi istisnai bir durumdur [66, 298]. Cry2A toksinlerinin çoğu *S. exigua* karşı inaktif olmasına rağmen Cry2Aa bu zararlıya karşı tosisite gösterdiği belirtilmiştir [66]. Cry2Aa ve Cry2Ag'nin ise *A. aegypti* karşı aktif toksisite göstermesi fakat Cry2Ab ve Cry2Ac'nin toksisite göstermemesi nedeniyle Dipteran türlerine karşı çok sayıda çapraz deneme yapılmıştır [66,299]. Buna karşılık hem Cry2Aa hem de Cry2Ab *Anopheles gambiae*'ye (Diptera) karşı toksisite göstermiş olup, Cry2Aa'nın Dipteraya karşı toksisiteden sorumlu aktif bölgeleri tanımlamak amacıyla çok sayıda mutagenez çalışmalar yapılmıştır [128, 300]. Daha önce Cry2Ab'nin *O. furnacalis*'e karşı toksisite göstermemesine rağmen Cry2A toksinlerinin (Cry2Ab dahil) *O. nubilalis*'e karşı toksik olduğu belirlenmiştir. Günümüze kadar yayınlamış birçok verilere bakıldığında Cry2Ah1'in ve çalışmamızda kullandığımız rekombinant Cry2 proteinin diğer Cry2A toksinleriyle kıyaslandığında farklı bir aktivite

spektrumunun olduğu görülmektedir. Shu *et al.*, [297] bu yeni toksinlerin aktivitesi nispeten düşük olmasına rağmen kedine has aktivite spektrumu böcek özgüllüğünün temellerini ve buna bağlı olarak yeni biyo pestisit geliştirilmesinde faydalı olabileceğini belirtmiştir.

Xue *et al.*, [301] Cry1Ah'ın kodlayan bölgesi pHT59'dan aracı vektör pSXY422 vektörüne klonlamışlardır. Elde edilen pSXY422-1Ah toksin geni bu plazmitte bulunan cry3A promotorunun alt bölgesine yerleştirilmiştir. pSXY422-1Ah *Bt* 'nin kristal üretmeyen HD73$^-$ suşuna aktarıldığında rekombinant suşta sporlanma sırasında kristal protein gözlemişlerdir. Kristallerin diğer Cry1 toksinlerinde olduğu gibi bipramidal şekilli olduğu görülmüştür. Saflaştırılan Cry1Ah proteini 4 farklı Lepidopter zararlısına karşı denenmiş ve yüksek toksisite ortaya koyduğu belirlenmiştir. LC_{50} değerleri *O. furnacalis, H. armigera, C. suppressalis*, ve *P. xylostella* larvaları için sırasıyla 0,05, 1,48, 0,98 µg/g ve 1,52 µg/ml olarak belirlenmiştir. Cry1Ah'ın *O. furnacalis*'e karşı Cry1Ie'den 70 kat Cry1Ac'den 8.2 kat Cry1Ab'den de 4,6 kat daha toksik olduğu belirlenmiştir. Cry1Ah ve Cry1Ab için % 95 'lik güven aralıkları çakışmasına rağmen Robertson ve Preisler [302] belirttiği oran testi toksisitelerin anlamlı olduğunu göstermiştir. *H. armigera*'da Cry1Ah, Cry1Ac'ye göre 4,8 kat daha fazla toksisite göstermesine rağmen güven aralıkları çakışmamıştır fakat oran testleri anlamlı farklılık olduğunu göstermiştir. Cry1Ah *C. suppressalis*'de Cry1Ab'ye benzer toksisite göstermesine rağmen Cry1Ac'den 6 kat daha toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Son olarak *P. xylostella* Cry1Ah'ın bu zararlıya karşı en ekili toksinlerden biri olan Cry1Ac'ye benzer toksisite gösterdiği belirlenmiştir.

Darsi *et al.*, [303] yerel suşları *Bt* A19-31 suşunun 3'ucu kesilmiş 2.1 kb'lik *cry1Ab* genini *E. coli* DH5Ű'e klonlamışlardır. Pozitif klonlardan izole ettikleri pT-*cry1Ab* rekmobinant plazmitini *XmaI* ve *PstI* kesim enzimleriyle kesilerek çıkarılan *cyr1Ab* genini daha sonra pHT3101 shuttle vektörüne ligasyonunu yaparak kristalsiz *Bt* 4Q7 suşuna elektroporasyonla aktarmışlardır. İfade edilen 3'ucu kesilmiş *cry1Ab* genin yaklaşık 65 kDa büyüklüğünde bant verdiği SDS-PAGE analizi ile test edilmiştir. Darsi et al. [303] truncated edilmiş (3'ucu kesilmiş) *Bt* 4Q7 suşunun ifade ettiği rekombinant Cry1Ab proteininin doğal alandan topladıkları *H. armigera* ve *S. litura* larvaları üzerinde test ettiklerinde sırasıyla % 20 ve % 70 oranında ölüm oranın olduğunu

belirlemiştir. Yapılan çalışmalarda yabanıl *Bt* 4Q7 suşunun rekombinant protein üreten *Bt* 4Q7 (pH-cry1Ab) suşundan daha etkili olduğunu belirlemişlerdir. Benzer şekilde yabanıl *Bt* SY49-1 suşunununda rekombinant *cry1Ab* geni taşıyan *E. coli* BL21(DE3) pET-*cry1Ab* suşundan daha yüksek insektisidal aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Lopez-Pazos *et al.*, [304] Cry1Ba ve Cry3Aa rekombinat proteinleri *Hypothenemus hampei* (Coleoptera) larvalarının besinine karıştırıldığında öldürücü aktivite gösterdiği ancak çözünmüş kristallerin toksisite göstermediği belirtmiştir. Larvalara Cry3Aa protoksin uygulanmış besin verildiğinde ölüm oranının %22 (100 ng/cm^2)'den %30,2 (10000 ng/cm^2) arttığı görülmüştür. Cry1Ba'nın Cry3Aa göre 6 günlük larvada daha etkili olduğu görülmüştür (500 ng/cm^2 'deki ölüm oranı % 24.5, 5000 ng/cm^2 ölüm oranı %43.5: 5000 ng/cm^2 aktif toksin ölüm oranı % 40.01). Daha yüksek toksin uygulamasının (20000-30000 ng/cm^2) ölüm oranı üzerinde çok az ilave etki oluşturduğu belirtilmiştir.(Cry1Ba'nın toksisitesi % 40'dan % 25'e düşmüştür; Cry3Aa'nın ise değişmediği belirlenmiştir).

Zhu *et al.*, [305] pET22-*cry4Cb1* ve pET22-*cry30Ga1* rekombinant plazmitlerini BL21 suşuna aktardıktan sonra IPTG ile indükleme yapmışlardır. SDS-PAGE analizi ile 139 kDa büyüklüğünde Cry4C ve 70 kDa büyüklüğünde Cry30G rekombinant proteinlerinin varlığını belirlemişlerdir. İnsektisidal aktivite denemelerinde Cry4Cb1 proteinin *A. aegypti* (Diptera)'ye karşı toksik etki gösterdiği fakat *P.xylostella* (Lepidoptera) karşı etki göstermediği belirlenmiştir. Bunun yanısıra Cry30Ga1'in hem Lepidoptera hem de Diptera zararlısına karşı toksik etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Zhu *et al.*, [305] günümüzde birçok *Bt* suşunun ve rekombinant Cry proteinin elde edildiğini ancak bunlardan çok az bir kısmının zararlı kontrol amacıyla kullanıldığını belirtmiştir. Bazı böcek türlerinin ise çeşitli *Bt* toksinlerine karşı direnç geliştirdiği birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Bu yüzden daha geniş zararlı spektrumuna sahip *Bt* suşlarının ve Cry proteinlerinin izolasyonu bu problemin çözümü için önem arz etmektedir.

Bukhari *et al.*, [306] *Bt* DAM 1-6 kısusından klonlanan *cry11* geni içeren bütün *Bt* izolatlarının hepsinde tamamen ifade edilmiş 70 kDa büyüklüğünde protein bantları gözlenmiştir. Fakat sadece rekombinant olmayan kontrol grubunda bu bant görülmemiştir. Benzer şekilde yaptığımız çalışmada kontrol grubu olarak kullandığımız

rekombinant olmayan *E. coli* BL21(DE3) kısında da bu bant görülmemiştir. Ancak klonlama yaptığımız *cry2* geni taşıyan *E.coli* pET-*cry2*'nin yaklaşık 70 kDa büyüklüğünde bant tasarlığı görülmüştür.

Bt'nin farklı Cry proteinlerinin birlikte uygulanması zararlıları kontrol etmekte daha etkili olabileceği önerilmektedir. Cry proteinlerinin sinerjistik aktivitesi üzerine yapılan bir çalışmada [307], *Bt*'ye ait *cry1Aa, cry1Ab* ve *cry1Ac*'nin tüm genom bölgeleri PZR ile çoğaltmıştır. Araştırmacılar çoğaltılan tüm gen bölgelerini ayrı ayrı şekilde pKK223-3 ifade vektörüne aktararak *E. coli* JM105'de ifade ettirmişlerdir. İfade edilen Cry proteinlerini Lee *et al*., [308] önerdiği şekilde saflaştırmışlardır. Saflaştırılan Cry1Aa, Cry1Ab ve Cry1Ac proteinlerini *Chilo partellus* (Lepidoptera) üzerinde test etmişlerdir. Aktivite testleri sonucunda Cry1Ab'nin Cry1Ac'ye göre yaklaşık 3 kat, Cry1Ac'nin ise Cry1Aa'ya göre 5 kat daha toksik olduğunu belirlemişlerdir. Cry1Ab-Cry1Ac (1:1) kombinasyonun *C. partellus* bireysel toksin uygulamasına göre LC_{50} değerini 3 kat azalttığı, Cry1Ab-Cry1Aa (1:1) toksin kombinasyonunda *C. partellus* üzerinde bireysel toksin uygulamasına göre yaklaşık 2 kat daha etkili olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde yaptığımız çalışmada da *E. kuehniella* larvaları üzerinde Cry1Ab toksinin bireysel uygulamasında LD_{50} 685.67 µg\g, Cry1Ab:Cry2 (1:1) toksin kombinasyonu uygulandığında LD_{50} değerinin 577 µg\g düştüğü ve toksisitenin yaklaşık 1.2 kat arttığı gözlenmiştir. Sharma *et al*., [307] Cry toksinlerinin sinerjistik etkisinin tam olarak açıklanamadığı ancak bu mekanizma ile ilgili farklı hipotezler olduğunu belirtmiştir. İlk hipotez farklı toksinler tarafından orta bağırsakta meydana getirilen bireysel porların birleşerek daha yüksek toksisiteye sebep olabileceğidir. Bu hibrit porlar bağırsak membran geçirgenliğini arttırarak daha yüksek larval ölüme sebep olabileceği önerilmiştir [309,310]. İkinci hipotez ise Cry proteinlerin hetero oligomer kompleksi oluşturmasının homooligomer kompleksinden daha iyi reseptör bağlanmasını sağladığını önermektedir [311]. Diğer bir öneri ise farklı Cry toksinlerinin karışımı üretken olmayan toksin reseptör bağlanmasını engelleyerek toksisiteyi attırabileceğidir [64].

