T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ULTRAVİYOLE RADYASYONUYLA IŞINLANMIŞ *Ephestia kuehniella* VE *Plodia interpunctella* LARVALARI ÜZERİNE TARIM ARAZİLERİNDEN İZOLE EDİLEN *Bacillus thuringiensis* İZOLATLARININ ETKİSİ

Tezi Hazırlayan
Uğur AZİZOĞLU

Tezi Yöneten
Doç. Dr. Abdurrahman AYVAZ

Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Temmuz 2009
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ULTRAVİYOLE RADYASYONUYLA IŞINLANMIŞ *Ephestia kuehniella* VE *Plodia interpunctella* LARVALARI ÜZERİNE TARIM ARAZİLERİNDEN İZOLE EDİLEN *Bacillus thuringiensis* İZOLATLARININ ETKİSİ

Tezi Hazırlayan
Uğur AZİZOĞLU

Tezi Yöneten
Doç. Dr. Abdurrahman AYVAZ

Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FBY-08-568 kodlu proje ile desteklenmiştir

Temmuz 2009
KAYSERİ

Doç. Dr. Abdurrahman AYVAZ danışmanlığında **Uğur AZİZOĞLU** tarafından hazırlanan **"Ultraviyole Radyasyonuyla Işınlanmış *Ephestia kuehniella* ve *Plodia interpunctella* Larvaları Üzerine Tarım Arazilerinden İzole Edilen *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Etkisi"** adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

22/07/2009

JÜRİ:

Başkan : Prof. Dr. Aydın Ş. TUNÇBİLEK

Üye : Doç. Dr. Abdurrahman AYVAZ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mikail AKBULUT

ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulunun 28/07/2009 tarih ve 2009/26-10... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

28./07./2009

Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca yardımını esirgemeyen ve her konuda rehberlik eden sayın hocam Doç. Dr. Abdurrahman AYVAZ'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen başta Yrd. Doç. Dr. Mikail AKBULUT ve Yrd. Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK olmak üzere bölümümüzün diğer öğretim üyelerine, liyofilizasyon işleminde yardımını esirgemeyen Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünden Doç. Dr. Osman SAĞDIÇ'a ve Arş. Gör. İsmet ÖZTÜRK'e, mikroskop çalışmalarımda yardımcı olan Fizik Bölümü doktora öğrencilerinden Sezen AKBULUT ve Yavuz OCAK'a, böcek materyali temininde destek olan Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünden Doç. Dr. Cem ÖZKAN'a ve Arş. Gör. Hilal TUNCA'ya teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca maddi ve manevi desteğini hiç esirgemeyen doktora öğrencisi Semih YILMAZ'a özellikle şükranlarımı arz ederim.

Ayrıca çalışmalarımda yardımını ve desteğini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım, Salih KARABÖRKLÜ, Uzm. Rıdvan TEMİZGÜL, Nurettin DEMİREZEN, Hamid CEYLAN, Muhammer KARABACAK ve Erman AŞIK'a teşekkür ederim.

Tüm öğrenim hayatımda olduğu gibi yüksek lisans çalışmalarımda da bana desteklerini esirgemeyen sevgili aileme de teşekkür ederim.

ULTRAVİYOLE RADYASYONUYLA IŞINLANMIŞ *Ephestia kuehniella* VE *Plodia interpunctella* LARVALARI ÜZERİNE TARIM ARAZİLERİNDEN İZOLE EDİLEN *Bacillus thuringiensis* İZOLATLARININ ETKİSİ

Uğur AZİZOĞLU
Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2009
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Abdurrahman AYVAZ

ÖZET

Bu çalışmada Kayseri'nin farklı bölgelerindeki tarım arazilerinden alınan toprak örneklerinden 60 farklı *Bacillus thuringiensis* izolatı elde edilmiştir. İzolatların total DNA' ları izole edildikten sonra *cry1C*130 ve *cry1B*367 primerleri kullanılarak PZR analizleri yapılmıştır. 60 izolattan 5'nin *cry1* geni taşıdığı tespit edilmiştir. Kontrol suşu ve U-6-6 izolatı *cry1B*367 primeri ile yapılan PZR sonucu aynı büyüklükte bant vermiş, U-6-6 izolatı yaklaşık 1100 bp büyüklüğünde ilave bir bant daha vermiştir. *E. kuehniella* ve *P. interpunctella* larvaları üzerinde kontrol suşu ve U-6-6 izolatının yakın toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. İzolatların *P. interpunctella* larvaları üzerinde, kontrol suşunun ise *E. kuehniella* larvaları üzerinde daha yüksek öldürücü etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Ultraviyole (UV) radyasyonu *E. kuehniella* ve *P. interpunctella* larvaları üzerinde artan uygulama süresine bağlı olarak ölüm oranlarının arttığı görülmüştür. *P. interpunctella* larvalarına UV ile birlikte 250 ve 1000 (µg./ml.) ppm spor-kristal karışımı uygulandığında ölüm oranının arttığı gözlenmiştir. Ancak U-14-4 izolatının ölüm oranını değiştirmediği görülmüştür. *E. kuehniella* larvalarına UV ile birlikte 250 ve 1000 (µg./ml.) ppm spor-kristal karışımı uygulandığında izolatlarının ölüm oranını değiştirmediği, ancak kontrol suşunda ise ölüm oranının azaldığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus thuringiensis*; UV radyasyonu; *E. kuehniella*; *P. interpunctella*, izolat.

EFFECT OF THE ISOLATES OF *Bacillus thuringiensis* ISOLATED FROM AGRICULTURAL FIELDS ON *Ephestia kuehniella* AND *Plodia interpunctella* LARVAE IRRADIATED BY ULTRAVIOLET RADIATION

Uğur AZİZOĞLU
Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences
M. Sc. Thesis, July 2009
Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Abdurrahman AYVAZ

ABSTRACT

In this study, 60 different *Bacillus thuringiensis* isolates were obtained from the agricultural fields in Kayseri using selective media. Total DNA were isolated and analyzed by PCR using *cry1C*130 and *cry1B*367 primers. Of the tested 60 isolates, 5 were found to be carrying *cry*1 gene. *B. thuringiensis* subsp *kurstaki* and U-6-6 isolate exhibited similar PCR product by using *cry1B*367 primer. U-6-6 isolate yielded additional 1100 bp PCR product by using the same primer. It was shown that U-6-6 and standard strain had similar mortal effect against *E. kuehniella* and *P. interpunctella* larva*e*. The mortal effect of standard strain was higher against *E. kuehniella* when compared to *P. interpunctella.* However our isolates showed higher larvicidal effect on *P. interpunctella* larva*e* compared to *E. kuehniella* larvae.

It was shown that prolonged exposure time to UV radiation increased mortality rate of *E. kuehniella* and *P. interpunctella* larvae. UV irradiated *P. interpunctella* larvae treated with *B. t.* ssp. *kurstaki* at 250 and 1000 ppm spor-crystal mixture showed greater mortality than only Bt treatment. When combined the UV radiation with U-14-4 isolate, larval mortality rate of the *P. interpunctella* did not change. Combination of UV and Bt isolates (250 and 1000 ppm) did not show additional mortality effect against *E. kuehniella* larvae, but this combination decreased the mortality rate when *B. t.* ssp. *kurstaki* toxins used.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; UV radiation; *E. kuehniella*; *P. interpunctella*, isolate.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

KABUL VE ONAY i

TEŞEKKÜR.....ii

ÖZET iii

ABSTRACT.....iv

TABLOLARIN LİSTESİ.....viii

ŞEKİLLERİN LİSTESİ ix

KISALTMALAR LİSTESİ xi

1. BÖLÜM

GİRİŞ 1

2. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER 4

2.1. *Bacillus thuringiensis*.....4

2.1.1. *Bacillus thuringiensis*'in Genel Özellikleri.....4

2.1.2. *Bacillus thuringiensis*'in Habitatları 5

2.1.3. *Bacillus thuringiensis*'in Sınıflandırılmasında Kullanılan Yöntemler.....5

2.1.4. *Bacillus thuringiensis cry* Genlerinin PZR Metoduyla Belirlenmesi.....6

2.1.5. *Bacillus thuringiensis*'in δ -Endotoksinlerinin Sınıflandırılası.....7

2.1.6. *Bacillus thuringiensis*'in Plazmitleri.....8

2.1.7. *Bacillus thuringiensis*'in İnsektisidal Kristal Genleri 8

2.1.8. *Bacillus thuringiensis*'in İnsektisidal Proteinlerinin Yapısı.....8

2.1.9. *Bacillus thuringiensis*'in Etki Mekanizması 9

2.1.10. *Bacillus thuringiensis*'in Ticari Olarak Kullanılan Ürünleri.....10

2.1.11. *Bacillus thuringiensis*'in Biyoteknolojisi 12

2.2. Radyasyonun Tanımı ve Çeşitleri 13

2.2.1. Ultraviyole Işınları (UV) 14

3. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM 15

3.1. Toprak Örneklerinin Alınması 15

3.2. Toprak Örneklerinden *Bacillus* Cinsine Ait Bakterilerin İzolasyonu 15

3.3. İzolatların Gram Boyama Yöntemiyle Boyanması 16

3.4. İzolatların Spor Boyama Yöntemiyle Boyanması 16

3.5. *Bacillus* Cinsine Ait Bakteri İzolatlarından *Bacillus thuringiensis* Olanların Total DNA İzolasyonu 16

3.6. *Cry1* Genlerinin PZR Analiziyle Araştırılması 17

3.6.1. PZR'de Kullanılan Tampon ve Çözeltiler 17

3.6.2. PZR'de Kullanılan Primerler ve Uygulanan Program 17

3.7. İzolatların *E.kuehniella* ve *P. interpunctella* Larvaları Üzerine Öldürücü Etkisi 18

3.7.1. Spor ve Parasporal Kristal Proteinlerin Hazırlanması 18

3.7.2. Spor ve Parasporal Kristal Proteinlerinin Böcek Larvaları Üzerine Öldürücü Etkisi 19

3.8. Ultraviyole Radyasyonuyla Işınlanmış Böcek Larvalarının İncelenmesi 20

3.9. Ultraviyole Radyasyonuyla Işınlanmış Böcek Larvalarına Spor-Parasporal Kristal Proteinlerin Uygulanması 21

4. BÖLÜM

BULGULAR 22

4.1. *Bacillus* İzolasyonu ve İzolatların Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi 22

4.2. *Cry1* Geninin PZR Analiziyle Belirlenmesi 24

4.3. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının *E. kuehniella* ve *P. interpunctella* Larvaları Üzerine Öldürücü Etkisi.....25

4.4. Böcek Larvaları Üzerine Ultraviyole (UV) Radyasyonunun Etkisi.....31

4.5. Işınlanmış Böcek Larvalarına Spor ve Parasporal Kristal Proteinlerinin Etkileri.....33

5. BÖLÜM

TARTIŞMA VE SONUÇ.....38

KAYNAKLAR.....43

ÖZGEÇMİŞ.....51

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki'*den üretilmiş insektisitler 11

Tablo 2.2. *B. thuringiensis* subsp. *israelensis'*den üretilmiş insektisitler 11

Tablo 2.3. *B. thuringiensis* subsp. t*enebrionis'*den üretilmiş insektisitler 12

Tablo 4.1. Toprak örneklerinden izole edilen *Bacillus* izolatlarından *cry1* geni taşıyanların alındıkları topraklar 23

Tablo.4.2. Çeşitli tarım arazilerinden izole edilen *B. thrungiensis* izolatlarının (spor-kristal protein karışımı ppm (µg/ml)) *P. interpunctella* larvaları üzerine öldürücü etkileri 27

Tablo 4.3. Çeşitli tarım arazilerinden izole edilen *B. thrungiensis* izolatlarının (spor-kristal protein karışımı ppm (µg/ml)) *E. kuehniella* larvaları üzerine öldürücü etkileri 27

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1. *Bacillus thuringiensis* bakterisinin elektron mikroskop görüntüsü.....5

Şekil 2.2. *Bacillus thuringiensis*'e ait kristal proteinin yapısı.....9

Şekil 2.3. *Bacillus thuringiensis*'in etki mekanizması. 10

Şekil 2.4. Elektromanyetik radyasyon spektrumu.....13

Şekil 3.1. Çalkalamalı inkübatör. 19

Şekil 3.2. Ultraviyole lambası 20

Şekil 4.1. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ve *cry* geni taşıdığı belirlenen izolatların gram boyama sonucu mikroskop görüntüleri. 23

Şekil 4.2. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ve U-6-6 izolatının spor boyama sonrası mikroskop görüntüsü. 24

Şekil 4.3. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ve U-6-6 izolatının kristal proteinlerinin ışık mikroskobundaki görüntüsü. 24

Şekil 4.4. Kontrol suşu ve izolatların c*ry1C*130 ve *cry1B*367 primerleri ile yapılan PZR ürünlerinin jel görüntüsü.....25

Şekil 4.5. Kontrol suşu, U-14-4 ve U-14-1 izolatlarının sırasıyla *P. interpunctella* ve *E. kuehniella* larvaları üzerindeki insektisidal etkisinin görünümü. ...26

Şekil 4.6. Spor-kristal karışımının (250 ppm) *P. interpunctella* larvaları üzerine öldürücü etkisi. 28

Şekil 4.7. Spor-kristal karışımının (1000 ppm) *P. interpunctella* larvaları üzerine öldürücü etkisi. 28

Şekil 4.8. Spor-kristal karışımının (1500 ppm) *P. interpunctella* larvaları üzerine öldürücü etkisi.....29

Şekil 4.9. Spor-kristal karışımının (250 ppm) *E. kuehniella* larvaları üzerine öldürücü etkisi.....30

Şekil 4.10 Spor-kristal karışımının (1000 ppm) *E. kuehniella* larvaları üzerine öldürücü etkisi. 30

Şekil 4.11. Spor-kristal karışımının (1500 ppm) *E. kuehniella* larvaları üzerine öldürücü etkisi. 31

Şekil 4.12. UV radyasyonunun *P. interpunctella* larvaları üzerine öldürücü etkisi. .32

Şekil 4.13. UV radyasyonunun *E. kuehniella* larvaları üzerine öldürücü etkisi.....32