Benzer şekilde Peng *et al*., [312] parazitik nematod olan *Meloidogyne incognita* karşı Cry5Ba ve Cry6Aa ve Cry55Aa toksinlerinin tek tek ve kombinasyon halinde yapılan biyo aktivite denemelerinde Cry55Aa'nın LC_{50} değeri 102,57 µg/ml olarak bulunmuş olup Cry5Ba (LC_{50} 146.05 µg/ml) ile benzer toksisite değerleri elde edilmiştir. Cry5Ba,

Cry6Aa (383.42 µg/ml) kıyaslandığında Cry6Aa'dan 2 kat daha toksik bulunmuştur. Toksin karışımlarının 1:1 oranında karıştırılarak yapılan biyo aktivite çalışmasında Cry6Aa:Cry55Aa kombinasyonu anlamlı sinerjistik etki göstermiş olup, beklenen değere göre 5 kat daha düşük LC_{50} değeri (32,14 µg/ml) belirlenmiştir. Cry6Aa ve Cry5Ba 1:1 oranında karıştırılarak yapılan aktivite çalışmasında beklenenden 2 kat düşük LC_{50} değeri elde edilmiştir. Buna karşılık Cry5Ba: Cry55Aa ve Cry6Aa:Cry5Ba: Cry55Aa toksin karışımlarıyla yapılan denemede anlamlı bir sinerjistik etki görülmemiştir. Cry6Aa:Cry55Aa kombinasyonu en yüksek sinerjistik etkiyi gösterdiği için bu toksinlerin farklı oranlarındaki (1:5, 1:2, 1:1, 2:1, 5:1) karışımlarıyla biyo aktivite çalışmalarına devam edilmiştir. Yapılan tüm denemelerde LC_{50} değerlerinde beklenen sonuçlara göre azalma görülmüştür. Cry6Aa:Cry55Aa 1:1 oranında karıştırıldığında etkili sonuçlar elde edilmiştir. Toksin kombinasyonlarının sinerjistik etkileri kök ur nematodlarının kontrolünde kullanılabileceği belirtilmiştir.

Günümüze kadar geliştirilen transjenik bitki üretiminde çeşitli Cry1 proteinleri kullanılmaktaydı ancak son zamanlarda transjenik bitki üretiminde Cry2 proteinleri daha çok tercih edilmektedir. Gen büyüklüğü bitkilerde protein ifadesini sınırlayan bir faktör olduğu için *cry1* geninden ziyade daha küçük boyutta olan *cry2* genleri daha çok tercih edilmektedir. Yapılan çalışmalar bitkilerde *cry2* genin *cry1* genine göre 20-30 kat daha fazla ifade olduğunu ve böcek orta bağırsağında daha çeşitli reseptörlere bağlanabildiği için daha avantajlı olduğu vurgulanmaktadır [313].

Bt hakkındaki bilimsel ve teknik bilgiler son yıllarda gelişmiş olmasına rağmen gen ekspresyonu ve fizyolojik tepkilerin düzenlenmesiyle ilgili detaylı çalışmalar genomik ve proteomik bilgilerinin az olması nedeniyle sınırlı kalmıştır. *Bt* tipik olarak konukçusuyla patojenik bir ilişki kurduğu için (bazı omurgasızlarla simbiyotik ilişki de kurabilir) bu bakteri mikrop-konukçu etkileşimiyle patojenik etkiyle simbiyotik bağlantılar konusunda istisnai bir model sunar. Daha önce tartışıldığı gibi *Bt* patojenitesi duyarlı konukçuların spesifik kaderin reseptörlerinin hedeflenmesini içerir [188, 266]. Bu nedenle *Bt*'nin genom ve proteomunun anlaşılması böcek sistemlerinde olduğu gibi bakteriyel hastalıkların anlaşılmasında da önemli olabilir. Bezer şekilde *Bt*'ye karşı böcek savunma tepkisinin anlaşılması genel olarak omurgasız savunma sisteminin anlaşılmasına da katkı sağlayabilir.

Sonuç olarak yeni insektisitlerin geliştirilmesi için; yeni moleküler tekniklerin keşfedilmesi, tanımlanmasõ ve doğrulanmasõ en ümit verici araştõrma alanlarõndan biridir [267]. Kimyasal veya genetik olarak değiştirilmiş Cry toksinleri ve farklõ organizmalarda ifade edilen Cry proteinleri yeni Cry protein dizaynõna yardõmcõ olabilir. Bu da doğal Cry proteinlerden insektisidal aktivitesi daha yüksek Cry proteinlerin ortaya çõkmasõna katkõda bulunabilir [63].

Bt SY49-1 birçok böcek takõmõ üzerinde yüksek insektisidal aktivite gösterebilen birden çok *cry* genini taşõmaktadõr. Bu durum yerel suşumuzun biyo inseksitisit olarak kullanõlabilme-üretilebilme potansiyeli bakõmõndan ümit verici görülmektedir. Ancak doğadaki tüm böcekler zararlõ gurubu içersinde değerlendirilmemektedir. Farklõ böcek takõmlarõna ait böcek türlerinden biri fayda sağlarken bir diğeri ekonomik zarara neden olabilir. Bu sebeple faydalõ böcek türü üzerinde etki göstermeyen sadece hedef zararlõ üzerinde ekti gösterebilen Cry toksinlerinin uygulanabilmesi oldukça önemlidir. *Bt* SY49-1 Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, takõmlarõna ait böcekler üzerinde ekti gösterdiği ini daha önceki çalõşmalarõmõzda belirlemiştik. Bu çalõşmada ise *Bt* SY49-1'in Lepidopter zararlõlarõ üzerinde etkili *cry1* ve Diptera zararlõlarõ üzerinde etkili *cry2* genleri klonlanarak *E. coli*'de ifade ettirilmiştir. Böylece de hedef takõma ait zararlõlara karşõ etkili rekombinant Cry proteinler elde edilmiştir. Daha sonraki çalõşmalarda yerel suşumuza ait tüm *cry* genler klonlanarak ifade ettirildikten sonra zararlõlar üzerinde test edilmeli ve toksin kombinasyonlarõ yapõlarak insektisidal aktivite arttõrõlmaya çalõşõlmalõdõr. Ayrõca yeni moleküler teknikler kullanõlarak Cry proteinlerin aktivitesinin böcek takõmlarõ düzeyinden tür seviyesine indirilmesi gerektiği de düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Bulla, L.A., Rhodes, R.A., St. Julian, G., 1975. Bacteria as insect pathogens. **Annual Review of Microbiology, 29**:163-90.
2. Candas, M., Bulla, L.A., 2002. Microbial insecticides. In: Bitton G, ed **Encyclopedia of Environmental Microbiology**: John Wiley and Sons 1709-17.
3. Aristotle. The Works of Aristotle. In: Smith J.A. Ross, W.D., 1910 eds 4. **Clarendon:Oxford**.
4. Kirby, W., Spence, W., 1826. An Introduction to Entomology:or elements of the **Natural History of Insects**. London:Longman.
5. Bassi, A., 1925. Opere di Agostino Bassi. Pavia, Italy: **Tipografia Cooperativa di Pavia**, 87-152.
6. Siegel, J.P., 2000. Bacteria. In Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Lacey, L.L. and Kaya, H.K. eds), pp. 209ï 230. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Scientific Publishers)
7. Berliner, E., 1911. Ãoeber die schlafsucht der mehlmottenraupe. **Z Gesamte Getreidewes, 3**:63.
8. Berliner, E., 1915. Uber die Schlafsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kuhniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis*, n.sp. **Journal of Applied Entomology, 2**:29.
9. Mattes, O., 1927. Parasitare krankheiten der mehimottenlarven und versuche uber ihre verwendbarkeit als biologisches bekamfungsmittel. **Ges Nature Marburg Schrift**, 381.
10. Hannay, C.L., 1953. Crystalline inclusions in aerobic sporeforming bacteria. **Nature**; **172**:1004.
11. Angus, T.A., 1953. Studies of *Bacillus* spp. pathogenic for silkworm. Progress Report, Forest Biology Division. **Canada Department of Science Service**, 9:6.
12. Hannay, C.L., Fitz-James, P., 1955. The protein crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Canadian Journal of Microbiology**, **1:**694-710.
13. Qaim, M., Zilberman, D., 2003. Yield effects of genetically modified crops in developing countries. **Science**, **299**:900-902.

14. Kleter, G.A., Bhula, R., Bodnaruk, K., Carazo, E., Felsot, A.S., Harris, C.A., et al. 2007. Altered pesticide use on transgenic crops and the associated general impact from an environmental perspective. **Pest Management Science 63**:1107-1115.

15.Sanahuja, G., Raviraj, B., Twyman, R.M., Capell, T., Christou, P., 2011. *Bacillus thuringiensis*: A century of research,development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, **9**:283-300.

16. Tabashnik, B.E., Cushing, N.L., Finson, N., Johnson, M.W., 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamonback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology 83** (5):1671ï 1676.

17. Shelton, A.M., Zhao, J.Z., Rousch, R.T., 2002. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of *B. thuringiensis* transgenic plants. **Annual Review of Entomology, 47**: 845-881.

18. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., 1994. Molecular biology of the cell, New York: **Garland Publishing, pp**. 308-318.

19. Brown, T. A., 1990. Gene cloning, Second Edition, London, Chapman & Hall, pp.,3-11.

20. Lewin, B., 2000. Gene VII., Oxford University, Pres, New York, 9 pp.

21. Mazin, A., 1976. Evolution of DNA structure: direction, mechanism, rate. **Journal of Molecular Evolution, 8** (3):211-249.

22. Solak, M., ķengil, Z., Öztaķ, S., 1997. Rekombinant DNA teknolojisi ķafak Basēm

23. Agrios, G.N., Plant Pathology, pp.922, (5th ed.) Elsevier Academic Pres, London 2005.

24. Uneke, C.J., 2007. Integrated pest management for developing countries, pp. 203, A Systemic Overview, Nova Publishers.

25. Lacey, L.A., et al., 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do They Have a Future?. **Biological Control 21:** 230-248,

26. Begley, J.W., 1990. Efficacy against insects in habitats other than soil, in entomopathogenic nematodes in biological control pp. 215ï 231 Ed. Gaugler, R., Kaya, H.K., CRC Press, Boca Raton, F.L.

27. Gaugler, R., Kaya, H.K., 1990. Entomopathogenic nematodes in biological control, pp.1-365, CRC Press, Boca Raton, FL.

28. Hazir, S., Kaya, H. K., Stock, S. P., Keskin, N., 2003. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests, Turkish. Journal of Biology, 27, 181ï 202,

29. Kaya, H.K., Gaugler, R., 1993. Entomopathogenic nNematodes. **Annual Review of Entomology, 38:**181-206.

30. Richardson, P.N., Grewal, P.S., Collins, G., 1990. Potential of Rhabditid nematodes for the biological control of mushroom sciarid flies. **Nematologica**, **36**(4):386-389.

31. Lenteren, J.C., 2000. A Greenhouse without pesticides: fact or fantasy?. **Crop Protection, 19**:375-384,

32. Koppenhofer, A.M., Kaya, H.K., 1998. Synergism of iImidacloprid and an entomopathogenic nNematode: a novel approach to white grub (Coleoptera: Scarabeidae) control in turfgrass. **Journal of Economic Entomology, 91**(3): 618-623.

33.Wang, J., 1990. Use of Nematode *Steinernema carpocapsae* to control the major apple pest *Carposina nipponensis* in China, Invertebrate Pathology. and Microbial Control, p. 392, Adelaide, Australia.

34.Lacey, L.A., Goettel, M.S., 1993. Biological control, nematodes and the biological control of insect pests, ed. Bedding, R., Akhurst, R., Kaya, H., CSIRO Publication, East Melbourne, Australia,

35. Klein, M.G., 1990. Efficacy against soil inhabiting pests. In entomopathogenic nematodes in biological control pp. 195ï 231, Ed. Gaugler, R.,Kaya, H.K., CRC Press, Boca Raton, F.L.

36. Liu, J., Berry, R.E., 1996. *Heterorhabditis marelatus* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Oregon. **Journal of Invertebrate Pathology, 67**:48-54.

37. Berry, R. E., Liu, J., Groth, E., 1997. Efficacy and pesistence of *Heterorhabditis marelatus* (Rhabditida: Heterorhabditidae) against root weevils (Coleoptera: Curculionidae) in strawberry. **Environmental Entomology**, **26**:465-470.

38. Ogura, N., 1993. Control of Scarabaeid grubs with an entomogenous nematode, *Steinernema kushida*. **JapanAgricultural Research Quarterly**, 27: 49-54.

39. Cabanillas, H.E., Poinar, G.O., Raulston, J.R., 1994. *Steinernema riobravis* sp. nov. (Rhabditida: Steinernematidae) from Texas. **Fundamental & Applied Nematology, 17:**123-131.

40. Parkman, J.P., et al., 1993. Establishment and persistence of *Steinernema scapterisci* (Rhabditida:Steinernematidae) in field populations of *Scapteriscus* spp. mole crickets (Orthoptera:Gryllotalpidae). **Journal of Entomological Science**, **28**:182-190.

41. Tanada, Y., Kaya, H.K., 1993. Insect pathology, academic press San Diego, California, U.S.A.,

42. Inceoglu, A.B., et al., 2001. Recombinant Baculoviruses for insect control. **Pest Management Science**, **57**:981-987,

43. Payne, C.C., 1986. Insect pathogenic viruses as pest control agents. **Fortschritte der Zoologie, 32**:183-200.

44. Knaak, N., Fiuza, M.L., 2005. Histopathology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) treated with nucleopolyhedrovirus and *Bacillus thuringiensis serovar kurstaki*. **Brazilian Journal of Microbiology**, **36**:196-200,

45. Maddox, J.V., 1987. Protozoan diseases. *In* ñEpizootiology of insect diseases pp. 417-452, Ed. Fuxa, J.R., Tanada, Y., Wiley, New York.

46. Henry, J.E., Oma, E.A., Pest Control by *Nosema locustae*, A pathogen of Grasshoppers and Crickets, pp. 573-586, In Microbial Control of Pests and Plant Diseases, 1970-1980, Ed. Burges, H. D., Academic Press, London, 1981

47. Deacon, J.W., 1983. Microbial control of pests and diseases, 31-41, New York,

48. Erkılıç, L., Uygun, N., 1993. Entomopaten fungusların biyolojik mücadelede kullanılma olanakları **Turkish Journal of Entomology, 17**(2): 117-128.

49. Çam, H., et al., 2002. Entomopatojen Fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. patates böceği *Leptinotarsa decemlineata* Say., üzerindeki etkisi, Türkiye 5. Biyolojik Mücadele Kongresi, Erzurum, 4-7 Eylül,

50. Burgers, H.D., 1998. Formulation of microbial pesticides, p. 383, Kluwer Academie Publischer.

51. Butt, T.M., Copping, L., 2000. Fungal biological control agents, **Pesticide Outlook 11**:186-191.

52. Kılıç, E., Yıldırım, E., 2008. Beyazsineklerin (Homoptera: Aleyrodidae) mücadelesinde entomopatojen fungusların kullanım imkanları **Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi**, **39**(2):249-254.

53. Bizzarri, M.F. and Bishop, A.H. 2008. The ecology of *Bacillus thuringiensis* on the Phylloplane: colonization from soil, plasmid transfer, and interaction with larvae of *Pieris brassicae*. **Microbial Ecology**. **56**: 133-139

54. Hendriksen, N.B., Hansen, B.M., 2002. Long-term survival and germination of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in a field trial. **Canadian Journal of Microbiology, 48:**256ï 261.

55. Broderick, N.A. et al., 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**.. U.S.A. **103**:15196-15199.

56. Broderick, N.A., et al., 2009. Contributions of gut bacteria to Bacillus thuringiensis-induced mortality vary across a range of Lepidoptera**. BioMed Central**. 7, 11

57. Raymond, B., et al., 2008. Ecological consequences of ingestion of *Bacillus cereus* on *Bacillus thuringiensis* infections and on the gut flora of a Lepidopteran host. **Journal of Invertebrate Pathology, 99**:103-111.

58. Raymond, B., et al., 2009. A mid-gut microbiota is not required for the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* to diamondback moth larvae. **Environmental Microbiology**, **11:** 2556-2563.

59. van Frankenhuyzen, K., et al., 2010. Interactions between *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and midgut bacteria in larvae of gypsy moth and spruce budworm. **Journal of Invertebrate Pathology**, **103:**124-131.

60. Johnston, P.R., Crickmore, N., 2009. Gut bacteria are not required for the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* toward the tobacco hornworm. Manduca sexta. **Applied and Environmental Microbiology**, **75**: 5094-5099.

61. Raymond, B., Johnston, P. R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., Crickmore, N., 2010. *Bacillus thuringiensis:* an impotent pathogen. **Trends in Microbiology 18 (**5): 189-194.

62. Bulla, L.A., Bechtel, D.B., Kramer, K.J., Shethna, Y.I., Aronson, A.I., Fitz-James, P.C., 1980. Ultrastructure, physiology and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. **Critical Reviews in Microbiology, 8**:147-204.

63. Mohamed, A.I., Griko, N., Junker, M., Bulla, L.A., 2010. *Bacillus thuringiensis* A genomics and proteomics perspective. **Bioengineered Bugs 1:1** 31-50

64. Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R.,Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **62**:775-806.

65. Crickmore, N., Zeigler, D.R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A., Dean, D.H., 2011. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/>(accessed 02.06.11).

66. van Frankenhuyzen, K., 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, **101**:1-16.

67. van Frankenhuyzen, K., Gringorten, J.L., Gauthier, D., Milne, R.E., Masson, L., Peferoen, M., 1993. Toxicity of activated Cry1 proteins from *Bacillus thuringiensis* to six forest lepidoptera and *Bombyx mori*. **Journal of Invertebrate Pathology**, **62**:295-301.

68. Luo, K., Banks, D., Adang, M.J., 1999. Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 d-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. **Applied and Environmental Microbiology, 65**: 457-464.

69. Escriche, B., de Decker, N., Van Rie, J., Jansens, S., van Kerkhove, E., 1998. Changes in permeability of brush border membrane vesicles from *Spodoptera littoralis* midgut induced by insecticidal Crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, **64**:1563-1565.

70. Iriarte, J., et al., 2000. Characterization of *Bacillus thuringiensis* ser. *balearica* (Serotype H48) and ser. *navarrensis* (Serotype 50): Two Novel Serovars Isolated in Spain. **Current Microbiology**, **40**: 17-22.

71 Kronstad, J.W., Schnepf, H.E., Whiteley, H.R., 1983. Diversity of Locations for *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Genes, **Journal of Bacteriology**, **154**:419-428.

72. de Barjac, H., Bonnefoi, A., 1962. Essai de classification biochimique se sérologique de 24 souches de *Bacillus* dutype *B. thuringiensis*. **Entomophaga;** 7:5-31.

73. de Barjac, H., Frachon, E., 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. **Entomophaga**, 35:233-240.

74. Lereclus, D., et al., 1982. Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: conserved sequences through 11 crystalliferous strains. **Molecular Genetics and Genomics, 186:**391-398.

75. Lynch, M.J., Baumann, P., 1985. Immunological comparisons of the crystal protein from strains of *Bacillus thuringiensis.* **Journal of Invertebrate Pathology**, **46:**47-57,

76. Frutos, R., Jua Rez Perez, V. M., 1997. PCR-Based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis cry* genes. **Applied and Environmental Microbiology, 8**(63): 2997-3002,

77. Carlson, C.R., Caugant, D.A., Kolsto, A.B., 1994. Genotypic diversity among *Bacillus creus* and *Bacillus thuringiensis* strains. **Applied and Environmental Microbiology,** 60:1719-1725.

78. Gonzales, J.M., Dulmage, H.T., Carlton, B.C., 1981. Correlation between spesific plasmids and ŭ-endotoksin production in *Bacillus thuringiensis.* **Plasmid**, **5:**351-365.

79. Lereclus, D., Delecluse, A., Lecadet, M.M., 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. in: Entwistle, P.F., Cory, J.S., Bailey, M.J., Higgs, S. (eds.), *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and Practise. Chichester: John Wiley and Sons Ltd., 37-70.

80. Carlton, B., 1988. Development of genetically improved strains *of Bacillus thuringiensis.*, In biotechnology for crop protection, Hadin, P., Mann, J., Hollingworth, R., (eds.),American Chemical Society, Washington, D.C.,260-279.

81. Mahillon, J., Resohazy, R., Hallet, B., 1994. IS231 and other *Bacillus thuringiensis* transposable elements, A Review. **Genetica, 93**, 13-26,

82. Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M., 2005. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In comprehensive molecular insect science. Gilbert, L.I., Iatrou, K., and Gill, S.S. (eds). Oxford: Elsevier, pp. 175-206.

83. Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A., Koziel, M.G., 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA **93**:5389-5394.

84. Warren, G., 1997. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. In Advances in Insect Control: The role of transgenic plants. Carozzi, N., Koziel, M.i (eds). London: Taylor & Francis, pp. 109-120.

85. Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S.S., Soberón, M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology 41**:423-431.

86. Bravo, A., Gómez, I., Porta, H., García-Gómez, B.I., Rodriguez-Almazan, C., Pardo, L., Soberón, M., 2012. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. **Microbial Biotechnology, 6:**17-26.

87. de Maagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N., 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics** 17: 193-199.

88.Crickmore, N., 2000. The diversity of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxins. In enthomopathogenic bacteria: from lLaboratory to field application. Charles, J.-F., Delécluse, A., and Nielsen-LeRoux, C. (eds). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 65-79.

89. Bravo, A., 1997. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin family proteins and their functional domains. **Journal of Bacteriology, 179:** 2793-27801.

90. López-Pazos, S.A., Martínez, J.W., Castillo, A.X., Cerón-Salamanca, J.A., 2009. Cry1B and Cry3A are active against *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae). **Journal of Invertebrate Pathology 101:** 242ï 245,

91. Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D.J., Li, J.,2005. Crystal Structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and ēts biological implications. **Journal of Molecular Biology**, **348**:363-382.

92. Florez, A.M., Osorio, C., Alzate, O., 2012, Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* ŭ-endotoxins,pp.93-113. *Bacillus thuringiensis* Biotechnology (Eds, Sansinenea E.,) Springer.

93. Heimpel, A.M., 1967. A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. **Annual Review of Entomology 12**:287-322.

94. Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., et al., 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **62:**807-13.

95. Tzeng, Y.L., Datta, A., Kolli, V.K., Carlson, R.W., Stephens, D.S., 2002. Endotoxin of *Neisseria meningitidis* composed only of intact lipid A: inactivation of the meningococcal 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase. **Journal of Bacteriology, 184**:2379-88.

96. Lamanna, C., Sakaguchi, G., 1971. Botulinal toxins and the problem of nomenclature of simple toxins. **Bacteriological reviews;35**:242-249.

97. Bulla, L.A., Davidson, L.I., Kramer, K.J., Jones, B.L., 1979. Purification of the insecticidal toxin from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**; **91**:1123-1130.