Şekil 4.14 Spor-kristal karışımı (250 ppm) ve UV radyasyonunun (120 dk.) birlikte uygulanmasının *P. interpunctella* larvaları üzerine öldürücü etkisi. 33

Şekil 4.15. Spor-kristal karışımı (1000 ppm) ve UV radyasyonunun (120 dk.) birlikte uygulanmasının *P. interpunctella* larvaları üzerine öldürücü etkisi. 34

Şekil 4.16. Spor-kristal karışımı (250 ppm) ve UV radyasyonunun (120 dk.) birlikte uygulanmasının *E. kuehniella* larvaları üzerine öldürücü etkisi. 35

Şekil 4.17. Spor-kristal karışımı (1000 ppm) ve UV radyasyonunun (120 dk.) birlikte uygulanmasının *E. kuehniella* larvaları üzerine öldürücü etkisi. 36

KISALTMALAR LİSTESİ

Bt	: *Bacillus thuringiensis* Berliner
Btk	: *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki*
bp	: Baz Çifti
Cry	: Kristal Protein
ICP	: İnsektisidal Kristal Protein
cry	: Kristal Protein Geni
cyt	: Sitolitik Gen
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
L-B Broth	: Lüria-Bertani Broth
L-A	: Lüria-Agar
ROS	: Reaktif Oksijen Türü
dNTP	: Di Nükleotid Tri Fosfat
u	: Ünite
w/v	: Ağırlık/Hacim

1. BÖLÜM

GİRİŞ

Günümüzde tarımsal çalışmaların başlıca amacı besin üretimi artırmaktır. Besin üretimini artırıcı stratejilerin başında bitki hastalıklarını önleme ve zararlılarla mücadele gelmektedir. Zararlıları tamamen yok etmek mümkün değildir. Ancak uygun yöntemler kullanılarak zararlıları kontrol altında tutmak mümkündür. Günümüzde zararlılarla en etkili mücadele yöntemlerinden birisi kimyasal mücadele yöntemidir ve zararlıların %95'i bu yöntemle yok edilebilmektedir. Tarımda pestisit kullanılması büyük miktarda ürün atışı sağlamıştır. Pestisit kullanımı zararlıların ekolojik kökeni hakkında bilgi edinmeye gerek duymaması zararlı populasyonunu geçici olarak baskı altında tutması gibi birçok avantaja sahip olmasına rağmen, pestisitler toprağa, su sistemlerine ve besin zincirine karışarak çevre kirliliğine neden olmaktadır [1]. Ayrıca pestisit kullanımı, zararlılarda direnç gelişimi, faydalı türleri olumsuz etkilemesi, insanlar üzerindeki akut ve kronik etkileri, çevre ve gıda kirliliği gibi sorunları da beraberinde getirmektedir.

Pestisitler çok sayıda hayvan türü üzerinde akut zehirlilik göstermekte bu da geniş bir öldürücü biyokimyasal etki aralığına, belirli organ ve dokulara verilen hasara, hücreleri ve genleri tahrip edici etkilere, üreme bozukluklarına ve olumsuz ekolojik etkilere yol açmaktadır. Kimyasal mücadelenin bütün bu olumsuzlukları göz önünde bulundurularak tarımsal ürünlere zarar veren canlıların kontrolünde değişik metotların kullanılmasına başlanmıştır. Bu metotlardan biri olan radyasyon böcekler üzerinde direnç meydana getirmediği için oldukça etkili bir metottur.

Radyasyonun etkisiyle; enzim, DNA ve RNA gibi makro moleküllerde bozukluklar ve metabolik reaksiyon kademelerinde karışıklıklar meydana gelmektedir. Ayrıca;

radyasyon hücre zarı, çekirdek, kromozomlar, mitokondri ve lizozom gibi hücre organellerinde hasarlar meydana getirmektedir.

Kimyasal mücadeleye alternatif mücadele yöntemi olarak kullanılan diğer bir metot ise entomopatojenik mikroorganizma olan *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) toksinlerinin üretilmesi ve zararlılarla mücadele amaçlı kullanılmasıdır [2]. Küçük miktarlardaki yabani suşlar ticari ürün olarak formüle edilmiş ve son otuz yılda yiyecek ürünlerine, süs bitkilerine, orman ağaçlarına ve depolanmış ürünlere zararsız ve risksiz bir şekilde insektisit olarak uygulanmaktadır. Buna ilave birçok araştırma Bt'nin çevreye olan faydasına ilave bilgiler sağlamıştır [3].

Potansiyel entomopatojenik mikroorganizmaların çoğunun tanıtımındaki işlevsel sınırlamaların sebepleri de bu mikroorganizmaların uygulandığı alanlara etkisi ve onların ekolojisi hakkındaki bilgi eksikliğidir. Bu organizmaların uygulama tanıtımlarında, onların üretim koşulları, belirli organizmalara gen transfer oranları, uygulanan alanlardaki dağılım hızları, ekosisteme güvenli, faydalı veya zararlı yayılımlarının önceden bilinmesi çok önemlidir [4].

Omurgasız patolojisi biliminde 19. yüzyılın sonlarında ve 20. yüzyılın ilk yarısında az sayıda gelişme görülmesine rağmen *B. thuringiensis*'in ticari ürün olarak geliştirilmesi, büyük ölçeklerde mikrobiyal kontrol ajanı olarak üretilmesi ve kullanılması bu alanda önemli gelişmelere neden olmuştur [5]. Şimdiye kadar 100'den fazla bakteri türü böcek patojeni olarak tanımlanmasına rağmen sadece belli *Bacillus* türleri özelliklede *B. thuringiensis* ticari olarak yaygın bir biçimde kullanılmaktadır [6].

İnsanları ekonomik zarara uğratan, birçok hastalığın vektörü olan, depolanmış ürünlerde ve tarım arazilerinde ürün kayıplarına neden olan zararlı böceklerle mücadelede alternatif bir yöntem olan biyolojik mücadele ajanları yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca zararlılarla daha etkili bir şekilde mücadele için birden fazla yöntemin birlikte uygulanması anlamına gelen entegre mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi zararlıları baskı altında tutmada etkili olmakta ve daha çok önerilmektedir. Bu çalışmada çeşitli tarım arazilerinden izole edilen *B. thuringiensis* izolatlarının ve UV radyasyonunun depolanmış ürün zararlısı bazı böcek larvaları üzerine ayrı ayrı etkileri

araştırıldıktan sonra her iki yöntem birlikte uygulanarak mücadele etkinliğinin artırılması hedeflenmiştir.

2. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

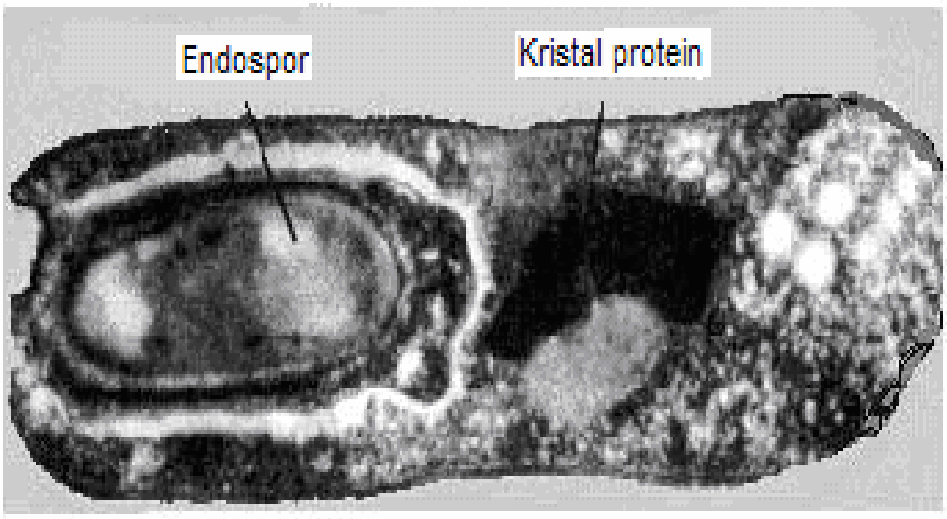
Bu bölümde çalışmamıza konu olan *B. thuringiensis* ve ultraviyole radyasyonu hakkında genel bilgiler verilerek bu etkenlerle ilgili çalışmalara değinilmiştir.

2.1. *Bacillus thuringiensis*

2.1.1. *Bacillus thuringiensis*'in Genel Özellikleri

B. thuringiensis (Bt) sporlanırken endojen kristal üreten gram pozitif bir bakteridir. Vejetatif hücrelerinin eni 1µm, boyu 5µm uzunluğunda olup, kısa kamçılara sahiptir [7]. Entomopatojenik bir bakteri olan *B. thuringiensis* ilk olarak Japon bilim adamı S. Ishiwata tarafından 1901 yılında izole edilmiştir. Ishiwata bunları Sotto hastalığına neden olan ipek böceği larvalarından izole etmiştir [8]. On yıl sonra E. Berliner, bu bakteriyi Almanya'ın Thuringia bölgesinden toplanan *Anagasta kuehniella* (Akdeniz un güvesi)'dan izole etmiştir ve türü belirlemiştir [9]. *B. thuringiensis* insektisidal özellikleri sebebiyle 40–50 yıldır biyolojik kontrol amacıyla ticari olarak kullanılmaktadır. *B. thuringiensis* ilk zamanlarda sadece Lepidoptera takımına etkili olduğu düşünülmüş fakat daha sonra Diptera takımına karşı etkili olması nedeniyle de Bt üzerine araştırmalar artmıştır. *Bacillus thuringiensis*'in alt suşu olan *israelensis*, Diptera takımına [10] *morrisoni* ise Coleoptera takımına karşı etkili olduğu belirtilmiştir. [11]. *B. thuringiensis* içerikli biyoinsektisitler Diptera, Coleoptera ve Lepidoptera takımlarına karşı dünya genelinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca Hymenoptera, akar, nematod, Protozoa ve yassısolucan gibi omurgasızlara karşıda etkili olduğu da belirlenmiştir [12]. *Bacillus thuringiensis*'in inseksidial aktivitesi spor oluşturma aşamasında bol miktarda parasporal kristal protein meydana getirmesinden kaynaklanır. Duyarlı böceklerin inaktif olan δ-endotoksin olarak bilinen kristalleri yediğinde, bu kristaller böceğin sindirim siteminde çözünür ve proteolitik

enzimlerle parçalanarak aktif toksin haline gelir. Toksinler spesifik olarak orta bağırsaktadaki epitel hücrelerde bulunan protein reseptörüne bağlanarak porlar oluştururlar ve zar fonksiyonlarını bozarlar. Sonuç olarak epitel hücreler parçalanır ve beslenme durur, böcekler beslenemez ve açlıktan ya da zehirlenmeden dolayı ölürler [13, 14, 15].



Şekil 2.1. *B. thuringiensis* bakterisinin elektron mikroskop görüntüsü [7].

2.1.2. *Bacillus thuringiensis*'in Habitatları

B. thuringiensis toprak, böcek habitatları, ölü böcek larvaları, depo ürünleri ve yaprak yüzeylerinden izole edilebilirler [16]. Çok sayıda *B. thuringiensis* suşu, ölü böceklerden izole edilmiştir ve çoğu durumda da aynı böceğe karşı tekrar toksik aktivite göstermiştir. Bu organizmalar, konak böceklerin vücutları içinde çoğalırlar ve böcek larvası öldüğü zaman, ölü böcek vücudu kristal ve spor içerir [17].

2.1.3. *Bacillus thuringiensis*'in Sınıflandırılmasında Kullanılan Yöntemler

B. thuringiensis'in tanımlanmasında ilk olarak kristal gen ve proteinlerinin tespit edilmesi gerekmektedir. Bu amaç için en iyi yöntemlerden birisi *B. thuringiensis*'in oluşturduğu kristal proteinleri boyayarak ışık veya faz-kontrast mikroskobunda incelemektir. Kristal yapıların büyüklüğünü tespit etmek için elektron mikroskobu ile de daha ayrıntılı inceleme yapılabilmektedir [18]. *B. thuringiensis* çok sayıda ve farklı büyüklüklerde plazmitlere sahiptir. δ-endotoksin genlerinin çoğu büyük plazmitler üzerinde bulunurken, bazıları da kromozom üzerinde yer almaktadır [19]. *B.*

thuringiensis suşlarının plazmit içerikleri birbirinden farklı olabilmekte ve bu suşlardaki plazmit sayısının belirlenmesi, bu plazmitlerin *cry* genlerini taşıyıp taşımamasının tespit edilmesi karakterizasyon için önemlidir. *B. thuringiensis* izolatlarının sınıflandırmasında kullanılan faydalı bir yöntemde H-serotiplendirmedir. Serovarlar içinde, suşların farklılığı De Barjak ve Bonnefoi (1962) tarafından flagella antijenlerine dayandırılarak geliştirilmiştir ve o zamandan beri kullanılmaktadır [20]. Ancak serotip içindeki izolatların biyokimyasal karakterleri, plazmit profilleri ve insektisidal aktiviteleri her zaman aynı değildir. Aynı zamanda, kendi kendine aglütine olan ve hareket yeteneğine 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 probları kullanılarak ICP 'leri kodlayan genin tanımlanması önerilmiştir [21, 22, 23].

Bacillus thuringiensis'in analizini koylaştıran yöntemlerden biride PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyon)'deki gelişmeler olmuştur. Bu metot ilk olarak Kleppe ve ark.(1971) tarafından geliştirilmiştir. PZR analizi spesifik DNA bölgelerini çoğaltmada kullanılır. Böylece hedef bir genin varlığı ya da yokluğu belirlenebilir. *B. thuringiensis* δ-endotoksinlerin PZR ile tanımlanması suş karakterizasyonu yönünden oldukça faydalı olmuştur. Bu nedenle de belirleme aşaması olarak hızlı ve üretim bakımından birçok avantaj sağlamaktadır [24].