98. Bulla, L.A., Kramer, K.J., Cox, D.J., Jones, B.L., Davidson, L.I., Lookhart, G.L.,1981. Purification and characterization of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis.* **Journal of Biological Chemistry, 256**:3000-3004.

99. Moran, C.P., 1993. RNA polymerase and transcription factors. In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R, eds., *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria Washington, DC**:** American Society for Microbiology; 653-67.

100. Bizzard, B.L., Schnepf, H.E., Kronstad, W., 1991. Expression of the *cry1B* crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis.* **Molecular Genetics and Genomics; 231**:59-64.

101. Brown, K.L., 1993. Transcriptional regulation of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni* crystal protein gene operons. **Journal of Bacteriology**, **1175:**7951-7957.

102. Yoshisue, H., Nishimoto, T., Sakai, H., Komano, T., 1993. Identification of a promoter for the crystal proteinencoding gene *cryIVB* from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis.* **Gene 137**:247-51.

103. Yoshisue, H., Fukada, T., Yoshida, K., Sen, K., Kurosawa, S., Sakai, H., et al., 1993. Transcriptional regulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* mosquito larvicidal crystal protein gene *cryIVA*. **Journal of Bacteriology**,**175:**2750-2753.

104. Dervyn, E., Poncet, S., Klier, A., Rapoport, G., 1995. Transcriptional regulation of the *cryIVD* gene operon from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis.* **Journal of Bacteriology, 177:**2283-2291.

105.Wong, H.C., Schnepf, H.E., Whiteley, H.R., 1983. Transcriptional and translational start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. **Journal of Biological Chemistry**, **258**:1960-1967.

106. Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M., Chaufaux, J., 1995. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis spo0A* mutant. **Biotechnology**, **13:**67-71.

107. De Souza, M.T., Lecadet, M.M., Lereclus, D., 1993. Full expression of the *cryIIIA* toxin gene of *Bacillus thuringiensis* requires a distant upstream DNA sequence affecting transcription. **Journal of Bacteriology**; **17**5:2952-2960.

108. Malvar, T., Gawron-Burke, C., Baum, J.A., 1994. Overexpression *of Bacillus thuringiensis* HknA, a histidine protein kinase homology, bypasses early *spo* mutations that result in CryIIIA overproduction. **Journal of Bacteriology**,**176:**4742-4749.

109. Walter, T., Aronson, A., 1999. Specific binding of the E2 subunit of pyruvate dehydrogenase to the upstream region *of Bacillus thuringiensis* protoxin genes. **Journal of Biological Chemistry,** 274:7901-7906.

110. Glatron, M.F., Rapoport, G., 1972. Biosynthesis of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis:* halflife of its corresponding messenger RNA. **Biochimie 54:**1291-301.

111. Wong, H.C., Chang, S., 1986. Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNAs in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA;**83**:3233-7.

112. Agaisse, H., Lereclus, D., 1996. STAB-SD:a Shine-Dalgarno sequence in the 5'untranslated region is a determinant of mRNA stability. **Molecular Microbiology**, **20**:633-43.

113. Ibrahim, M.A., 1999. Cloning, organization and enhancement of activity of two insecticidal crystal protein genes. PhD Dissertation, Univeristy of Wyoming

114. Crickmore, N., Ellar, D.J., 1992. Involvement of a possible chaperonin in the efficient expression of a cloned *cryIIA* delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis.* **Molecular Microbiology, 6**:1533-1537.

115. Adams, L.F., Visick, J.E., Whiteley, H.R., 1989. A 20-kilodalton protein is required for efficient production *of the Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 27-kilodalton crystal protein in *Escherichia coli.* **Journal of Bacteriology**, **171**:521-30.

116. Baum, J,A., Malvar, T., 1995. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis.* **Molecular Microbiology**;**18**:1-12.

117. Thomas, D.J., Morgan, J.A., Whipps, J,M., Saunders, J.R., 2000. Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture and soil and in lepidopteran and coleopteran larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, **66**:118-124.

118. Thomas, D.J., Morgan, J.A., Whipps, J.M., Saunders, J.R., 2001. Plasmid transfer between *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strains in laboratory culture, river water and dipteran larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, **67**:330-8.

119. Widner, W.R., Whiteley, H.R., 1989. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. **Journal of Bacteriology, 171**:965-974.

120. Sedlak, M., Walter, T., Aronson, A., 2000. Regulation by overlapping promoters of the rate of synthesis and deposition into crystalline inclusions of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. **Journal of Bacteriology, 182**:734-741.

121. Held, G.A., Bulla, L.A., Ferrari, E., Hoch, J., Aronson, A.I., Minnich, S.A., 1982. Cloning and localization of the lepidopteran protoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**; **79**:6065-6069.

122. Schnepf, H.E., Whiteley, H.R., 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**; **78**:2893-2897.

123. Hofte, H., Whiteley, H.R., 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis.* **Microbiological Reviews, 53**:242-255.

124. Carlton, B.C., Gawron-Burke, C., 1993. Genetic improvement of *Bacillus thuringiensis* for bioinsecticide development. In: Kim L, Advanced engineered pesticides Marcel Dekker inc New York; 43-71.

125. Li, J., Carroll, J., Ellar, D.J., 1991. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. **Nature**; **353**:815-821.

126. Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai- Carey, M., Schwartz, J.L., Brousseau, R., et al., 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. **Journal of Molecular Biology**, **254**:447-464.

127. Derbyshire, D.J., Ellar, D.J., Li, J., 2001. Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-Dgalactosamine. **Acta Crystallographica Section D**, **57:**1938-1944.

128. Morse, R.J., Yamamoto, T., Stroud, R.M., 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. **Structure**; **9**:409-417.

129. Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J.R., Pangborn, W., et al., 2001. Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis.* **Acta Crystallographica Section D**; **57**:1101-1119.

130. Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, C., Lescar, J., 2006. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. **Journal of Bacteriology, 188**:3391-3401.

131. Guo, S., Ye, S., Liu, Y., Wei, L., Xue, J., Wu, H., et al., 2009. Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. **Journal of Structural Biology**;**168**:259-266.

132. Cabiaux, V., Wolff, C., Ruysschaert, J.M., 1997. Interaction with a lipid membrane: a key step in bacterial toxins virulence. **International Journal of Biological Macromolecules**; **21**:285-298.

133. Falnes, P.O., Sandvig, K., 2000. Penetration of protein toxins into cells. **Current Opinion in Cell Biology**, **12**:407-413.

134. Gazit, E., La, R.P., Sansom, M.S., Shai, Y., 1998. The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin are consistent with an ñumbrella-likeò

structure of the pore. **Proceedings of the National Academy of Sciences**; **79**:USA; 95:12289-12294.

135. Kanintronkul, Y., Sramala, I., Katzenmeier, G., Panyim, S., Angsuthanasombat, C., 2003. Specific mutations within the alpha4-alpha5 loop of the *Bacillus thuringiensis* Cry4B toxin reveal a crucial role for Asn-166 and Tyr-170. **Molecular Biotechnology, 24**:11-20.

136. Whiteley, H.R., Schnepf, H.E., Tomczak, K., Lara, J.C., 1987. Structure and regulation of the crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis*. In: Maramorosch K (ed) Biotechnology advances in invertebrate pathology and cell culture. Academic Press, San Diego, pp 13ï 27.

137. Gawron-Burke, C., Baum, J.A., 1991. Genetic manipulation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein genes in bacteria. **Genetic Engineering**, (N Y) **13**:237ï 263.

138 . Boonserm, P., Pornwiroon, W., Katzenmeier, G., Panyim, S., Angsuthanasombat, C., 2004. Optimised expression in *Escherichia coli* and purification of the functional form of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa delta-endotoxin. **Protein Expression and Purification, 35**:397-403.

139. Gustafson, M.E., Clayton, R.A., Lavrik, P.B., Johnson, G.V., Leimgruber, R.M., Sims, S.R., Bartnicki, D.E., 1997. Large-scale production and characterization of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* insecticidal protein from *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 47:255-2261.

140. Huang, K.X., Badger, M., Haney, K., Evans, S.L., 2007. Large scale production of *Bacillus thuringiensis* PS149B1 insecticidal proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1 from *Pseudomonas fluorescens*. **Protein Expression and Purification, 53**:325-330.

141. Schnepf, H.E., Wong, H.C., Whiteley, H.R., 1987. Expression of a cloned *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology, 169**:4110ï 4118.

142. Brizzard, B.L., Schnepf, H.E., Kronstad, J.W., 1991. Expression of the *cryIB* crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis*. **Molecular and General Genetics 231**:259ï 64.

143. Hayakawa, T., Howlader, M.T., Yamagiwa, M., Sakai, H., 2008. Design and construction of a synthetic *Bacillus thuringiensis cry4Aa* gene: hyperexpression in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **80**:1033-1037.

144. Visick, J.E., Whiteley, H.R., 1991. Effect of a 20-kilodalton protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on production of the CytA protein by *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology, 173**:1748-1756.

145. Sazhenskiy, V., Zaritsky, A., Itsko, M., 2010. Expression in *Escherichia coli* of the native *cyt1Aa* from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied Microbiology and Biotechnology, 76**:3409-3411.

146. Li, J., Koni, P.A., Ellar, D.J., 1996. Structure of the mosquitocidal delta-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. **Journal of Molecular Biology, 257:**129-152.

147. Cohen, S., Dym, O., Albeck, S., Ben-Dov, E., Cahan, R., Firer, M., Zaritsky, A., 2008. High-resolution crystal structure of activated Cyt2Ba monomer from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Journal of Molecular Biology 380**:820-827.

148. Sørensen, H.P., Mortensen, K.K., 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology 115**:113-128.

149. Terpe, K., 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology, 72**:211-222.

150. Structural Genomics Consortium 2008. Protein production and purification. **Nature Methods, 5**:135-146.

151. Makino, T., Skretas, G., Georgiou, G., 2011. Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. **Microbial Cell Factories,** 10:32.

152. Baum, J.A., Coyle, D.M., Gilbert, M.P., Jany, C.S., Gawron-Burke, C., 1990. Novel cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, **56**:3420-3428.

153. Arantes, O., Lereclus, D., 1991. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. **Gene, 108**:115-119.

154. Lecadet, M.M., Chaufaux, J., Ribier, J., Lereclus, D., 1992. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied and Environmental Microbiology, 58**:840-849.

155. Agaisse, H., Lereclus, D., 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?. **Journal of Biotechnology, 177**:6027-6032.

156. Baum, J.A., Johnson, T.B., Carlton, B.C., 1999. *Bacillus thuringiensis* natural and recombinant bioinsecticide products. In: Hall FR, Menn JJ (eds) Methods in biotechnology, vol 5: biopesticides: use and delivery. Humana Press, Totowa, pp 189ï 210.

157. Yamamoto, T., 2001. One hundred years of *Bacillus thuringiensis* research and development: discovery to transgenic crops. **Jounal Insect Biotechnology Sericol**, **70**:1-23.

158. Gilmer, A.J., Baum, J.A., 1999. Chimeric lepidopteran-toxic crystal proteins. US Patent 5:965,428.

159. Kalman, S., Kiehne, K.L., Cooper, N., Reynoso, M.S., Yamamoto, T., 1995. Enhanced production of insecticidal proteins in *Bacillus thuringiensis* strains carrying an additional crystal protein gene in their chromosomes. **Applied and Environmental Microbiology, 61**:3063-3068.

160. Baum, J.A., Kakefuda, M., Gawron-Burke, C., 1996. Engineering *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides with an indigenous site-specific recombination system. **Applied and Environmental Microbiology, 62**:4367-4373.