2.1.4. *Bacillus thuringiensis cry* Genlerinin PZR Metoduyla Belirlenmesi

B. thuringiensis cry genlerinin PZR metodu ile belirlenmesi ilk olarak Carrozzi ve ark. tarafından geliştirilmiştir [24]. Carrozzi ve ark. bu metodu insektisidal aktivitenin tahmininde bir aracı olarak kullanmışlardır. Carrozzi ve ark. PZR'ı hızlı ve doğru bir metot olarak görmüş, yeni suşların tanımlanmasında, yeni izolatların insektisidal aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmasını önermişlerdir. Carrozzi ayrıca olağan dışı PZR profili ortaya koyan suşları seçerek daha gelişmiş analizlerin yapılması suretiyle yeni *cry* genlerin tanımlanmasının ve karakterizasyonun yapılabileceğini belirtmiştir. Son 15–20 yıldır PZR metodu birçok *B. thuringiensis* suşunun *cry* gen içeriğini belirlemede önemli ölçüde kullanılmıştır [25, 26]. Bu metot aynı zamanda *cyt* genlerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır [27, 28, 29]. PZR programı ile yapılan analizler suşlar arasındaki *cyt* ve *cry* genlerinin doğal dağılımı bakımından ilgimizi artırmıştır.

Ayrıca bu yöntem bu genlerin suşlar içindeki bağlantısını belirlemekte ve farklı coğrafi bölgelerdeki varlığı hakkında bilgi vermektedir. Günümüzde PZR metodu birçok labarotuvarda rutin bir inceleme yöntemi olarak kullanılmaktadır. Buna rağmen PZR ile yapılan insektisidal aktivite belirleme işlemi zararlılar üzerindeki bioassay denemeleriyle de teyit edilmelidir [30].

Geniş *cry* gen ailelerinin tanımlanması korunmuş bölgelerin varlığına bağlıdır (% 45 ve % 95 arasındaki aminoasit benzerliğine göre). *B. thuringiensis* kristal protein genlerinin çoğu korunmuş nükleotid bloklar içerir. Bu korunmuş bloklar *cry1I* ve *cry3A* gibi genler için doğal olarak dallanma gösteren 5 korunmuş bloktan, 8 korunmuş bloğa kadar değişiklik gösterirler. PZR ile *cry* genlerinin tanımlanması korunmuş veya değişken nükleotid bölgelerinin farklılığına bağlıdır. Korunmuş bloklardan veya değişken bölgelerden primer olarak kullanılan oligonükleotidlerin dizayn edilmesiyle bütün haldeki gen alt familyalarını ve spesifik bireysel genleri tanımlamak mümkündür. Diğer bir yaklaşım ise farklı alt familyalardan elde edilen oldukça korunmuş bazı bölgelerin seçimidir [31].

2.1.5. *Bacillus thuringiensis*'in *δ*-Endotoksinlerinin Sınıflandırılası

Bt'e ait iki tür *δ*-endotoksin vardır. Bunlardan birincisi spesifik reseptör tarafından harekete geçen ve oldukça spesifik olan Cry toksinleridir. Diğeri ise non-spesifik Cyt (sitolitik) toksinlerdir. Cyt toksinlerinin bilenen reseptörleri yoktur. Bu iki toksin ailesi de aminoasit dizelerine göre sınıflandırılırlar. Dört grup toksin tanımlanmıştır. Cry proteinleri arasındaki benzerlik derecesi oldukça değişkendir ve Cyt toksinleriyle birlikte bazı Cry proteinleri de esas Cry grubu içerisinde yer almaz. Hatta bazı Cry proteinleri diğer *B. thuringiensis* toksinlerinden daha çok *Bacillus sphaericus* mosquitocidal toksinlerine daha yakındır. *Cry* genleri genellikle plazmidlerde bulunur ve Cry proteinlerini kodlar. *B. thuringiensis* suşları bir veya daha fazla sayıda *cry* geni taşıyabilir. Bazı izolatlar 8 farklı *cry* geni bulundurabilir [32].

2.1.6 *Bacillus thuringiensis*'in Plazmitleri

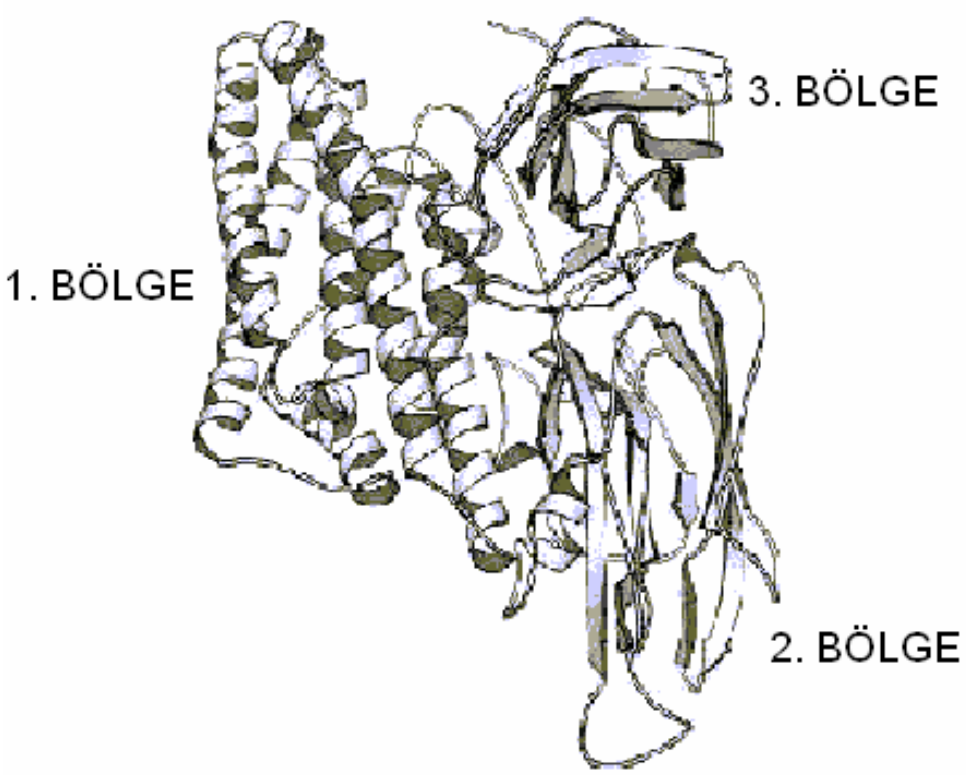
B. thuringiensis suşları yaklaşık 2.4 ile 5.4 milyon baz çifti uzunluğunda bir genoma sahiptir [33]. *B. thuringiensis* 2 ile 11 tane plazmit içerir [34]. Bu plazmitlerin büyüklükleri 2 ile 272 kb arasında değişiklik gösterir [35]. İnsektisidal kristal proteini (ICP) kodlayan genler bu plazmitler üzerinde yer almaktadır [36]. Büyük ve küçük plazmitler üzerinde bulunan *cry* genlerinin etrafında çok sayıda hareketli bölge bulunur. Bu plazmitler konjugasyon benzeri mekanizmalar ile bir *B. thuringiensis*'den diğerine kendiliğinden transfer olma yeteneğine sahiptir [37].

2.1.7. *Bacillus thuringiensis*'in İnsektisidal Kristal Genleri

B. thuringiensis'in insektisidal aktivitesi spor oluşturma aşamasında üretilen protein inklüzyonlardan kaynaklanır. Bu inklüzyonlar ICP'lerden oluşur. ICP' ler (Cry protein veya δ-endotoksin) birçok böcek türüne karşı etkilidir. Bu toksin proteinler esas olarak Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera' ya karşı etkilidir [13]. Fakat Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera, Mollophaga, nematodlar, akarlar ve Protozoa'lara karşı da etkili olduğu belirtilmiştir [38]. Aminoasit benzerliklerine göre 300'den fazla ICP klonlanmış, dizisi çıkarılmış ve 53 gruba ayrılmıştır [39]. *cry1, cry2 ve cry9* grubu *cry* genleri Lepidoptera' ya karşı en aktif toksinlerdir. *Cry3, cry7* ve *cry8* grubu Coleoptera'ya; *cry4* ve *cry11* ise Diptera'ya karşı oldukça etkilidir [40].

2.1.8. *Bacillus thuringiensis*'in İnsektisidal Proteinlerinin Yapısı

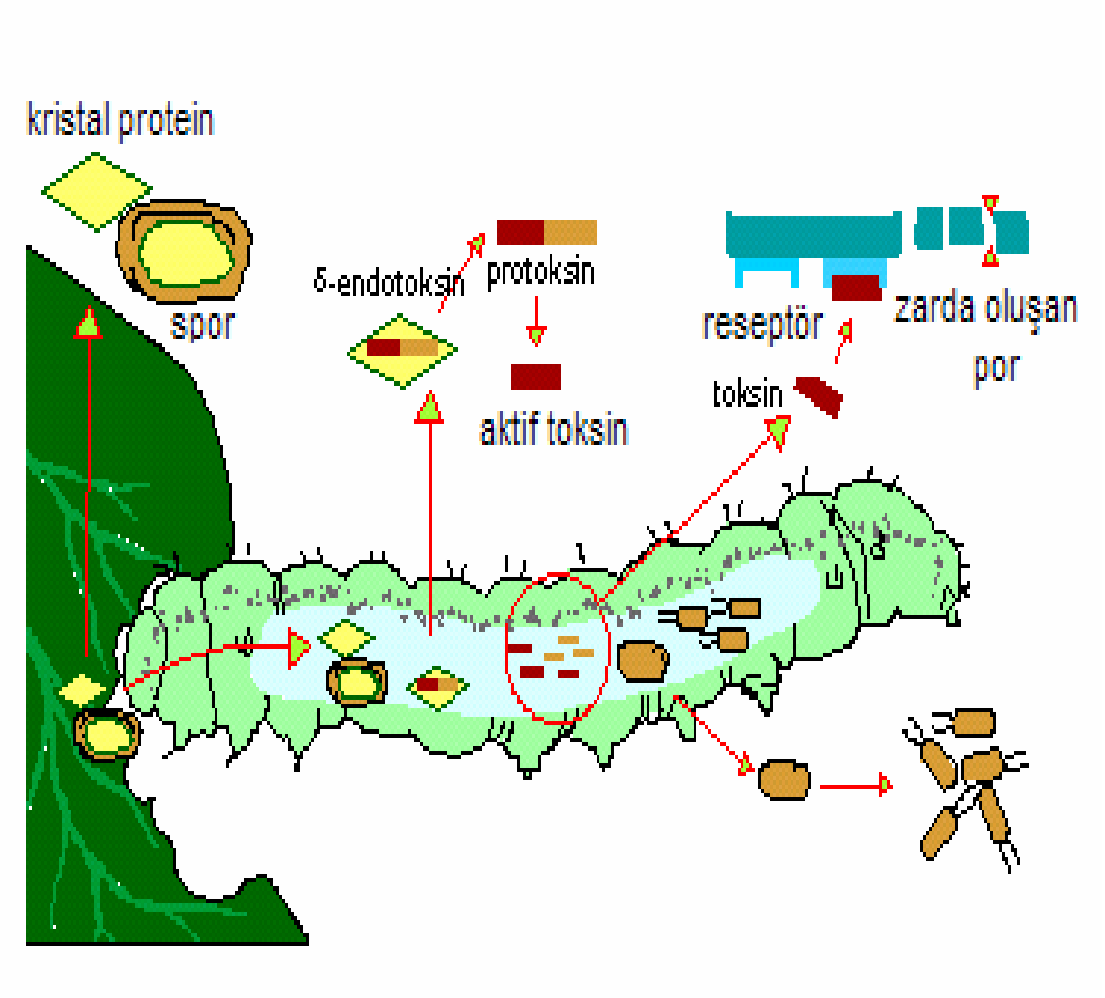
B. thuringiensis subsp. *tenebrionis*' in *δ*-endotoksininin aktif kısmının kristal yapısı X-ışını kristalografisi ile belirlenmiştir [41]. Aktif toksin üç ayrı etkin bölgeden oluşmaktadır [13]. I. Bölge, böcek bağırsağına tutunma ve delik oluşumundan sorumludur. II. Bölge ise böcek bağırsağının epitel hücrelerinin reseptörlerine bağlanma fonksiyonuna sahiptir. III. Bölge'nin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle beraber Cry toksinlerinin bağırsak proteazları tarafından sindirilmesini önlediği, iyon kanallarının oluşumunu sağladığı, reseptöre bağlandığı ve böcek özgünlüğünden sorumlu olduğu düşünülmektedir [13, 42].



Şekil 2.2. *Bacillus thuringiensis*'e ait kristal proteinin yapısı

2.1.9. *Bacillus thuringiensis*'in Etki Mekanizması

Duyarlı böcekler inaktif olan *δ*-endotoksinler yediğinde, bu kristaller böceğin sindirim siteminde çözünür ve proteolitik enzimlerle parçalanarak aktif toksin haline geçer. Toksinler spesifik olarak orta bağırsaktaki epitel hücrelerinde bulunan protein reseptörüne bağlanarak porlar oluştururlar ve zar fonksiyonlarını bozarlar [13, 14, 15]. Sonuç olarak böcekler beslenemez, açlıktan veya zehirlenmeden dolayı ölürler (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. *Bacillus thuringiensis*'in etki mekanizması.

2.1.10. *Bacillus thuringiensis*'in Ticari Olarak Kullanılan Ürünleri

B. thuringiensis'in toplam 37 alttürü bulunmaktadır [43]. Bunlar aizawai, aleti, canadensis, colmeri, dakota, darmstadiensis, dedrolimus, entomocidus, finitimus, fukuokaensis, galleriana, indiana, israelensis, japonensis, kenyae, kumamotoensis, kurstaki, kyushuensis, morissoni, nigeriensis, ostriniae, oyamensis, pakistani, pondicheriensis, shandogiensis, tenebrionis, thompsoni, thuringiensis, tochigiensis, tohokuensis, tolworthi, thoumanoffi, wuhanensis, yunnanensis'tir. Bunlardan *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*'in ürünleri ticari olarak üretilmekte ve kullanılmaktadır (Tablo 2.1, 2.2, 2.3) [43].

Tablo 2.1. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki'*den üretilmiş insektisitler

Ürün	**Formülasyon**	**Üretici**
Dipel	WP, EC	Abbott lab.
Thuricide	WP, Sulu çözeltisi	Sandoz
Javelin	Sulu çözeltisi, Islanabilir granül	Sandoz
Bactospeine	WP, Akıcı konsantre	Solvay, Cie
Futura	Akıcı konsantre	Duphar B.V
Foray	Akıcı konsantre	Duphar B.V
Biobit	WP, Akıcı konsantre	Nova İnd.
Bathurin 82	-	JZD Slusovice
Biodart	Sulu çözeltisi	ICI
Agree	*kurstaki* + *aizawa* kombinasyonu	Ciba Geigy
Condor	EC	Ecogen
Foil	*kurstaki*+*tenebroides* kombinasyonu	Ecogen
MPV	Ölü *Pseudomonas* hücrelerinde *kurstaki* kristalleri	Mycogen

Tablo 2.2. *B. thuringiensis* subsp. *israelensis'* den üretilmiş insektisitler

Ürün	**Formülasyon**	**Üretici**
Vectobac	WP, Teknik Toz, Granül Sulu çözeltisi	Abbott lab.
Teknar	Sıvı	Zeocon/Sandoz
Bactimos	WP, Granül, pellet	Solvay, Cie Duphar B.V
Skeetal	Sıvı	Nova İnd.
Baktokulicid	-	VPO, Bioprep.
Moskitor	-	JZD Slusovice

.

Tablo 2.3. *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis'* den üretilmiş insektisitler

Ürün	Tescil tarihi	Üretici
M-One	1988	Mycogen
M-Trak	1991	Mycogen
Trident	1988	Sandoz
TridentII	1990	Sandoz
Foil	1990	Ecogen
Di Terra	1991	Abbott lab.
Novodor	Beklemede	Nova İnd.

2.1.11. *Bacillus thuringiensis*'in Biyoteknolojisi

B. thuringiensis toksinlerinin insanlara, faydalı böceklerin çoğuna ve diğer canlılara toksik etkisinin olmaması nedeniyle, kimyasal insektisitlerin meydana getirdiği çevre ve sağlık sorunlarına neden olmamaktadır [44].

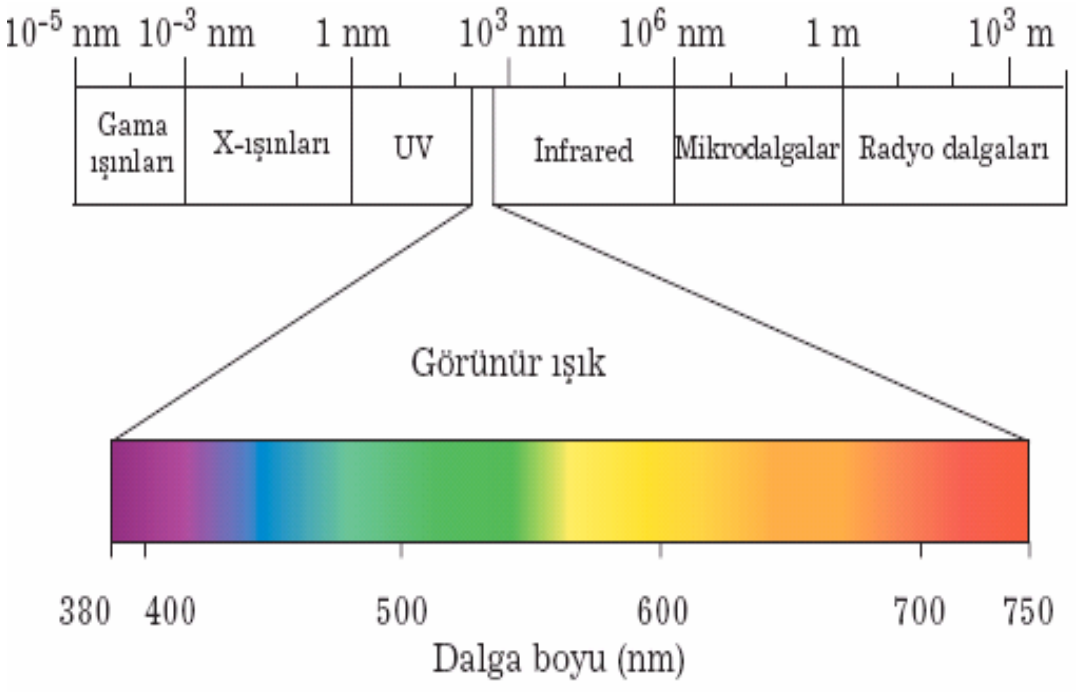
Genetik mühendisliğindeki son gelişmeler ile *B. thuringiensis* genlerinin pamuk, tütün ve domates gibi önemli ürün ve bitkilerde yaşayan, patojenik olmayan bazı bakterilere aktarılması ayrıca farklı konukçu spektrumuna sahip yeni ırkların geliştirilmesi bu bakterinin önemini oldukça artırmıştır [45]. Son zamanlara kadar *B. thuringiensis'* in diğer insektisitlere göre sahip olduğu bir başka üstünlük ise uzun süredir kullanılmasına rağmen böceklerin direnç geliştirememesi olarak görülmekteydi. Ancak son zamanlardaki bazı araştırma sonuçları böceklerde *B. thuringiensis*'e direnç meydana gelebileceğini göstermektedir [43].

2.2. Radyasyonun Tanımı ve Çeşitleri

Radyasyon, elektromanyetik dalgalar veya parçacıklar biçimindeki enerji yayımı ya da aktarımıdır. Başka bir ifadeyle, herhangi bir maddenin atom çekirdeğindeki nötron sayısı, proton sayısına göre oldukça fazla ise; bu tür maddeler kararsız bir yapı göstermekte ve çekirdeğindeki nötronlar alfa, beta, gama gibi çeşitli ışınlar saçarak parçalanmaktadırlar. Çevresine bu şekilde ışın saçarak parçalanan maddelere "radyoaktif madde", çevreye yayılan alfa, beta ve gama gibi ışınlara ise "radyasyon" adı verilmektedir.

Radyasyon Çeşitleri;

- Gama (Co-60, Cs-137);
- Yüksek enerjili elektron demetleri (Beta radyasyonu);
- X ışınları;
- Mikrodalga;
- Ultraviyole ışınları;



Şekil 2.4. Elektromanyetik radyasyon spektrumu

Radyasyon, böceklerin yumurta, larva, pupa ya da ergin evrede olup olmadığına bakılmaksızın farklı gelişim evrelerine uygulanabilir. Radyasyon, ABD, Rusya, Brezilya, İngiltere gibi ülkeleri de içeren 40'ın üzerinde ülkede zararlı kontrolünde kullanılmaktadır [46].

ABD'de, 1960'ların başında FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi), buğday, buğday unu ve patates için düşük dozda radyasyon uygulanmış, sonraki yıllarda ise besinlerdeki böceklerin kontrolü ve taze meyve, sebzelerin raf ömrünü artırmak için düşük dozda radyasyondan yararlanılmıştır [47].

2.2.1. Ultraviyole Işınları (UV)

Ultraviyole radyasyonu (UV) güneşten gelen ışık enerjisinin bir şeklidir. En kısa dalga boylu radyasyon en fazla enerjik olandır. UV ışınları 380 nm' den küçük ışın dalga boyunda bulunur. UV hücreler tarafından absorbe edilebilir ve bazı kimyasal değişikliklerin oluşmasına neden olabilir. Radyasyonun DNA üzerindeki hasarı oldukça önemlidir ve öldürücü olabilir. UV, DNA'da timin bazları arasındaki dimer bağlarını koparmak suretiyle replikasyonu engelleyebilir [48]. UV radyasyonundan kaynaklanan serbest ara radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu birçok DNA hasarları bilinmektedir. UV radyasyonunun gen aktivitesinin değişiminde tetikleyici rol oynadığı da bildirilmektedir [49].

3.BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Toprak Örneklerinin Alınması

Bu çalışmada Kayseri'nin farklı yerlerindeki tarım arazilerinden (Mahzemin Kasabası, Sarız Yaylacı Köyü, Erciyes Üniversitesi Kampüsü) alınan toprak örnekleri kullanılmıştır. Toprak örnekleri yüzey materyalleri süpürülmüş ve yüzeyden 3-7 cm arası derinlikten yaklaşık 10 g toprak örneği steril bir spatula ile steril kaplara konularak numara verilmiştir. Alınan toprak örneklerinden izolasyon yapılana kadar örnekler + 4 ^{o}C'de saklanmıştır.

3.2. Toprak Örneklerinden *Bacillus* Cinsine Ait Bakterilerin İzolasyonu

Bu çalışmada kullanılan toprak örneklerinden *Bacillus* izolasyonu Travers ve arkadaşlarının önerdiği yönteme göre yapılmıştır [50].

Toprak örneklerinden steril spatula yardımıyla 1 gr alınarak, 0.25 M Soydum-Asetat ile tamponlandırılmış 20 ml Lüria-Bertani Broth (LB Broth) besiyeri bulunan 100 ml' lik erlenlere konulmuştur. Daha sonra toprak örneği bulunan besiyeri çalkalamalı inkübatörde 30 °C' de 4 saat 250 rpm' de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda örneklerden 1.5 ml alınıp steril ependorf tüplere konulmuş ve 5-10 dakika 80 °C sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda örnekler, içinde LB agar bulunan petri kaplarına ekilmiş ve 30 °C de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kolonilerden farklı olanlar rasgele seçilip T–3 katı sporlanma besiyerine ekilerek tekrar 30 °C de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bakterilerin morfolojik olarak gram durumlarının belirlenmesi için Gram boyama aşamasına geçilmiştir.

3.3. İzolatların 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 dakika lugol ile muamele edilmiş ve bu süre sonunda preparat tekrar yıkanmıştır. Aseton-alkol ile muamele edildikten sonra tekrar yıkanmış ve ardından bir dakika süreyle safraninle boyanmıştır. Son olarak tekrar su ile yıkandıktan sonra ve açık havada kurutulmuş ve ışık mikroskobunda incelenmiştir. İnceleme sonunda koyu pembe ve mor olan basillerin Gram pozitif, kırmızı renkli olanların ise Gram negatif oldukları belirlenmiş ve Gram negatif sonuç verenler elimine edildikten sonra Gram pozitif olanlar total DNA izolasyonu yapmak için + 4 ^{o}C de muhafaza edilmiştir.

3.4. İzolatların Spor Boyama Yöntemiyle Boyanması

Temiz lamlar üzerine bakteri örneği yayıldıktan sonra 20 defa bek alevinden geçirilerek fiske edilmiştir. Fikse edilmiş olan bakteri örneğinin üzeri Malaşit yeşili (5g/100ml) ile kaplandıktan sonra 10 dakika 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) 1dakika süreyle uygulanmış ve musluk suyu ile yıkandıktan sonra kurumaya bırakılmıştır [51]. Elde edilen preperatlar Olympus marka mikroskopla 4000 (10x100x2x2 = 4000) defa büyütülerek incelenmiş ve Olympus DP12 marka kamerayla fotoğrafları çekilmiştir.

3.5. *Bacillus* Cinsine Ait Bakteri İzolatlarından *Bacillus thuringiensis* Olanların Total DNA İzolasyonu

İzolasyonu yapılan bakterilerin total DNA izolasyonları Bravo' nun önerdiği metoda göre yapılmıştır [28]. Total DNA izolasyonu yapılacak bakteriler Nutrient Agar besiyerine ekilerek 30 ^{o}C'de 12 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan kolonilerden öze ucu ile az miktarda alınarak içinde 0.1 ml distile su bulunan ependorf tüplere aktarılarak vorteks cihazında karıştırılmıştır. Daha sonra karışım -70 ^{o}C'de 20 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda donmuş olan karışımdaki hücrelerin

parçalanması için, tüpler 10 dakika kaynayan su içerisinde bekletilmiştir. Bu işlemin ardından karışım 10000 g'de 20 saniye santrifüj edildikten sonra üst faz steril ependorf tüplere aktarıldıktan sonra -20 ^{o}C'de PZR analizlerinde kullanılmak için saklanmıştır.

3.6. *Cry1* Genlerinin PZR Analiziyle Araştırılması

İzole edilen *Bacillus* türlerinden *B. thuringiensis* olanları belirlemek ve *cry1* geni taşıyıp taşımadıklarını tespit etmek için *cry1C*130 ve *cry1B*367 primerleri kullanılarak total DNA'da PZR analizi yapılmıştır.

3.6.1. PZR'de Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Taq Polimeraz tamponu: 10x:100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 1mg/ml jelatin, $MgCl_2$: 25 mM ;
Nükleotid Karışımı: 10 mM dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP);
Taq Polimeraz Enzimi: 5u/µl;

3.6.2. PZR'de Kullanılan Primerler ve Uygulanan Program

cry1C 130, *cry1B* 367 primerleri kullanılmıştır.

*cry1C*130*:* CJ10reg5 5'AAAGATCTGGAACACCTTT 3'
CJ11reg3 5'CAAACTCTAAATCCTTTCAC 3'

*cry1B*367*:* CJ8reg5 5'CTTCATCACGATGGAGTAA 3'
CJ9reg3 5'CATAATTTGGTCGTTCTGTT 3'

cry1 Genleri İçin Uygulanan PZR Programı:

95 ^{o}C' de	2 dk	Başlangıç Denatürasyon Aşaması
95 ^{o}C' de	1 dk	30 Döngü
50 ^{o}C' de	1 dk	
72 ^{o}C' de	1 dk	
72 ^{o}C' de	5 dk	Son Uzama Aşaması

PZR reaksiyonundan sonra elde edilen PZR ürünleri + 4 ^{o}C'de saklanmış ve daha sonra bu ürünlerden 15 µl alınıp 1xTBE (Tris-Borate-EDTA, pH 8.0)'de hazırlanmış % 1'lik (w/v) agaroz jelde (10µl'lik etidyum bromür ilaveli), 80 V'da 1 saat yürütüldükten sonra jel görüntüleme cihazında (Vilbez Lourmat-Image) görüntülenmiştir.

3.7. İzolatların *E.kuehniella* ve *P. interpunctella* Larvaları Üzerine Öldürücü Etkisi

PZR yöntemi ile kristal gen taşıdıkları belirlenen *B. thuringiensis* izolatlarının *E.kuehniella* ve *P. interpunctella* larvaları üzerine toksik etkilerinin araştırılması Obeidat'ın önerdiği metoda göre yapılmıştır [52].