161. Sanchis, V., Agaisse, H., Chaufaux, J., Lereclus, D., 1997. A recombinase-mediated system for elimination of antibiotic resistance gene markers from genetically engineered *Bacillus thuringiensis* strains. **Applied and Environmental Microbiology, 63**:779-784.

162. Sanchis, V., Gohar, M., Chaufaux, J., Arantes, O., Meier, A., Agaisse, H., Cayley, J., Lereclus, D., 1999. Development and field performance of a broad-spectrum nonviable asporogenic recombinant strain of *Bacillus thuringiensis* with greater potency and UV resistance. **Applied and Environmental Microbiology 65**:4032-4039.

163. Kegley, S.E., Hill, B.R., Orme, S., Choi, A.H., 2011. PAN Pesticide Database, Pesticide Action Network, North America (San Francisco, CA). http://www.pesticideinfo.org.

164. Song, R., Peng, D., Yu, Z., Sun, M., 2008. Carboxy-terminal half of Cry1C can help vegetative insecticidal protein to form inclusion bodies in the mother cell of *Bacillus thuringiensis*. **Applied Microbiology and Biotechnology, 80:**647-654.

165. Chankhamhaengdecha, S.T., Tantichodok, A., Panbangred, W., 2008. Spore stage expression of a vegetative insecticidal gene increase toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai* SP41 against *Spodoptera exigua*. **Journal of Biotechnology**,**136**:122-128.

166. Kevany, B.M., Rasko, D.A., Thomas, M.G., 2009. Characterization of the complete zwittermicin A biosynthesis gene cluster from *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**,**75**:1144-1155.

167. Liu, D., 2009. Design of gene constructs for transgenic maize. In: Scott MP (ed) Methods in molecular biology: transgenic maize, vol 526. Humana Press, a part of Springer Science Business Media, USA.

168. Klimowicz, A.K., Benson, T.A., Handelsman, J., 2010. A quadruple-enterotoxin-deficient mutant of *Bacillus thuringiensis* remains insecticidal. **Microbiology 156**:3575-3583.

169. Gonzalez, J.M., Carlton, B.C., 1980. Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrystalliferous strains of *Bacillus thuringiensis*. **Plasmid, 3**:92-98.

170. Alikhanian, S.I., Ryabchenko, N.F., Bukanov, N.O., Sakanyan, V.A., 1981. Transformation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleria* protoplasts by plasmid pBC16. **Journal of Biotechnology**,**146**:7-9.

171. Martin, P.A., Lohr, J.R., Dean, D.H., 1981. Transformation of *Bacillus thuringiensis* protoplasts by plasmid deoxyribonucleic acid. **Journal of Biotechnology**,**145**:980-983.

172. Heierson, A., Landén, R., Lövgren, A., Dalhammar, G., Boman, H.G., 1987. Transformation of vegetative cells of *Bacillus thuringiensis* by plasmid DNA. **Journal of Biotechnology**,**169**:1147-1152.

173. Bone, E.J., Ellar, D.J., 1989. Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation. **FEMS Microbiology Letters**, **58**:171-178.

174. Lereclus, D., Arantes, O., Chaufaux, J., Lecadet, M.M., 1989. Transformation and expression of a cloned endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters, 60**:211-218.

175. Mahillon, J., Chungiatupornchai, W., Decock, J., Dierickx, S., Michiels, F., Peferoen, M., Joos, H., 1989. Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation. **FEMS Microbiology Letters, 60**:205-210.

176. Masson, L., Prefontaine, G., Brousseau, R., 1989. Transformation of *Bacillus thuringiensis* vegetative cells by electroporation. **FEMS Microbiology Letters 60**:273-278.

177. Schurter, W., Geiser, M., Mathe, D., 1989. Efficient transformation of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* via electroporation: transformation of acrystalliferous strains with a cloned delta-endotoxin gene. **Molecular and General Genetics, 218**:177-181.

178. Macaluso, A., Mettus, A.M., 1991. Efficient transformation of *Bacillus thuringiensis* requires nonmethylated plasmid DNA **Journal of Bacteriology, 173**:1353-1356.

179. Peng, D., Luo, Y., Guo, S., Zeng, H., Ju, S., Yu, Z., Sun, M., 2009. Elaboration of an electroporation protocol for large plasmids and wild-type strains of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Microbiology**, **106**:1849-1858.

180. Pigott, C.R., Ellar, D.J., 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**; **71**:255-281.

181. Bravo, A., Gomez, I., Conde, J., Munoz-Garay, C., Sanchez, J., Miranda, R., et al., 2004; Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab poreforming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. **Biochimica et Biophysica Acta 1667**:38-46.

182. Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B., Rose-Young, L., Bulla, L.A., 2005. Cytotoxicity *of Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. **Cell Death & Differentiation, 12**:1407-1416.

183. Kumar, A.S., Aronson, A.I., 1999. Analysis of mutations in the pore-forming region essential for insecticidal activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. **Journal of Bacteriology**, **181**:6103-6107.

184. Vachon, V., Prefontaine, G., Rang, C., Coux, F., Juteau, M., Schwartz, J.L., et al., 2004. Helix 4 mutants of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa display altered pore-forming abilities. Appl Environ Microbiol; 70:6123-30.

185. Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B., Taussig, R., Bulla, L.A.., 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis.* Proc Natl Acad Sci USA; 103:9897-902.

186. Griko, N.B., Rose-Young, L., Zhang, X., Carpenter, L., Candas, M., Ibrahim, M.A., et al., 2007. Univalent binding of the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* to a conserved structural motif in the cadherin receptor BT-R1. **Biochemistry**, **46**:10001-10007.

187. Masson, L., Mazza, A., Gringorten, L., Baines, D., Aneliunas, V., Brousseau, R., 1994. Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins is highly dependent on the bioassay system. **Molecular Microbiology**, **14**:851-860.

188. Dorsch, J.A., Candas, M., Griko, N.B., Maaty, W.S., Midboe, E.G., Vadlamudi, R.K., et al., 2002. Cry1A toxins of *Bacillus thuringiensis* bind specifically to a region adjacent to the membrane-proximal extracellular domain of BT-R(1) in *Manduca sexta:* involvementof a cadherin in the entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis.* **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, **32:**1025-1036.

189. Tsuda, Y., Nakatani, F., Hashimoto, K., Ikawa, S., Matsuura, C., Fukada, T., et al., 2003. Cytotoxic activity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins on mammalian cells transfected with cadherin-like Cry receptor gene of *Bombyx mori* (silkworm). **Biochemical Journal**, **369**:697-703.

190. Liu, C., Wu, K., Wu, Y., Gao, Y., Ning, C., Oppert, B., 2009. Reduction of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxicity against *Helicoverpa armigera* by a soluble toxinbinding cadherin fragment. **Journal of Insect Physiology**,**55**:686-693.

191. Ferre, J., Real, M.D., Van Rie, J., Jansens, S., Peferoen, M., 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences, 88**:5119-5123.

192. Tabashnik, B.E., Finson, N., Johnson, M.W., Heckel, D.G., 1994. Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIF in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). **Applied and Environmental Microbiology**, **60:**4627-4629.

193. Loseva, O., Ibrahim, M., Candas, M., Koller, C.N., Bauer, L.S., Bulla, L.A., 2002. Changes in protease activity and Cry3Aa toxin binding in the Colorado potato beetle: implications for insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology, 32**:567-577.

194. Candas, M., Loseva, O., Oppert, B., Kosaraju, P., Bulla, L.A., 2003. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis:* alterations in the Indianmeal moth larval gut proteome. **Molecular & Cellular Proteomics**, **2**:19-28.

195. Vadlamudi, R.K., Weber, E., Ji, I., Ji, T.H., Bulla, L.A., 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis.* **Journal of Biological Chemistry**, **270**:5490-5494.

196. Gahan, L.J., Gould, F., Heckel, D.G., 2001. Identification of a gene associated with *Bacillus thuringiensis* resistance in *Heliothis virescens.* **Science; 293**:857-860.

197. Theis, T., Stahl, U., 2004. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, **61**:437-455.

198. Felse, P.A., Panda, T., 1999. Regulation and cloning of microbial chitinase genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **51**:141-151.

199. Chernin, L., Ismailov, Z., Haran, S., Chet, I., 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, **61**:1720-1726.

200. Kobayashi, D.Y., Reedy, R.M., Bick, J.A., Oudemans, P.V., 2002. Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvementin biological control. **Applied and Environmental Microbiology**, **68**:1047-1054.

201. Freeman, S., Minzm, O., Kolesnik, I., Barbul, O., Zveibil, A., Maymon, M., Nitzani, Y., Kirshner, B., Rav-David, D., Bilu, A., Dag, A., Shafir ,S., Elad,Y., 2004. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. **European Journal of Plant Pathology**, 110:361-370.

202. Reyes-Ramirez, A., Escudero-Abarca, B.I., Aguilar-Uscanga, G., Hayward-Jones, P.M., Barboza-Corona, J.E., 2004. Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis*

chitinase and its potential for the biocontrol of phytopathogenic fungi in soybean seeds. **Journal of Food Science**, **69**:131-134.

203. http://www.ncbi.nlm.nih.gov

204. Watanabe, T., Kobori, K., Miyashita, K., Fujii, T., Sakai, M., Uchida, M., Tamaka, H., 1993. Identification of glutamic acid 201 and aspartic 200 in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12 as essential residues for chitinase activity. **Journal of Biological Chemistry**, **268**:18567-18572.

205 Thamthiankul, S., Suan-Ngay, S., Tantimavanich, S., Panbangred, W., 2001. Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *pakistani*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **56:**395-401.

206. Barboza-Corona, J.E., Nieto-Mazzocco, E., Velázquez-Robledo, R., Salcedo-Hernández, R., Bautista, M., Jiménez, B., Ibarra, J.E., 2003. Cloning, sequencing and expression of the chitinase gene *chiA74* from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology, 69:**1023-1029.

207. Barboza-Corona, J.E., Reyes-Rios, D.M., Salcedo-Hernández, R., Bideshi, D., 2008. Molecular and biochemical characterization of an endochitinase (ChiA-HD73) from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73. **Molecular Biotechnology** 39:29ï 37.

208. Rojas Avelizapa, L.I., Cruz-Camarillo, R., Guerrero, M.I., Rodríguez-Vázquez, R., Ibarra, J.E., 1999. Selection and characterization of proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis* able to grow in shrimp waste media. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, **15**:299-308.

209. Park, H.W., Ge, B., Bauer, L.S., Federici, B.A., 1998. Optimization of Cry3A yields in *Bacillus thuringiensis* by use of sporulation-dependent promoters in combination with the STAB-SD mRNA sequence. **Applied and Environmental Microbiology**, **64**:3932-3938.

210. Morales de la Vega, L., Barboza-Corona, J.E., Aguilar-Uscanga, M.G., Ramírez-Lepe, M., 2006. Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* ssp. *aizawai* and its action against phytopathogenic fungi. **Canadian Journal of Microbiology, 52**:651-657.

211. Bhattacharya, D., Nagpure, A., Gupta, R.K., 2007. Bacterial chitinases: properties and potential. **Critical Reviews in Biotechnology**, **27**:21-28.

212. Barboza-Corona, J.E., de la Fuente-Salcido, N.M., León-Galván, M.F., 2012. Future Challenges and Prospects of *Bacillus thuringiensis.* Sansinenea E., Ed. *Bacillus thuringiensis* Biotechnology, Chapter 19. pp. 367-384.

213. Faramarzi, M.A., Stagars, M., Pensini, E., Krebs, W., Brandl, H., 2004. Metal solubilization from metal-containing solid materials by cyanogenic *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Biotechnology**, **113**:321-326.

214. Gallagher, L.A., Manoil, C., 2001. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning **Journal of Biotechnology**, **183**:6207-6214.

215. Firoved, A.M., Deretic, V., 2003. Microarray analysis of global gene expression in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, **185**:1071-1081.

216. Sharifi-Tehrani, A., Zala, M., Natsch, A., Moenne-Loccoz, Y., Défago, G., 1998. Biocontrol of soilborne fungal plant diseases by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent pseudomonads with different restriction profiles of amplified 16S rDNA. **European Journal of Plant Pathology**, **104**:631-643.

217. del Pozo, J.C., Lopez-Matas, M.A., Ramirez-Parra, E., Gutierrez, C., 2005. Hormonal control of the plant cell cycle. **Physiology Plant**, **123**:173-183.

218. Patten, C.L., Glick, B.R., 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, **68**:3795-3801,

219. Glickmann, E., Gardan, L., Jacquet, S., Hussain, S., Elasri, M., Petit, A., Dessaux, Y., 1998. Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**,**11**:156-162.

220 Sergeeva, E., Liaimer, A., Bergman, B., 2002. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. **Planta, 215**:229-238.

221. Glick, B.R., Patent, C.L., Holguim, G., Penrose, D.M., 1999. Biochemicaland Ggenetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria, ICP, Covent Garden, London.

222. Liu, S.T., Perry, K.L., Schardl, C.L., Kado, C.L., 1982. *Agrobacterium* Ti plasmid indoleacetic acid gene is required for crown gall oncogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **79:**2812-2816.

223. White, F.F., Ziegler, S.F., 1991. Cloning of the genes for indoleaceticacid synthesis from *Pseudomonas syringae* pv.*syringae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **4:**207-210.

224. Prinsen, E., Costacurta, A., Michiels, K., Vanderleyden, J., Van Onckelen, H., 1993. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non tryptophan dependent pathway. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **6:**609-615.

225. Broek, A.V., Lambrecht, M., Eggermont, K., Vanderleyden, J., 1999. Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, **181**:1338-1342.

226. Yagi, K., Chujo, T., Nojiri, H., Omori, T., Nishiyama, M., Yamane, H., 2001. Evidence for the presence of DNA-binding proteins involved in regulation of the expression of indole-3-pyruvic acid decarboxylase, a key enzyme in indole-3-acetic acid biosynthesis in *Azospirillum lipoferum*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 65**:1265-1269.

227. Raddadi, N., Cherif, A., Ouzari, H., Marzorati, M., Brusetti, L., Boudabous, A., Daffonchio, D., 2007. *Bacillus thuringiensis* beyond insect biocontrol: plant growth promotion and biosafety of polyvalent strains. **Annals of Microbiology**, **57**:481-494.

228. Abeles, F., Morgan, P., Saltveit, M., 1992. Ethylene in Plant Biology, 2nd edn, Academic Press, New York.

229. Deikman, J., 1997. Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription. **Physiology Plant**, **100:**561-566.

230. Hontzeas, N., Zoidakis, J., Glick, B.R., Abu-Omar, M.M., 2004. Expression and characterization of 1-aminocyclopropane-1- carboxylate deaminase from the rhizobacterium *Pseudomonas putida* UW4: a key enzyme in bacterial plant growth promotion. **Biochimica et Biophysica Acta**,**1703:**11-19.

231. Wenbo, M., Sebestianova, S.B., Sebestian, J., Burd, G.I., Guinel, F.C., Glick, B.R., 2003. Prevalence of 1-aminocyclopropane- 1-carboxylate deaminase in *Rhizobium* spp. **Antoine van Leeuwenoek**, **83:**285-291.

232. Ghosh, S., Penterman, J.N., Little, R.D., Chavez, R., Glick, B.R., 2003. Three newly isolated plant growth-promoting *Bacilli facilitate* the seedling growth of canola, *Brassica campestris*. **Plant Physiology and Biochemistry**, **41**:277-281.

233. Glick, B.R., 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, 251:1-7.

234. Minami, R., Uchiyama, K., Murakami, T., Kawai, J., Mikami, K., Yamada, T., Yokoi, D., Ito, H., Matsui, H., Honma, M., 1998. Properties, sequence, and synthesis in *Escherichia coli* of 1- aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Hansenula saturnus*. **Journal of Biochemistry**, **123**:1112-1118.

235. Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil,** 255:571-586.

236. Douds, D.D., Nagahashi, G., Pfeffer, P.E., Kayser, W.M., Reider, C., 2005. On-farm production and utilization of arbuscular mycorrhizal fungus inoculum. **Canadian Journal of Plant Science**, **85**:15-21.

237. Grant, C.A., Bailey, L.D., Harapiak, J.T., Flore, N.A., 2002. Effect of phosphate source, rate and cadmium content and use of *Penicillium bilaii* on phosphorus, zinc and cadmium concentration in durum wheat grain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **82**:301-308.

238. Wakelin, S.A., Warren, R.A., Ryder, M.H., 2004. Effect of soil properties on growth promotion of wheat by *Penicillium radicum*. **Australian Journal of Soil Research**, **42:**897-904.

239. Mukherjee, P.K., Rai, R.K., 2000. Effect of vesicular arbuscular mycorrhizae and phosphate-solubilizing bacteria on growth, yield and phosphorus uptake by wheat (*Triticum aestivum*) and chickpea (*Cicer arietinum*). **Indian Journal of Agronomi**, **45**:602-607.

240. Wu, S.C., Cao, Z.H., Li, Z.G., Cheung, K.C., Wong, M.H., 2005. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. **Geoderma**, **125:**155-166.

241. Glass, A.D.M., 1989. Plant Nutrition: An Introduction to Current Concepts. Jones and Bartlett Publishers, Boston, MA, USA.

242. Goldstein, A.H., 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. **American Journal of Alternative Agriculture**, **1**:51-57.

243. Pal, S.S., 1998. Interactions of an acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerant crops, **Plant Soil, 198**:169-177.

244. Rodriguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**,**17**:319-339.

245. Nautiyal, C.S., Bhadauria, S., Kumar, P., Lal, H., Mondal, R., Verma, D., 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. **FEMS Microbiology Letters**, **182**:291-296.

246. Richardson, A.E., 2001. Prospects for using soil microorganisms toimprove the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, **28**:897-906.

247. Singh, S., Kapoor, K.K., 1999. Inoculation with phosphate solubilizing microorganisms and a vesicular arbuscular mycorrhizalfungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. **Biology and Fertility of Soils**, **28:**139-144.

248. Çakmakçi, R., Kantar, F., Algur, Ö.F., 1999. Sugar beet and barley yields in relation to *Bacillus polymyxa* and *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* inoculation. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, **162**:437-422.

249. Kobayashi, T., Suzuki, M., Inoue, H., Itai, R.N., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa, N.K., 2005. Expression of iron-acquisition-related genes in iron-deficient rice is co-ordinately induced by partially conserved iron-deficiency-responsive elements. **Journal of Experimental Botany**, **56**:1305-131.

250. von Wiren, N., Khodr, H., Hider, R.C., 2000. Hydroxylated phytosiderophore species possess an enhanced chelate stability and affinity for iron (III). **Plant Physiology, 124:**1149-1157.

251. Crosa, J.H., Walsh, C.T., 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **66**:223-249.

252. Yehuda, Z., Shenker, M., Romheld, V., Marschner, H., Hador, Y., Chen, Y., 1996. The role of ligand exchange in the uptake of iron frommicrobial siderophores by gramineous plant. **Plant Physiology**, **112**:1273-1280.

253. Sharma, A., Johri, B.N., Sharma, A.K., Glick, B.R., 2003. Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). **Soil Biology and Biochemistry**, **35**:887-894.

254. Masalha, J., Kosegarten, H., Elmaci, Ö., Mengel, K., 2000. The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. **Biology and Fertility of Soils**, **30**:433-439.

255. Park, R.Y., Choi, M.H., Sun, H.Y., Shin, S.H., 2005. Production of catechol-siderophore and utilization of transferrin-bound iron in *Bacillus cereus*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, **28**:1132-1135.

256. Cendrowski, S., MacArthur, W., Hanna, P., 2004. *Bacillus anthracis* requires siderophore biosynthesis for growth in macrophages and mouse virulence. **Molecular Microbiology**, **51**:407-417.

257. Wilson, M.K., Abergel, R.J., Raymond, K.N., Arceneaux, J.E.L., Byers, B.R., 2006. Siderophores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **348**:320-325.

258. Park, H.W., Federici, B.A., Sakano, Y., 2006. Inclusion proteins from other insecticidal bacteria. In: Shively JM (ed) Microbiology monographs, Vol., 1, ñInclusions in Prokaryotesò. Springer, Heidelberg, pp 321ï 330.

259. Barboza-Corona, J.E., Vázquez-Acosta, H., Bideshi, D., Salcedo-Hernández, R., 2007. Bacteriocin-like inhibitor substances production by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. **Archives of Microbiology, 187**:117-126.

260. Olempska-Beer, Z.S., Merker, R.I., Ditto, M.D., DiNovi, M.J., 2006. Food-processing enzymes from recombinant microorganism. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, **45**:144-158.

261. Yeh, C.M., Wang, J.P., Su, F.S., 2007. Extracellular production of a novel ice structuring protein by *Bacillus subtilis*-a case of recombinant food peptide additive production. **Food Biotechnology**, **21**:119-128.

262. Siegel, J.P., 2001. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. **Journal of Invertebrate Pathology, 77**:13-21.

263. Tamez-Guerra, P., Valadez-Lira, J.A., Alcocer-Gonzalez, J.M., Oppert, B., Gomez-Flores, R., Tamez-Guerra, R., Rodriguez-Padilla, C., 2008. Detection of gene encoding antimicrobial peptides in Mexican strains of *Trichoplusia ni* (Hübner) exposed to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology, 98:**218-227.

264. Park, H.W., Federici, B.A., 2009. Genetic engineering of bacteria to improve efficacy using the insecticidal proteins of *Bacillus* species. In: Stock SP, Vandenberg J, Glazer I, Boemare N (eds) Insect pathogens-molecular approaches and techniques. CABI Publishing, Cambridge, pp 275-305.

265. De la Fuente Salcido, N.M., Barboza-Corona, J.E., 2006. Duality of *Bacillus thuringiensis*: bioinsecticide and biopreservative. **Cienc Acierta, 6:**27-28.

266. Loeb, M.J., Hakim, R.S., Martin, P., Narang, N., Goto, S., Takeda, M., 2000. Apoptosis in cultured midgut cells from *Heliothis virescens* larvae exposed to various conditions. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, **45**:12-23.

267. Sun, J., Griko, N., Ibrahim, M., Zhang, X., Bulla, L.A., 2008. Genome-bases technology for discovery, identification and validation of insecticide and drug targets. **Trends in Comparative Biochemistry and Physiology, 13**:1-10.

268. http://zipcodezoo.com/Animals/E/Ephestia_kuehniella/

269. Trematerra, P., Gentile, P., 2010. Five years of mass trapping of *Ephestia kuehniella* Zeller: a component of IPM in a flour mill. **Journal of Applied Entomology**, **134**: 149-156,

270. Yđlmaz, S., 2010. Çeкitli Habitatlardan Kşole Edilen *Bacillus thuringiensis* Suкlarēnēn Moleküler Karakterizasyonu ve Bazē Zararlē Böceklere Karкē Mücadelede Kullanēmē Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, sf.,.159.