3.7.1. Spor ve Parasporal Kristal Proteinlerin Hazırlanması

PZR yöntemi ile insektisidal kristal gen taşıdıkları belirlenen 5 adet *B. thuringiensis* izolatı ve kontrol suşu olan *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, 100 ml'lik sıvı T3 besi yerine ekilmiştir. Sürekli çalkalamalı inkübatörde 200 rpm'de 30^{o} C de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.1). İnkübasyon sonunda örnekler 15000 rpm'de 15 dk. Santrifüj edildikten sonra elde edilen pellet (spor ve parasporal kristaller) 20 ml steril distile suda yıkanmış ve 15000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi aynı şekilde iki kez tekrarlanmıştır. Elde edilen pellet liyofilizasyon işlemi yapılmak üzere -80 ^{o}C'de saklanmıştır. Spor ve parasporal kristal proteinleri Erciyes Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde bulunan liyofilizatörde liyofilize edilmiştir.



Şekil 3.1. Çalkalamalı inkübatör

3.7.2. Spor ve Parasporal Kristal Proteinlerinin Böcek Larvaları Üzerine Öldürücü Etkisi

Denemeler Erciyes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Böcek Yetiştirme Laboratuarı'nda yapılmış ve denemelerde *Ephestia kuehniella* ZELLER, 1879 (un güvesi) (Lepidoptera), *Plodia interpunctella* HUBNER, 1813 (kuru meyve güvesi) (Lepidoptera)' nin aynı yaştaki (30 günlük) larvaları kullanılmıştır. Kontrol suşu olarak Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Laboratuarı'ndan temin edilen *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* kullanılmıştır. Böcek larvalarına uygulamada kullanılacak her izolat için hazırlanmış olan spor-parasporal kristal karışımının 250ppm (µg/ml), 1000ppm, 1500ppm oranlarında süspansiyonları hazırlanmıştır. Larvalara besin kaynağı olarak steril edilmiş ve ezilmiş yer fıstığı verilmiştir. 1 g yer fıstığı, hazırlanan spor-parasporal protein karışımı içerisinde 20 dakika bekletildikten sonra steril petri kaplarına yerleştirilmiş ve kurumaları beklenmiştir. Her bir petri kabına 10'ar tane larva konulmuş ve her deneme için 3 tekerrür yapılmıştır. Kontrol grubu için sadece ezilmiş yer fıstığı kullanılmıştır. Petri

kapları orantılı nemi % 70±5 ve sıcaklığı 27±0.5 ^{o}C'ye ayarlanmış böcek yetiştirme odasında tutulmuş ve 10 gün boyunca larvaların ölüm oranları gözlenmiştir.

3.8. Ultraviyole Radyasyonuyla Işınlanmış Böcek Larvalarının İncelenmesi

Denemeler Erciyes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Böcek Yetiştirme Laboratuarı'nda yapılmış ve denemelerde *Ephestia kuehniella* ZELLER, 1879 (un güvesi) (Lepidoptera), *Plodia interpunctella* HÜBNER, 1813 (kuru meyve güvesi) (Lepidoptera)'nın aynı yaştaki larvaları kullanılmıştır. Böcek larvaları steril petri kapları içerine 10'ar larva olacak şekilde konulmuş ve her bir deneme için 3 tekerrür yapılmıştır. Işınlama işlemi için UVGL–58 Handheld 254 / 365 nm 6 Watt, 230 V -50 Hz / 0,12 Amps' lik UV lambası kullanılmıştır (Şekil 3.2). Işınlama işlemi yapılacak larvalar Ultraviyole (UV) ışını uygulaması için UV kabini içerine yerleştirilmiş ve yaklaşık 19 cm yukarıdan ve 10, 30, 60 ve120 dk. boyunca UV ışınına maruz bırakılarak ölüm oranları belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Ultraviyole lambası

3.9. Ultraviyole Radyasyonuyla Işınlanmış Böcek Larvalarına Spor-Parasporal Kristal Proteinlerin Uygulanması

Denemeler Erciyes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Böcek Yetiştirme Laboratuarı'nda yapılmış ve denemelerde *Ephestia kuehniella* ZELLER, 1879 (un güvesi) (Lepidoptera), *Plodia interpunctella* HÜBNER, 1813 (kuru meyve güvesi) (Lepidoptera)'nın aynı yaştaki (30 Günlük) larvaları kullanılmıştır. Böcek larvaları steril petri kapları içerine 10'ar larva olacak şekilde konulmuş ve her bir deneme için 3 tekerrür yapılmıştır. Işınlama işlemi için özellikleri yukarıda belirtilen UV lambası kullanılmıştır. Işınlanacak larvalar UV lamp kabini içerine yerleştirilmiş ve yaklaşık 19 cm yukarıdan ve 120 dk. boyunca UV ışınına maruz bırakılmıştır. Işınlanmış böcek larvalarına her bir Bt izolatından elde edilmiş olan spor-kristal karışımından 250 1000 ve 1500ppm (µg/ml) uygulanmıştır. Toksinler larvaların besinine yukarıda belirtildiği şekilde uygulanmıştır. UV radyasyonu ile ışınlanmış (120 dk) larvalar spor-kristal protein karışımında 10 gün boyunca gözlemlenerek ölüm oranları belirlenmiştir.

4. BÖLÜM

BULGULAR

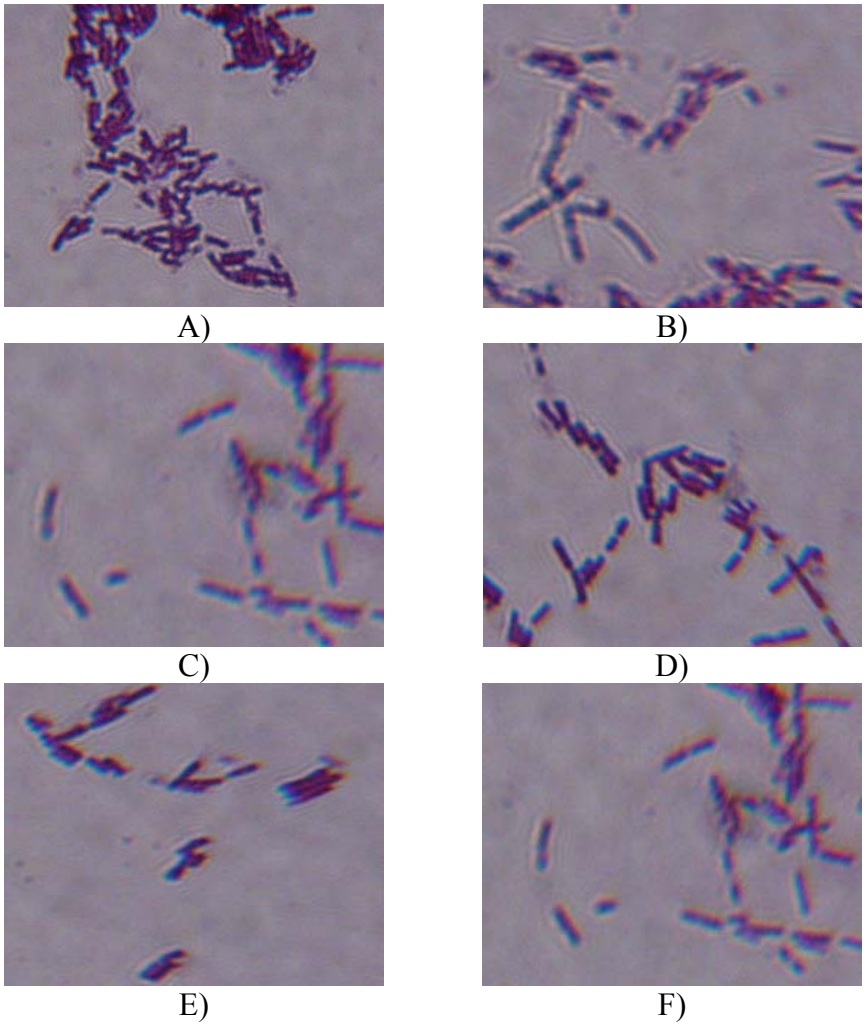
Bu çalışmada Kayseri'nin farklı yerlerindeki tarım arazilerinden (Mahzemin Kasabası, Sarız Yaylacı Köyü, Erciyes Üniversitesi Kampüsü) alınan toprak örneklerine sıra numarası verilmiş ve U harfi ile kodlanmıştır (Tablo 4.1). Toprak örneklerinden *Bacillus* cinsine ait toplam 60 tane bakteri izolasyonu yapılmıştır. Bu izolatlardan 60 tanesinin total DNA'ları *cry1C*130 *ve cry1B*367 primerleri ile PZR analizine tabi tutulmuştur. PZR analizinin değerlendirilmesi sonucu 60 izolattan 5'inin *cry1* geni taşıdığı tespit edilmiştir. *Cry1* genini taşımayan diğer 55 izolata ise burada yer verilmemiştir. İzolatların ve kontrol suşunun *E. kuehniella* ve *P. interpunctella* larvaları üzerindeki toksik etkileri incelenmiştir. Her iki türe ait 30 günlük larvalar UV radyasyonu ve Bt spor-prarasporal kristal karışımlarına ayrı ayrı maruz bırakılarak öldürücü etkiler belirlendikten sonra UV ışınına maruz bırakılan *E. kuehniella* ve *P. interpunctella* larvaları üzerine bu izolatların ve kontrol suşunun toksik etkileri araştırılmıştır.

4.1. *Bacillus* İzolasyonu ve İzolatların Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi

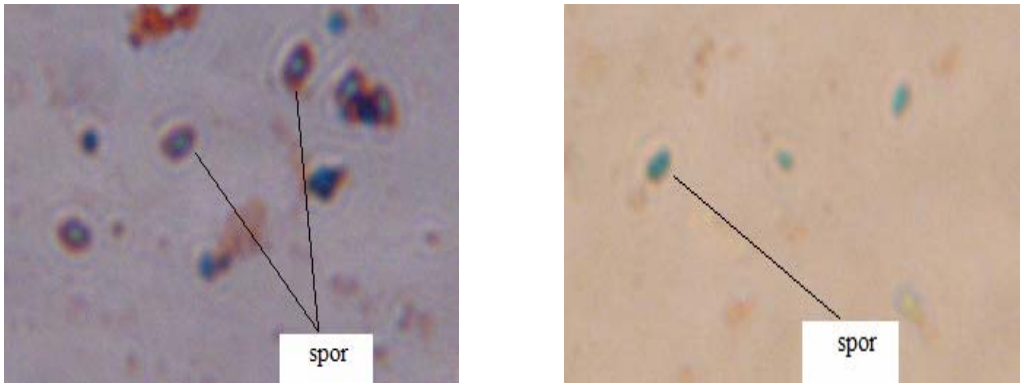
Bu çalışmada alınan toprak örneklerinden *Bacillus* izolasyonu Travers ve arkadaşlarının önerdiği yöntemler esas alınarak yapılmıştır [50]. İlk olarak kullanılan besi yeri 0.25 M Sodyum-Asetat ile tamponlandırılmış olduğu için seçici bir ortam sağlanmıştır. İzolasyon aşamasında 80 °C sıcaklık uygulaması yapılarak spor formu oluşturmayan bakteriler elimine edilmiştir. İzolatlar T3 katı sporlanma besi yerinde 30 °C' de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Saf koloniler elde edilene kadar seyreltme işlemine devam edilmiştir. Elde edilen izolatların gram, spor ve kristal protein boyamaları yapılarak morfolojik özellikleri mikroskop altında görüntülenmiştir (Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3).

Tablo 4.1. Toprak örneklerinden izole edilen *Bacillus* izolatlarından *cry1* geni taşıyanların alındıkları topraklar

Toprağın Alındığı Yer ve Numarası	*cry1* Geni Taşıdığı Tespit Edilen *B. thuringiensis* İzolatları
1-Mahzemin Kasabası (kabak tarlası)	U-6-6
2-Sarız Yaylacı Köyü (pancar tarlası)	U-14-2
3-Sarız Yaylacı Köyü (buğday tarlası)	U-14-1
4-Sarız Yaylacı Köyü (elma bahçesi)	U-14-4
5-Sarız Yaylacı Köyü (patates tarlası)	U-14-5

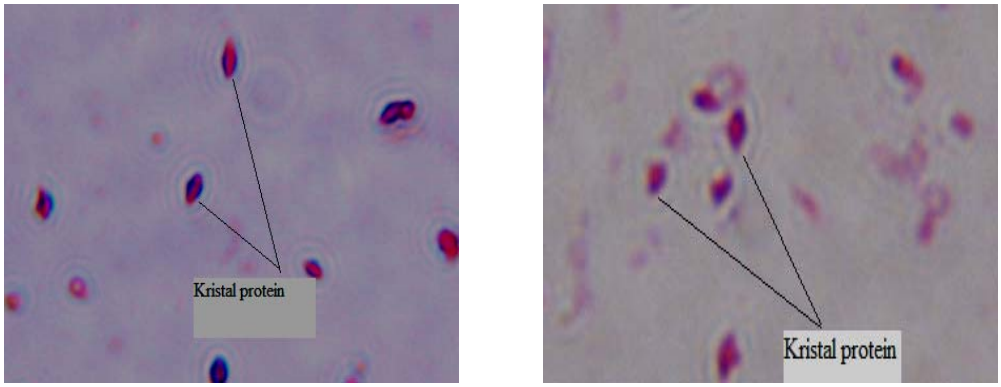


Şekil 4.1. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ve *cry* geni taşıdığı belirlenen izolatların gram boyama sonucu mikroskop görüntüleri, A) *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki,* (1000 X), B) U-6-6, (2000 X), C) U-14-2 (2000 X), D) U-14-5 (2000 X), E) U-14-1 (2000 X), F) U-14-4 (2000 X)



A) B)

Şekil 4.2. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ve U-6-6 izolatının spor boyama sonrası mikroskop görüntüsü. A) *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki,* (4000 X), B) U-6-6, (4000 X)

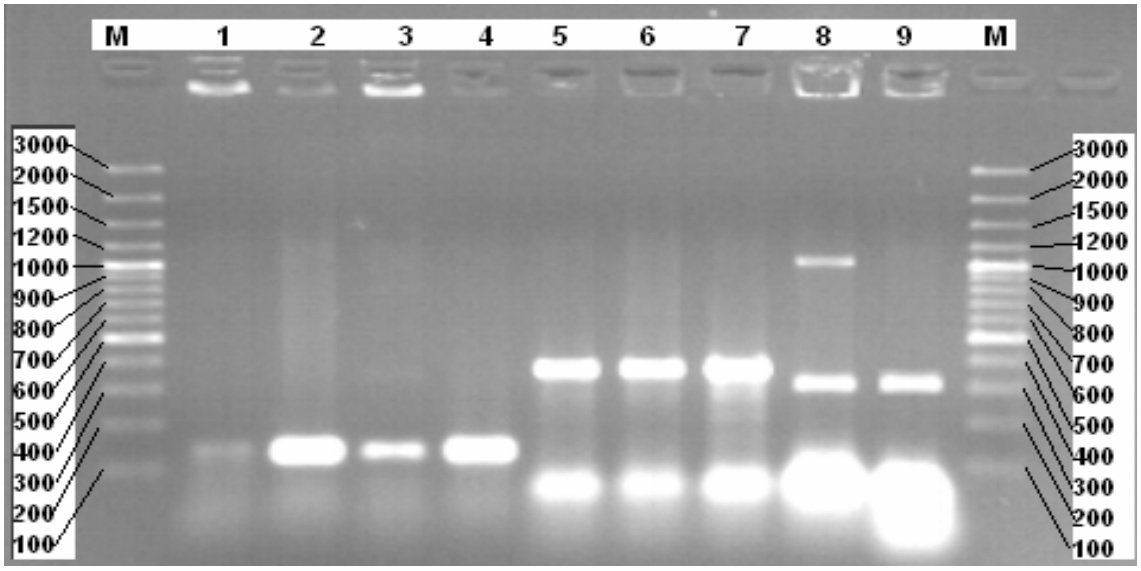


A) B)

Şekil 4.3. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ve U-6-6 izolatının kristal proteinlerinin ışık mikroskobundaki görüntüsü; A) *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki,* (4000 X), B) U-6-6, (4000 X).