271. Ayvaz, A., Tunçbilek, A.ş., 2006. Effects of gamma radiation on life stages of the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Pest Science**, **79:** 215-222.

272. Azizoglu, U., Yđlmaz, S., Karaborklu, S., Ayvaz, A., 2011. Ovicidal activity of microwave and UV radiations on Mediterranean þour moth *Ephestia kuehniella* Zeller, 1879 (Lepidoptera: Pyralidae). **Türkiye Entomoloji Dergisi**, **35**: 437446.

273. Wirtz, R., 1908. Eine einfache Art der Sporenfarbung. Zentralblatt fir Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. **Abteilung 1, Originale 46**: 727-728.

274. Bravo, A., et al., 1998. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, 4965-4972.

275. Jensen, G.B., et al., 1995. The genetic basis of the aggregation system in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is located on the large conjugative plasmid pXO16**. Journal of Bacteriology**, **177:** 2914-2917.

276. Porcar, M., et al., 1999. Identification and characterization of the new *Bacillus thuringiensis* serovars *pirenaica* (serotype H57) and *iberica* (serotype H59). **Journal of Applied Microbiology**, **87**:640-648.

277. Temizkan, G., Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.

278. Steel, R.G.D., Torrie, J.H., 1980. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach, MacGraw-Hill, New York.

279. Stobdan, T., Kaur, S., Singh, A., 2004. Cloning and nucleotide sequence of a novel *cry* gene from *Bacillus thuringiensis*ò **Biotechnology Letters**, **26:**1153-1156.

280. Misra, H., Khairnar, N.P., Mathur, M., Vijayalakshmin, N., Hire, R.S., Dongre, T.K., Mahajan, S.K., 2002. ñCloning and characterization of an insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kenyae*. **Journal of Genetics**, **81**: 5-11.

281. Reddy, P.V., Narasimha Rao, N., Vimala Devi, P.S., Sivaramakrishnan, S., Lakshmi Narasu, M., Dinesh Kumar, V., 2013. Cloning, characterization and expression of a new *cry1Ab* gene from DOR *Bt*-1, an Indigenous Isolate of *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Biotechnology**, **54**:795-802

282. Kandibane, M., Kumar, K., Adiroubane, D., 2010. Effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner formulation against the rice leaf folder *Cnaphalocrocis medinalis* Guenee (Pyralidae: Lepidoptera). **Journal of Biopesticides**, 3: 445-447.

283. Widner, W.R., Whiteley, H.R., 1989. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* possess different host range specificities**. Journal of Bacteriology**, **171**:965-974.

284. Cheng, J.C., Hsieh, F.C., Liu, B.L., Kao, S.S., 2005. Cloning and expression of *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1C* and *cry1Da* Genes from *Bacillus thuringiensis* var. Aizawai, 6 th Pacific Rim Conference on the Biotechnology, of *Bacillus thuringiensis* and its Environmental Impact, Victoria BC.

285. Saleem, F., Shakoori, A.R., 2010. Characterization of *cry2A*-type gene(s) from Pakistani isolates of *Bacillus thuringiensis* toxic to Lepidopteran and Dipteran Insects. **Pakistan Journal of Zoology**, **42**:181-193.

286. Zhang, Y., Zhenga, G., Tanb, J., Li, C., Chenga, L., 2013. Cloning and characterization of a novel *cry8Ab1* gene from *Bacillus thuringiensis* strain B-JJX with specific toxicity to Scarabaeid (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. **Microbiological Research, 168**:512-517.

287. Kuo, W.S., Chak, K.F., 1996. Identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR amplified DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, **62**:1369-1377.

288. Noguera, P.A., Ibarra, J.E., 2010. Detection of new *cry* genes of *Bacillus thuringiensis* by use of a novel PCR primer system. **Applied and Environmental Microbiology**, **76**:6150-6155.

289. Shu, C., Yan, G., Wang, R., Zhang, J., Feng, S., Huang, D., et al., 2009. Characterization of a novel *cry8* gene specific to Melolonthidae pests: *Holotrichia oblita* and *Holotrichia parallela*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **84**:701-707.

290. Crickmore, N., 2013. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http://www.lifesci. sussex.ac.uk/home/Neil Crickmore/Bt/. [accessed 07.01.13].

291. Sato, R., Takeuchi, K., Ogiwara, K., Minami, M., Kaji, Y., Suzuki, N., et al., 1994. Cloning heterologous expression and localization of a novel crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui toxic to scarabaeid insects. **Current Microbiology, 28**:15-19.

292. Shu, C., Liu, R., Wang, R., Zhang, J., Feng, S., Huang, D., et al., 2007. Improving toxicity of *Bacillus thuringiensis* strain contains the *cry8Ca* gene specific to *Anomala corpulenta* larvae. **Current Microbiology, 55**:492-496.

293. Liu, J., Yan, G., Shu, C., Zhao, C., Liu, C., Song, F., et al., 2010. Construction of a *Bacillus thuringiensis* engineered strain with high toxicity and broad pesticidal spectrum against coleopteran insects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **87**:243-249.

294. Carlson, C.R., Johansen, T., Kolsto, A.B., 1996. The chromosome map of *Bacillus thuringiensis* subsp. *canadensis* HD224 is highly similar to that of the *Bacillus cereus* type strain ATCC 14579. **FEMS Microbiology Letters**, **141**:163-167.

295. Vilas-Boas, G.T., Lemos, M.V., 2004. Diversity of *cry* genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, **50**:605-613.

296. Liu, X., Zhang, W., Liu, Z., Cai, Y., Li, Y., Fang, X., 2010, Characterization of a new Highly toxic isolate of *Bacillus thuringiensis* from the diapausing larvae of silkworm and identification of *cry1A 22* gene. ***Bt* Research**, 1:1-10.

297. Shu, C., Zhang, J., Chen, G., Liang, G., He, K., Crickmore, N., Huang, D., Zhang, J., Song, F., 2103. Use of a pooled clone method to isolate a novel *Bacillus thuringiensis* Cry2A toxin with activity against *Ostrinia furnacalis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, **114**:31ï 33.

298. Liao, C., Heckel, D.G., Akhurst, R., 2002. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins for *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera:Noctuidae), major pests of cotton. **Journal of Invertebrate Pathology**, **80**:55-63.

299. Zheng, A.P., Zhu, J., Tan, F.R., Guan, P., Yu, X.M., Wang, S.Q., Deng, Q.M., Li, S.C., Liu, H.N., Li, P., 2010. Characterisation and expression of a novel haplotype *cry2A* type gene from *Bacillus thuringiensis* strain JF19-2. **Annals of Microbiology, 60**:129-134.

300. McNeil, B.C., Dean, D.H., 2011. *Bacillus thuringiensis* Cry2Ab is active on *Anopheles mosquitoes*: single D block exchanges reveal critical residues involved in activity. **FEMS Microbiology Letters**, **325**:16-21.

301. Xue, J., Liang, G., Crickmore, N., Li, H., He, K., Song, F., Feng, X., Huang, D., Zhang, J., 2008. Cloning and characterization ofa novel Cry1A toxin from *Bacillus thuringiensis* with high toxicity to the Asian corn borer and other lepidopteran insects. **FEMS Microbiology Letters, 280**:95-101.

302. Robertson, J.L., Preisler, H.K., 1992. Pesticide Bioassays with Arthropods. CRC Press, Boca Raton, FL.

303. Darsi, S., Prakash, G.D., Udayasursiyan, V., 2010. Cloning and characterization of truncated cry1Ab gene from a new indigenous isolate of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology Letters**, **32**:1311-1315.

304. López-Pazos, S.A., Gómez J.E.C., Salamanca, J.A.C., 2009. Cry1B and Cry3A are active against *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae). **Journal of Invertebrate Pathology, 101**:242-245.

305. Zhu, J., Zheng, A., Wang, S., Liu, H., Li, P., 2010. Characterization and expression of *cry4Cb1* and *cry30Ga1* from *Bacillus thuringiensis* strain HS18-1. **Journal of Invertebrate Pathology, 103**:200-202.

306. Bukhari, D.A.A., Shakoori, A.R., 2009. Cloning and expression of *Bacillus thuringiensis cry11* crystal protein gene in *Escherichia coli*. Molecular. **Biology Reports**, **36**:1661-1670.

307. Sharma, P., Nain, V., Lakhanpaul, S., Kumar, P.A., 2010. Synergistic activity between *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab and Cry1Ac toxins against maize stem borer (*Chilo partellus* Swinhoe). **Letters in Applied Microbiology**, **51**:42-47.

308. Lee, M.K., Milne, R.E., Albert, Z.G., Dean, D.H., 1992. Location of a *Bombyx mori* receptor binding region on a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. **Journal of Biological Chemistry**, **267**:3115-3121.

309. Lee, M.K., Curtiss, A., Alcantara, E., Dean, D.H., 1996. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAc on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. **Applied and Environmental Microbiology**, **62**:583-586.

310. Xue, J.L., Cai, Q.X., Zheng, D.S., Yuan, Z.M., 2005. The synergistic activity between Cry1Aa and Cry1c from *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera*. **Letters in Applied Microbiology**, **40**:460-465.

311. Chakrabarti, S.K., Mandaokar, A.D., Kumar, P.A., Sharma, R.P., 1998. Synergistic effect of Cry1Ac and Cry1F deltaendotoxons of *Bacillus thuringiensis* on cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Current Science**,**75**:663-664.

312. Peng, D., Chai, L., Wang, F., Zhang, F., Ruan, L., Sun, M., 2011. Synergistic activity between *Bacillus thuringiensis* Cry6Aa and Cry55Aa toxins against *Meloidogyne incognita*. **Microbial Biotechnology**, **4**:794-798 .

313. Hire, R.S., Makde, R.D., Dongre, T.K., Stanislaus, F.D., 2009. Expression, purification and characterization of the Cry2Aa14 toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae*. **Toxicon**, **54**:519-524.

ÖZGEÇMİŞ



Adı Soyadı: Uğur AZİZOĞLU

Adres: Erciyes Üniversitesi Toki küme evleri C3-11 4 Kat No:19 TALAS\KAYSERİ

Cep Telefonu: 0537 596 22 66

E-mail: azizoglu@erciyes.edu.tr, azizogluugur@hotmail.com

KİŞİSEL BİLGİLER

Uyruğu: T.C

Doğum Yeri: Hakkâri

Doğum Tarihi: 17.09.1985

Medeni Durumu: Bekâr

Askerlik Durumu: Tecilli (30.11.2016) (Üniversite Tarafından)

KISA ÖZGEÇMİŞ

Hakkâri'de 1985 yılında doğan Uğur AZİZOĞLU, bankacı babanın ve ev hanımı annenin oğludur. İlköğretim ve Lise eğitimini Ankara'da tamamlamıştır. Babası halen Ankara'da banka emeklisi olarak yaşamaktadır. Lise mezunu bir kız kardeşi, bir sigorta şirketinde çalışan ablası, özel bir şirkette çalışan abisi ve ev hanımı olan bir ablası, toplam dört kardeşi bulunmaktadır.