4.2. *Cry1* Geninin PZR Analiziyle Belirlenmesi

Günümüzde PZR metodu birçok labarotuvarda rutin bir inceleme metodu haline gelmiştir. Her geçen gün yeni genler bu yöntemle tanımlanmaktadır. Bu genleri tanımlamada kullanılan yeni evrensel primer dizileri belirlenmektedir. Bu primerler *cry* genlerinin olup olmadığını teyit etmeye yardımcı olmaktadır [30]. *B. thuringiensis*'de insektisidal kristal gen analizleri, *cry1C*130 ve *cry1B*367 primerleri kullanılarak PZR yöntemi ile belirlenmiştir. *cry1C*130 ve *cry1B*367 primerleri kullanılarak yapılan PZR ürünlerinin bant büyüklükleri Şekil 4.4'de verilmiştir.

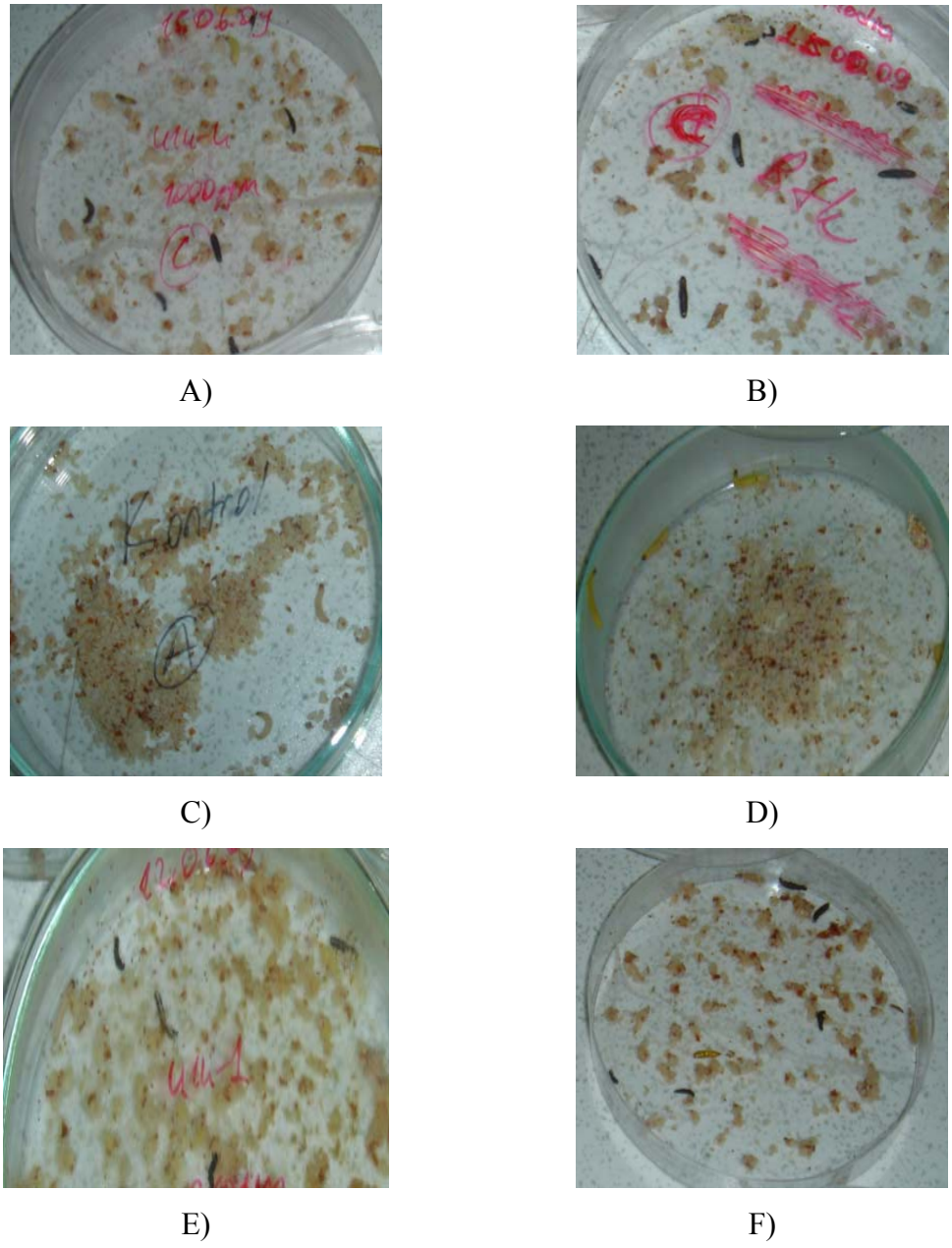


Şekil 4.4. Kontrol suşu ve izolatların *cry1C*130 ve *cry1B*367 primerleri ile yapılan PZR ürünlerinin jel görüntüsü 1-4 *cry1C*130 primeri ile elde edilen PZR ürünleri M DNA ladder 3000 bp, 1. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, 2. U-14-1, 3. U-14-2, 4. U-14-5; 5-9, *cry1B*367 primeri ile elde edilen PZR ürünleri 5. U-14-5, 6. U-14-1, 7. U-14-4, 8. U-6-6, 9. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki.*

U-14-1, U-14-2, U-14-5 numaralı izolatlar *cry1C* 130 primeriyle yapılan PZR reaksiyonunda *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ile aynı bant büyüklüğünü (130 bp) vermiştir. *Cry1B* 367 primeriyle yapılan PZR reaksiyonunda ise *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ve U-6-6 izolat 367 bp'lik bant büyüklüğüne sahip iken U-14-5, U-14-1, U-14-4, numaralı izolatlar yaklaşık olarak 400 bp büyüklüğünde bant vermiştir (Şekil 4.4).

4.3. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının *E. kuehniella* ve *P. interpunctella* larvaları Üzerine Öldürücü Etkisi

Kristal gen taşıdıkları belirlenen *B. thuringiensis* izolatlarının bazı böcek larvaları üzerine toksik etkisinin araştırılması Obeidat'ın önerdiği metoda göre yapılmıştır [52]. Çalışmalar sonucunda kontrol suşu ve izolatların Lepidoptera takımının Pyralidae familyasına ait *E. kuehniella* ve *P. interpunctella* larvaları üzerinde değişik oranlarda toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Kontrol suşu ve izolatların *E. kuehniella* ve *P. interpunctella* larvalarına uygulanması sonucu elde edilen öldürücü etkinin LD_{50} ve LD_{99} değerleri probit analiziyle hesaplanmıştır. Tablo 4.3 ve 4.4'de LD_{50} ve LD_{99} değerleri gösterilmiştir. Elde edilen izolatların ve kontrol suşunun *E. kuehniella* ve *P. interpunctella* larvaları üzerindeki öldürücü etkisi Şekil 4.5'de gösterilmiştir.



A) B)

C) D)

E) F)

Şekil 4.5. Kontrol suşu, U-14-4 ve U-14-1 izolatlarının sırasıyla *P. interpunctella* ve *E. kuehniella* larvaları üzerindeki insektisidal etkisinin görünümü. A) U-14-4 B) *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, C) Kontrol (*E. kuehniella),* D) Kontrol (*P. interpunctella*), E) U-14-1, F) *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

Tablo.4.2. Çeşitli tarım arazilerinden izole edilen *B. thrungiensis* izolatlarının (spor-kristal protein karışımı ppm (µg/ml)) *P. interpunctella* larvaları üzerine öldürücü etkileri

İzolatlar	LD_{50}	LD_{99}	χ^2	SD	*P*
U-6-6	1204.16	3036.59	41.232	3	0.001
U-14-5	1488.52	3617.95	30.982	3	0.001
U-14-2	1993.11	3420.68	0.799	3	0.850
U-14-4	1269.12	3203.01	40.94	3	0.001
U-14-1	1603.06	3829.55	29.21	3	0.001
Btk	1114.07	3028.74	58.96	3	0.001

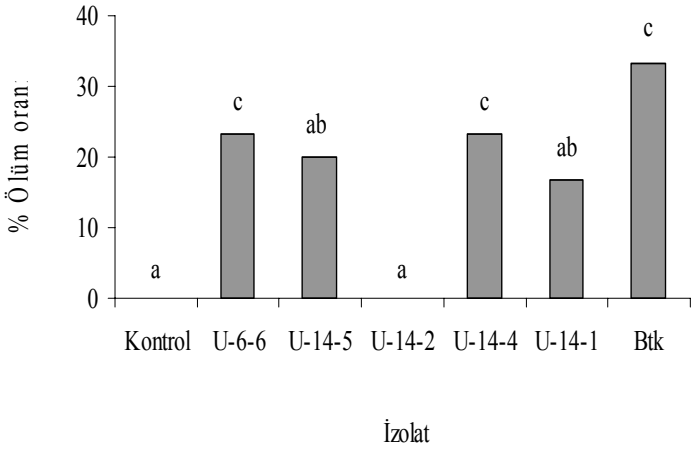
Tablo.4.2.'de görüldüğü gibi *P. interpunctella* larvaları üzerinde yapılan biyoassay denemeleri sonucunda *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*'nin LD_{99} değeri 3028.74 olarak bulunmuş, buna en yakın değer U-6-6 ve U-14-4 izolatlarında elde edilmiştir. U14-2 izolatının 250 ppm (µg/ml) de herhangi bir öldürücü etkisi gözlenmezken 1000 ve 1500 ppm'lik (µg/ml) uygulamalarda ise öldürücü etkisinin olduğu fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p=0.850$). Diğer izolatların öldürücü etkileri istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür. ($p<0.05$).

Tablo.4.3. Çeşitli tarım arazilerinden izole edilen *B. thrungiensis* izolatlarının (spor-kristal protein karışımı ppm (µg/ml)) *E. kuehniella* larvaları üzerine öldürücü etkileri

İzolatlar	LD_{50}	LD_{99}	χ^2	SD	P
U-6-6	1465.07	3419.69	22.886	3	0.001
U-14-5	2290.06	4980.92	14.98	3	0.002
U-14-2	1900.86	4805.19	41.65	3	0.001
U-14-4	1971.45	4464.84	19.67	3	0.001
U-14-1	1569.56	4267.63	60.87	3	0.001
Btk	1072.58	3019.27	76.69	3	0.001

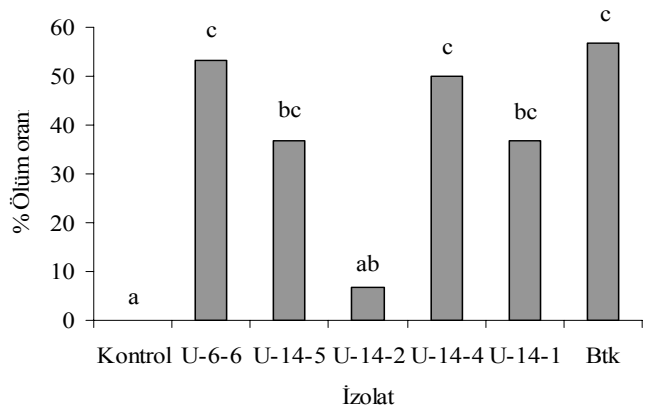
Tablo.4.3.'de görüldüğü gibi *E. kuehniella* larvaları üzerinde yapılan biyoassay denemeleri sonucunda LD_{99} değeri en düşük olan suş *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* olarak bulunmuş buna en yakın değer U-6-6 ve U-14-1 izolatlarında elde edilmiştir.

Yapılan probit analizi sonucunda izolatların öldürücü etkisi istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0.05$).



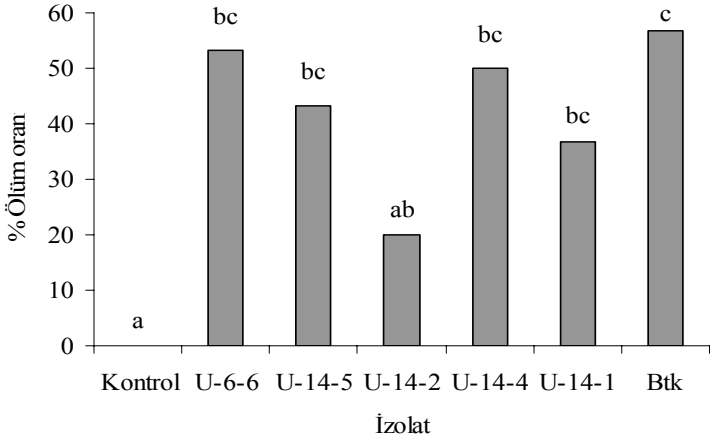
Şekil 4.6. Spor-kristal karışımının (250 ppm) *P. interpunctella* larvaları üzerine öldürücü etkisi. (Çubuklar üzerinde aynı küçük harfle gösterilen değerlerin ortalamaları Varyans analizi ve Duncan testine göre %5 oranında istatistiksel olarak önemli değildir).

Şekil 4.6'da görüldüğü gibi *P. interpunctella* larvalarına 250 ppm (µg/ml)'lik spor-kristal karışım uygulandığında U-6-6 ve U-14-4 numaralı izolatların *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*'ye yakın etki gösterirken, U-14-2 izolatının hiç etki göstermediği belirlenmiştir.



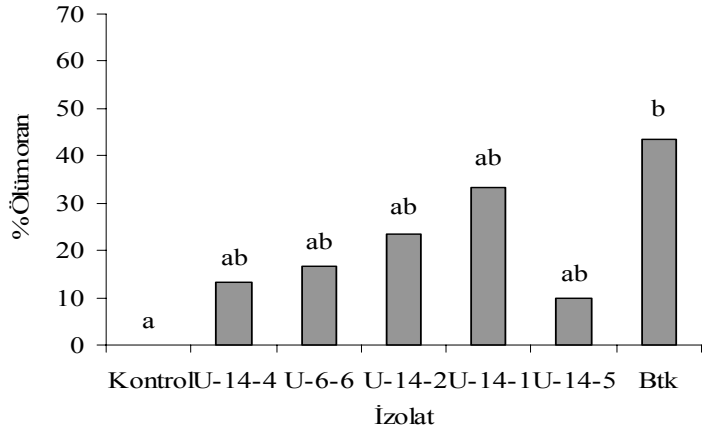
Şekil 4.7. Spor-kristal karışımının (1000 ppm) *P. interpunctella* larvaları üzerine öldürücü etkisi. (Çubuklar üzerinde aynı küçük harfle gösterilen değerlerin ortalamaları Varyans analizi ve Duncan testine göre %5 oranında istatistiksel olarak önemli değildir).

Şekil 4.7'de görüldüğü gibi 1000 ppm (µg/ml)'lik spor-kristal karışım uygulamasında U-6-6 ve U-14-4 izolatlarının *P. interpunctella* larvaları üzerinde kontrol suşu *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*'ye yakın değerde öldürücü etki gösterirken, U-14-2 numaralı izolatın kontrol grubuna göre çok etkili olmadığı gözlenmiştir.



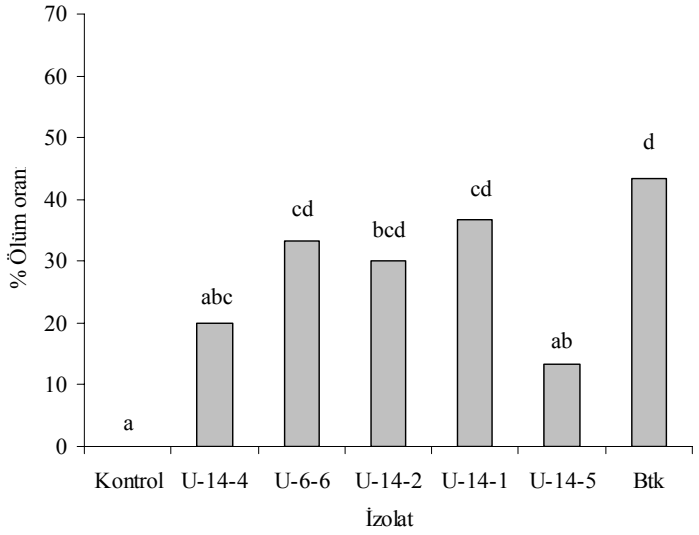
Şekil 4.8. Spor-kristal karışımının (1500 ppm) *P. interpunctella* larvaları üzerine öldürücü etkisi. (Çubuklar üzerinde aynı küçük harfle gösterilen değerlerin ortalamaları Varyans analizi ve Duncan testine göre %5 oranında istatistiksel olarak önemli değildir).

P. interpunctella larvaları üzerine 1500 ppm (µg/ml)'lik spor-kristal karışım uygulamasında (Şekil 4.8.) U-6-6 ve U-14-4 numaralı izolatlar benzer etki gösterirken, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki'*nin izolatlara göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. *P. interpunctella* larvaları üzerinde 1000 ve 1500 ppm'lik uygulamaların 250 ppm'lik uygulamalara göre öldürücü etkisi daha yüksek olmasına karşın, 1000 ve 1500 ppm'lik uygulamaların öldürücü etkisi arasında önemli bir fark olmadığı görülmüştür ($P>0.05$).



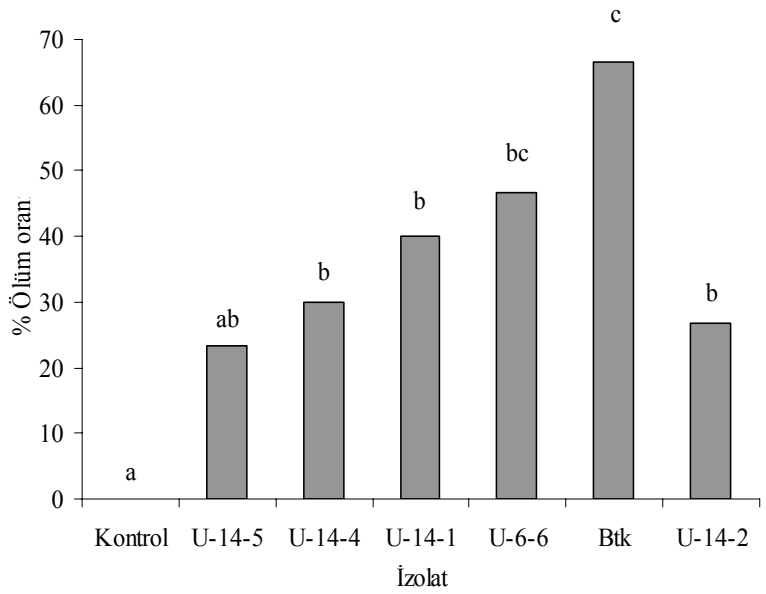
Şekil 4.9. Spor-kristal karışımının (250 ppm) *E. kuehniella* larvaları üzerine öldürücü etkisi. (Çubuklar üzerinde aynı küçük harfle gösterilen değerlerin ortalamaları Varyans analizi ve Duncan testine göre %5 oranında istatistiksel olarak önemli değildir).

E. kuehniella larvaları üzerine 250 ppm (µg/ml)'lik spor kristal karışımı uygulamasında (Şekil 4.9) kontrol suşu *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*'nin izolatlara göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. İzolatlar arasında ise istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.10 Spor kristal karışımının (1000 ppm) *E. kuehniella* larvaları üzerine öldürücü etkisi. (Çubuklar üzerinde aynı küçük harfle gösterilen değerlerin ortalamaları Varyans analizi ve Duncan testine göre %5 oranında istatistiksel olarak önemli değildir).

E. kuehniella larvaları üzerine 1000 ppm (µg/ml)'lik spor-kristal karışımı uygulamasında(Şekil 4.10.) U-6-6 ve U-14-1 numaralı izolatlar çok yakın etki göstermiştir. Kontrol suşu *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ise izolatlara göre daha etkili olduğu belirlenmiştir.

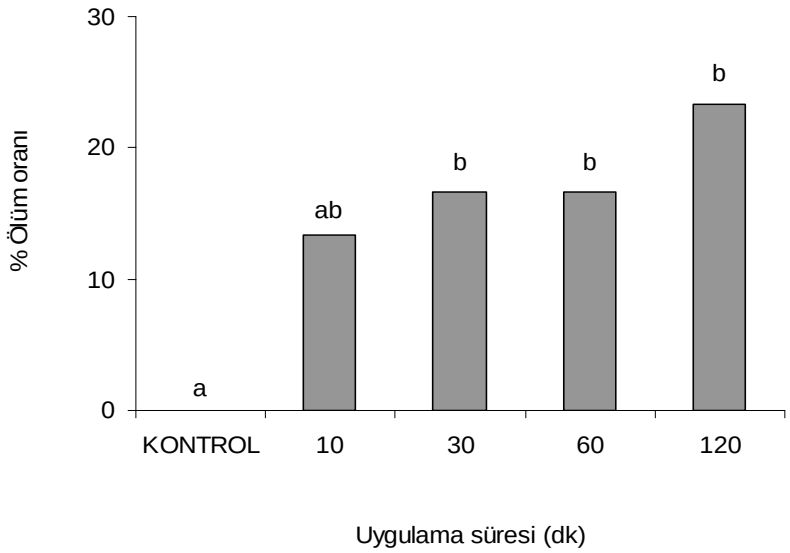


Şekil 4.11. Spor kristal karışımının (1500 ppm) *E. kuehniella* larvaları üzerine öldürücü etkisi. (Çubuklar üzerinde aynı küçük harfle gösterilen değerlerin ortalamaları Varyans analizi ve Duncan testine göre %5 oranında istatistiksel olarak önemli değildir).

E. kuehniella larvaları üzerine 1500 ppm (µg/ml)'lik spor-kristal karışımı uygulamasında(Şekil 4.11.) U-6-6 numaralı izolat ve kontrol suşu *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*'nin etkili olduğu belirlenmiştir. U-14-4, U-14-1, U-14-2 numaralı izolatlar yakın öldürme oranı göstermişlerdir. U-14-2 numaralı izolat dışında artan doza bağlı olarak (250, 1000, 1500 ppm) *E. kuehniella* larvalarının ölüm oranlarının arttığı gözlenmiştir.

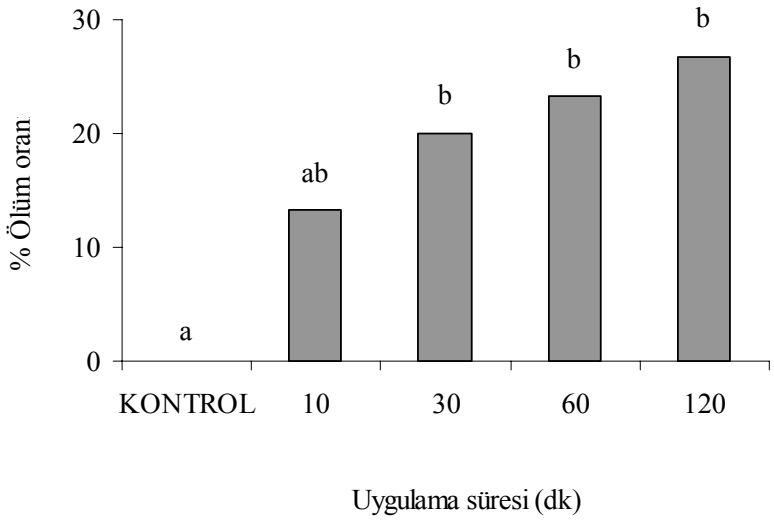
4.4. Böcek Larvaları Üzerine Ultraviyole (UV) radyasyonunun Etkisi

Ultraviyole uygulamasında *P. interpunctella* ve *E. kuehniella*'nın aynı yaştaki larvaları kullanılmıştır. Uygulama sonucunda larvaların ölüm oranları Şekil 4.12. ve Şekil 4.13.'de verilmiştir.



Şekil 4.12. UV radyasyonunun *P. interpunctella* larvaları üzerine öldürücü etkisi (Çubuklar üzerinde aynı küçük harfle gösterilen değerlerin ortalamaları Varyans analizi ve Duncan testine göre %5 oranında istatistiksel olarak önemli değildir).

10, 30, 60, 120 dk. ışınlanmış olan *P. interpunctella* larvaları kontrol grubuna göre ölüm oranının daha yüksek olduğu ancak 30, 60, 120 dk. ışınlanan larvaların ölüm oranlarının birbirine yakın olduğu belirlenmiştir.

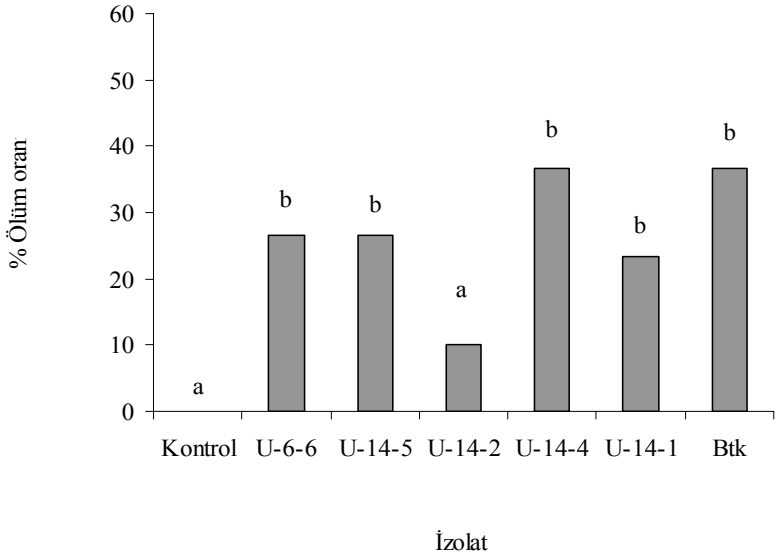


Şekil 4.13. UV radyasyonunun *E. kuehniella* larvaları üzerine öldürücü etkisi (Çubuklar üzerinde aynı küçük harfle gösterilen değerlerin ortalamaları Varyans analizi ve Duncan testine göre %5 oranında istatistiksel olarak önemli değildir).

10, 30, 60 120 dk. ışınlanmış olan *E. kuehniella* larvaları kontrol (ışınlanmamış larvalar) grubuna göre ekili olduğu ancak 30, 60, 120 dk. ışınlanan larvaların ölüm oranlarının birbirine yakın olduğu belirlenmiştir.