EĞİTİM DURUMU

2009 ı 2014 **Doktora Öğrenimi:** Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı, Kayseri

2007 - 2009 **Yüksek Lisans Öğrenimi**: Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı, Kayseri,

2003-2007 **Lisans Öğrenimi:** Erciyes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Lisans Programı, Kayseri,

1999 - 2002 **Lise Öğrenimi:** Rauf Denktaş Lisesi; Ankara,

1996 - 1999 **Ortaokul Öğrenimi:** Fevzi Atlığoğlu İlköğretim Okulu, Ankara

1991 - 1996 **İlkokul** Öğrenimi**:** İçenlik İlkokulu, Ankara

I - BİLİMSEL AKTİVİTELER, EĞİTİMLER ve ÇALIŞMALAR

A-PROJELER

0802.TGSD "Yerel *Bacillus thuringiensis* Suşlarına Ait Dipter Ve Lepidopter Zararlılarına Yönelik Cry1 Ve Cry2 Genlerine Ait Toksin Prototiplerinin Üretilmesi", Diğer Kurumlarca Desteklenen, 2104. Araştırmacı

ÖNAP-3638 "Etkili Yerel *Bacillus thuringiensis* Suşlarına Ait *cry* Genlerinin Klonlanması, Eşlade Ettirilmesi ve Çeşitli Zararlı Böcekler Üzerine Etkinliklerinin Araştırılması" 2104. Araştırmacı

FBD11-3634 "Lepidopter Zararlılarına Karşı Etkinliği Belirlenmiş Olan Yerel *Bacillus thuringiensis* SY49.1 Suşunun *cry1B* Genin Klonlanması, Ekspresyonu ve İnsektisidal Aktivitesinin Belirlenmesi" Erciyes Üniversitesi, Doktora Tez Projesi, 2104 Araştırmacı

FBY08-568 "Izolanmış Böcek Larvaları Üzerine Tarım Arazilerinden İzole Edilen *Bacillus thuringiensis* Toksinlerinin Etkisi" Erciyes Üniversitesi, Yüksek Lisans Tez Projesi, 2009. Araştırmacı

B-TEZ ÇALIŞMALARI

Doktora: Azizoğlu Uğur, "*Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşuna Ait *cry1* ve *cry2* Genlerinin Klonlanması, İşlemi ve Böcek Öldürücü Etkilerinin Belirlenmesi" Erciyes Üniversitesi, Temmuz 2014.

Yüksek Lisans: Azizoğlu Uğur**,** Ultraviyole Radyasyonuyla Izolanmış *Ephestia kuehniella* ve *Plodia interpunctella* Larvaları Üzerine Tarım Arazilerinden İzole Edilen *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Etkisi" Erciyes Üniversitesi, Temmuz 2009,

Lisans Azizoğlu Uğur **,** "Bitkisel Uçucu Yağların Depolanmış Ürün Zararlısı Böcekler Üzerindeki Öldürücü Etkisi", Erciyes Üniversitesi, Temmuz 2007,

C- GÖREVLER

Tübitak, Ortaöğretim Öğrencileri Arası Araştırma Projeleri Bölge Yarışmaları, 06-10 Nisan 2009 Kayseri, Bölge Rehberi

Tübitak, Ortaöğretim Öğrencileri Arası Araştırma Projeleri Bölge Yarışmaları, 04-09 Mart 2008 Kayseri, Bölge Rehberi

D-YAYINLANMIŞ ve YAYINLANACAK MAKALELER

A. Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

A1. Salih Karabörklü, Abdurrahman AYVAZ, Semih Yıldmaz, **Ugur Azizoglu**, Mikail Akbulut "Native entomopathogenic nematodes isolated from Turkey and their effectiveness on pine processionary moth, *Thaumetopoea wilkinsoni* Tams" International Journal of Pest Management, 2014 (Yayına gönderildi).

A2. Sunay Tekin, Semih Yilmaz, Abdurrahman Ayvaz, **Ugur Azizoglu**" Molecular screening and bioactivity of native *Bacillus thuringiensis* isolates" Journal of Agriculture Science and Technology 2014. (Yayına gönderildi).

A3. Semih Yıldmaz, Salih Karabörklü, **Ugur Azizoglu**, Abdurrahman AYVAZ, Mikail Akbulut, Musa Yıldız, "Toxicity of native *Bacillus thuringiensis* isolates on the larval stages of pine processionary moth *Thaumetopoea pityocampa* at different temperatures" Turkish Journal of Agriculture and Forestry, vol.37, pp.163-172, 2013

A4. Semih Yilmaz, Abdurrahman Ayvaz, Mikail Akbulut, **Ugur Azizoglu**, Salih Karaborklu"A novel *Bacillus thuringiensis* strain and its pathogenicity against three important pest insects" Journal of Stored Product Research, 51 :33-40, 2012.

A5. **Ugur Azizoglu,** Semih Yilmaz, Abdurrahman Ayvaz, Salih Karabörklü, Mikail Akbulut " Characterization of local *Bacillus thuringiensis* isolates and their toxicity against *Ephestia kuehniella* and *Plodia interpunctella* larvae" Egyptian Journal of Biological Pest Control, 21(2): 143-150, 2011.

A6. **Ugur Azizoglu**, Semih Yıldmaz, Salih Karabörklü, Abdurrahman Ayvaz "Ovicidal activity of microwave and UV radiations on mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* Zeller", Turkish Journal of Entomology, 35(3):437-446, 2011.

A7. Semih Yıldmaz, Nurettin Demirezen, **Ugur Azizoglu**, Salih Karabörklü, Abdurrahman Ayvaz, Mikail Akbulut, Sunay Tekin, "Identification of Some *cry1* Genes and Toxicity Determination in *Bacillus thuringiensis* Isolates Obtained from Mills and Warehouses in Turkey", Egyptian Journal of Biological Pest Control, 21(2): 189-195, 2011.

B.Ulusal Hakemli Dergilerde Yayēnlanan Makaleler

B1. **Uĵur Azizoĵlu,** Sancar Bulut, Semih Yēlmaz, ñOrganik Tarēmda Biyolojik Mücadele; Entomopatojen Biyoinsektisitlerò Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, cilt.28, ss.375-381, 2012

B2. **Uĵur Azizoĵlu,** Salih Karabörklü, Semih Yēlmaz, Abdurrahman Ayvazñ Mikrodalga radyasyonunun *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) erginleri üzerindeki öldürücü etkisiò Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 26(4); 323-327, 2010.

E-BĶLĶMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN VE BASILAN BĶLDĶRĶLERĶ

1. Yilmaz S., **Azizoĵlu U.,** Temizgül R., Ayvaz A., Karabörklü S., Akbulut M., Eröz R., "*cry* Gene Frequency Of Native *Bacillus thuringiensis* Isolates ", Uluslararasē Katēlēmlē Ulusal Biyosidal Kongresi, Antalya, Türkiye, 19-22 Mart 2014,
2. **Azizoĵlu U**., Bulut S., Yilmaz S., Ayvaz A., "Biyolojik Mücadelenin Ötesinde *Bacillus thuringiensis:* Biyofertilizer-Biyostimülatör", V. Organik Tarēm Sempozyumu, Samsun, Türkiye, 25-27 Eylül 2013.
3. Salih Karabörklü, Abdurrahman Ayvaz, Mikail Akbulut, Semih Yēlmaz, **Uĵur Azizoglu**ò 28SrDNA Dizi Analiziyle Bazē Entomopatojen Nematodlarēn Karakterizasyonuò 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 15-18 Kasēm, 2012, Antalya
4. Salih Karabörklü, **Uĵur Azizoĵlu,** Semih Yēlmaz, Sunay Tekin, Enfal Çömlekçi, Abdurrahman Ayvaz, Mikail Abulut, ñBazē toprak Nemotodlarēyla Ķliĸkili Fungus Türlerinin Moleküler Karakterizasyonuò 21 Ulusal Biyoloji Kongresi, 03-07 Eylül 2012, Ege Üniversitesi, Ķzmir.
5. Semih Yēlmaz, Sunay Tekin, **Uĵur Azizoĵlu**, Enfal Çömlekçi, Salih Karabörklü, Mikail Abulut, Abdurrahman Ayvaz, ñKahramanmaraĸ Ķinden Ķzole Edilen *Bacillus thuringiensis* Ķzolatlarēnēn Karakterizasyonu ve Tarēmsal Zararlēlar Üzerindeki Etilerinin Araĸtērēlmasēò 21 Ulusal Biyoloji Kongresi, 03-07 Eylül 2012, Ege Üniversitesi, Ķzmir.
6. Semih Yēlmaz, Salih Karabörklü, **Uĵur Azizoĵlu**, Abdurrahman Ayvaz, Mikail Abulut, "Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore-crystal mixtures on different larval stages of *Thaumetopoea pityocampa* at varying temperatures",III

International Entomopathogens and Microbial Control Symposium,19-22 Eylül 2011.

7. Yilmaz S., Karabörklü S., **Azizoğlu U**., Ayvaz A., Akbulut M., Tekin S., Temizgül R., "Çam Kesetārtdē *Thaumetopoea pityocampa* (Den. & Schiff.) Larvalarēnēn Yerel *Bacillus thuringiensis* Ķzolatlarēyla Mücadelesi, Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi, Kahramanmarak, Türkiye, 28-30 Haziran, 2011,
8. Yilmaz S., Saribek D., Tekin S., **Azizoğlu U**., Karabörklü S., Akbulut M., Ayvaz A., "AdanaõDan Ķzole Edilen ve *cry1*, *cry2* ve *cry5* Genleri Takēyan Etkili Bir *Bacillus thuringiensis* Ķzolatēnēn *Trichogramma evanescens* Erginlerinin Ömür Uzunluğu ve Parazitlemesine Etkisi", 20 Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli, Türkiye, 21-25 Haziran 2010,
9. Yilmaz S., Ayvaz A., Akbulut M., **Azizoğlu U**., Karabörklü S., Basim H., "Molecular Characterization And Insecticidal Activity of A Highly Pathogenic Isolate of *Bacillus thuringiensis* From Adana", Society for Invertebrate Pathology, 43th Meeting,, Türkiye, 11-15 July 2010.
10. **Azizoğlu U**., Yilmaz S., Karabörklü S., Akbulut M., Saribek D., Tekin S., Ayvaz A., "Ultraviole ve Mikrodalga Radyasyonlarēnēn *Ephestia kuehniella* Yumurtalarēndaki Embriyo Gelikimine Etkileri", 20 Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli, Türkiye, 21-25 Haziran, 2010.
11. **Azizoğlu U**, Yēlmaz S, Ayvaz A, Akbulut M.ñDetection of *cry1* genes in Local *Bacillus thuringiensis* isolates and their bioactivities on UV-irradiated stored product moth larvae. International Workshop on Urbanisation, Land Use, Land Degradation and Environment, 28 September ï 01 October 2009, Denizli.
12. Yēlmaz S, **Azizoğlu U.**, Temizgül R, Karabörklü S, Akbulut M and Ayvaz A,òPCR-based identification of insecticidal crystal genes of *Bacillus thuringiensis* isolated from Adana. International Workshop on Urbanisation, Land Use, Land Degradation and Environment, 28 Septemberï 01 October 2009, Denizli.
13. Yēlmaz S, Demirezen N**, Azizoğlu U.**, Temizgül R, Karabörklü S, Akbulut M, Ayvaz Determination of lepidopter specific *cry* genes of *Bacillus thuringiensis* isolates obtained from soils and flour mills and investigation of their toxicity on stored product moths. II. Entomopathogens and Microbial Control Symposium, 24-27 September 2009, Sarēgerme, Muğla.

14. Sarıbek, D, **Azizoğlu U.,** Ayvaz A., "Ülkemizin Farklı Bölgelerinden Toplanan *Trichogramma* Türlerinin Soğuğa Karşı Dirençlerinin Araştırılması". 19.Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran, 2008, Trabzon.