4.5. Işınlanmış Böcek Larvalarına Spor-Prarasporal Kristal Proteinlerinin Etkileri

120 dakika Ultraviyole (UV) ile ışınlanan *P. interpunctella* larvaları ve *E. kuehniella* larvaları üzerine spor ve parasporal kristal proteinlerinin etkisi Şekil 4.14., 4.15., 4.16. ve 4.17'de gösterilmiştir.

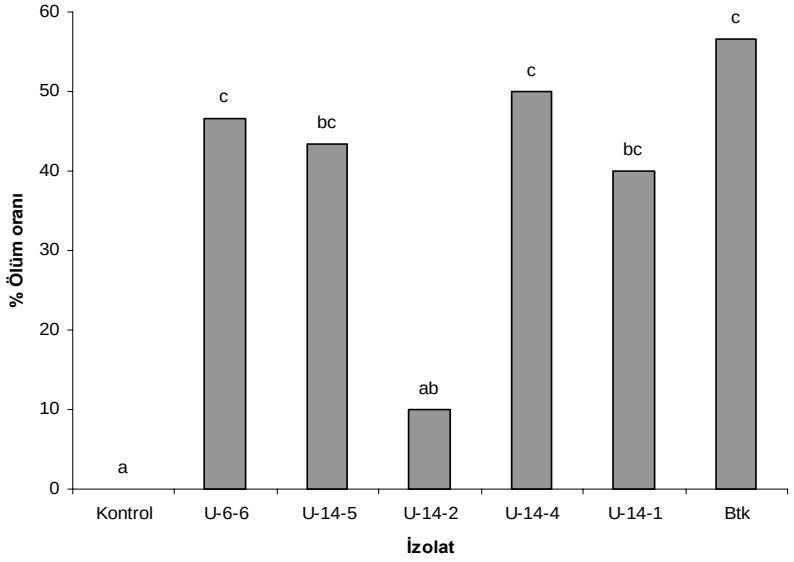


Şekil 4.14 Spor-kristal karışımı (250 ppm) ve UV radyasyonunun (120 dk.) birlikte uygulanmasının *P. interpunctella* larvaları üzerine öldürücü etkisi (Çubuklar üzerinde aynı küçük harfle gösterilen değerlerin ortalamaları Varyans analizi ve Duncan testine göre %5 oranında istatistiksel olarak önemli değildir).

P. interpunctella larvalarına yalnız U-6-6, izolatı (250 ppm) uygulandığında larvaların % 23.33'ü öldürmüşken (Şekil 4.6.) aynı izolat (250 ppm) ile UV radyasyonu (120 dk) birlikte uygulandığında larvaların ölüm oranı %26.67 olarak gözlenmiştir. U-14-5 (250 ppm) izolatı uygulandığında larvaların %20'sini öldürmüşken (Şekil 4.6.) aynı izolat (250 ppm) ile UV radyasyonu (120 dk) birlikte uygulandığında ölüm oranı % 26.67 olarak belirlenmiştir.

U-14-2 izolatının 250 ppm'lik dozu larvalara uygulandığında ölüm gözlenmezken (Şekil 4.6.) aynı izolat (250 ppm) ile UV radyasyonu (120 dk) birlikte uygulandığında

%10 oranında ölüm gözlenmiştir. U-14-4 izolatı 250 ppm'lik dozu uygulandığında larvaların %23.33'ü öldürmüşken (Şekil 4.6.) aynı izolat (250 ppm) ile UV radyasyonu (120 dk) birlikte uygulandığında ölüm oranının % 36.66'ya yükseldiği gözlenmiştir. U-14-1 izolatı 250 ppm oranında uygulandığında larvaların %16.67'sini öldürmüşken (Şekil 4.6.) aynı izolat (250 ppm) ile UV radyasyonu (120 dk) birlikte uygulandığında ölüm oranı % 23.33 olarak gözlenmiştir. Aynı dozdaki (250 ppm) kontrol suşu *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* larvaların % 33.33'ünü öldürmüşken (Şekil 4.6.) aynı suş (250 ppm) ile UV radyasyonu (120 dk) birlikte uygulandığında ölüm oranının % 36.66 olduğu belirlenmiştir.

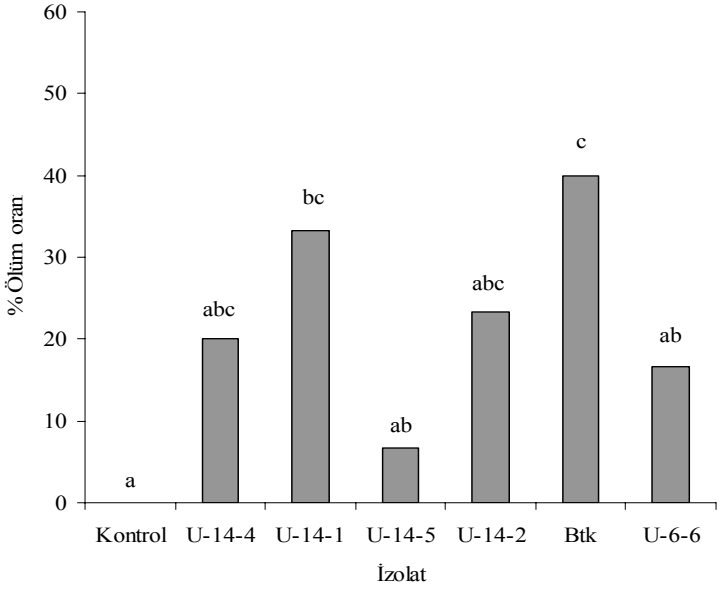


Şekil 4.15. Spor - kristal karışımı (1000 ppm) ve UV radyasyonunun (120 dk.) birlikte uygulanmasının *P. interpunctella* larvaları üzerine öldürücü etkisi (Çubuklar üzerinde aynı küçük harfle gösterilen değerlerin ortalamaları Varyans analizi ve Duncan testine göre %5 oranında istatistiksel olarak önemli değildir).

U-6-6 izolatı 1000 ppm oranında uygulandığında larvaların % 53.33'ü ölmüşken (Şekil 4.7.) aynı izolat (1000 ppm) ile UV radyasyonu (120 dk.) birlikte uygulandığında ölüm oranının % 46.66 olduğu gözlenmiştir.

U-14-5 izolatı 1000 ppm oranında uygulandığında larvaların % 36.67'sini öldürmüşken (Şekil 4.7.) aynı izolat (1000 ppm) ile UV radyasyonu (120 dk.) birlikte uygulandığında ölüm oranı % 43.33 'e yükselmiştir. U-14-2 izolatının aynı dozu (1000 ppm) uygulandığında larvaların % 6.67'sini öldürmüşken (Şekil 4.7.) aynı izolat (1000

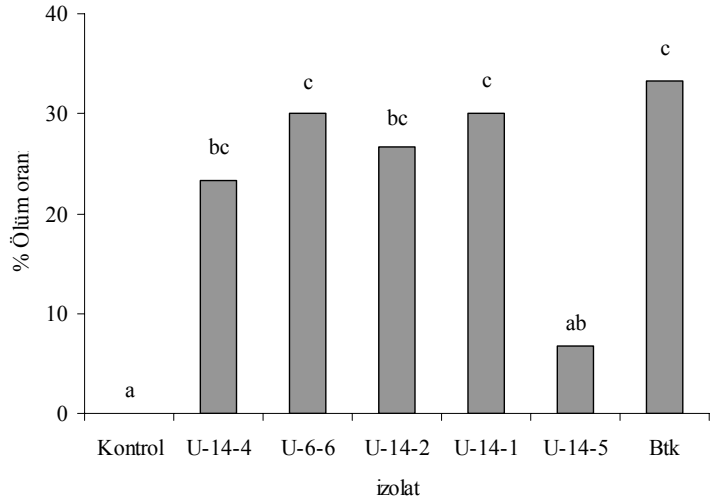
ppm) ile UV radyasyonu (120 dk.) birlikte uygulandığında ölüm oranı %10 olarak gözlenmiştir. U-14-4 izolatının 1000 ppm'lik uygulaması larvaların % 50'sini öldürmüşken (Şekil 4.7.) aynı izolat (1000 ppm) ile UV radyasyonu (120 dk.) birlikte uygulandığında ölüm oranının değişmediği gözlenmiştir. U-14-1 izolatı 1000 ppm oranında uygulandığında larvaların %36.67'sini öldürmüşken (Şekil 4.7.) aynı izolat (1000 ppm) ile UV radyasyonu (120 dk.) birlikte uygulandığında ölüm oranının %40 olduğu gözlenmiştir. Kontrol suşu *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 1000 ppm oranında uygulandığında larvaların % 56.67'i ölmüşken (Şekil 4.7.) aynı suş (1000 ppm) ile UV radyasyonu (120 dk.) birlikte uygulandığında ölüm oranının % 57.66 olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.16. Spor - kristal karışımı (250 ppm) ve UV radyasyonunun (120 dk.) birlikte uygulanmasının *E. kuehniella* larvaları üzerine öldürücü etkisi (Çubuklar üzerinde aynı küçük harfle gösterilen değerlerin ortalamaları Varyans analizi ve Duncan testine göre %5 oranında istatistiksel olarak önemli değildir).

E. kuehniella larvalarına yalnız U-14-4 izolatı 250 ppm oranında uygulandığında larvaların % 13.33'ü ölmüşken (Şekil 4.9.), aynı izolat (250 ppm) ile UV radyasyonu (120 dk) birlikte uygulandığında ölüm oranının % 20 olduğu gözlenmiştir. U-14-1 izolatı (250 ppm) uygulandığında larvaların % 33.33'ü ölmüşken (Şekil 4.9.), aynı izolat ile UV radyasyonu (120 dk.) birlikte uygulandığında ölüm oranının değişmediği gözlenmiştir.

U-14-5 izolatı 250 ppm oranında uygulandığında larvaların % 10'unu öldürmüşken (Şekil 4.9.) aynı izolat ile UV radyasyonu (120 dk.) birlikte uygulandığında ölüm oranının % 6.67 olduğu gözlenmiştir. U-14-2 izolatı 250 ppm oranında uygulandığında larvaların %23.33'ü ölmüşken (Şekil 4.9.) aynı izolat ile UV radyasyonu (120 dk.) birlikte uygulandığında ölüm oranının değişmediği gözlenmiştir. Kontrol suşu *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 250 ppm'lik uygulamada larvaların % 43.33'ünü öldürmüşken (Şekil 4.9.) aynı suş ile UV radyasyonu (120 dk.) birlikte uygulandığında ölüm oranı % 40 olduğu gözlenmiştir. U-6-6 izolatının 250 ppm'lik uygulamasında larvaların % 16.67'sini öldürmüşken (Şekil 4.9.) aynı izolat ile UV radyasyonu (120 dk.) birlikte uygulandığında ölüm oranının değişmediği gözlenmiştir.



Şekil 4.17. Spor - kristal karışımı (1000 ppm) ve UV radyasyonunun (120 dk.) birlikte uygulanmasının *E. kuehniella* larvaları üzerine öldürücü etkisi (Çubuklar üzerinde aynı küçük harfle gösterilen değerlerin ortalamaları Varyans analizi ve Duncan testine göre %5 oranında istatistiksel olarak önemli değildir).

U-14-4 izolatı 1000 ppm oranında uygulandığında larvaların %20'sini öldürmüşken (Şekil 4.10.) aynı izolat 1000 ppm oranında UV radyasyonuyla (120 dk.) birlikte uygulandığında ölüm oranının % 23.33 olduğu belirlenmiştir. U-6-6 izolatı 1000 ppm oranında uygulandığında larvaların % 33.33'ünü öldürmüşken (Şekil 4.10.) aynı izolat 1000 ppm oranında UV radyasyonuyla (120 dk.) birlikte uygulandığında ölüm oranı % 30 olarak gözlenmiştir.

U-14-2 izolatı 1000 ppm oranında uygulandığında larvaların % 30'unu öldürmüşken (Şekil 4.10.) aynı izolat 1000 ppm oranında UV radyasyonuyla (120 dk.) birlikte uygulandığında ölüm oranının % 26.67 olduğu gözlenmiştir. U-14-1 izolatı 1000 ppm oranında uygulandığında larvaların % 36.67'ini öldürmüşken (Şekil 4.10.) aynı izolat 1000 ppm oranında UV radyasyonuyla (120 dk) birlikte uygulandığında ölüm oranının % 30 olduğu gözlenmiştir.

U-14-5 izolatı 1000 ppm oranında uygulandığında larvaların % 13.33'ünü öldürmüşken (Şekil 4.10.) aynı izolat 1000 ppm oranında UV radyasyonu (120 dk.) ile birlikte uygulandığında ölüm oranı % 6.67 olarak gözlenmiştir. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 1000 ppm oranında uygulandığında larvaların % 43.33'ünü öldürmüşken (Şekil 4.10.) aynı suş 1000 ppm oranında UV radyasyonuyla (120 dk.) birlikte uygulandığında ölüm oranının %33.33 olduğu gözlenmiştir.

5. BÖLÜM

TARTIŞMA VE SONUÇ

Depolanmış ürünlere zararlı böceklerin bulaşması besinin kalitesini azalttığı ve besin değerini olumsuz etkilediği için büyük ekonomik zararlara neden olur [53, 54]. Depolanmış ürünleri korumak için fumigantlar ve diğer kimyasal böcek öldürücüler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır, fakat bu gibi maddelerin yoğun olarak kullanılmaları kalıntı bırakmakta ve çeşitli böceklerin direnç geliştirmesine neden olmaktadır. Bu yüzden alternatif ve daha güvenli mücadele yöntemlerinin geliştirilebilmesi büyük önem kazanmaktadır. Mikrobiyal insektisitler ve radyasyon kullanımı bu yüzden güvenli metotlar arasında yer almaktadır. Besinlerin korunmasında radyasyon teknolojisinin alternatif olarak kullanılabileceği, radyasyonun sebze ve meyvelerin raf ömrünü uzattığı, radyasyon uygulaması ile ürünlerin kalitesini uzun süre korunduğu belirtilmiştir [55]. Birçok insan ışınlanmış ürünleri kimyasal maddelerle korunmuş ürünlerden daha fazla tercih etmektedir. Depo koşullarındaki ürünleri korumak için genellikle gamma ve X ışınları gibi iyonlaştırıcı radyasyonlar uygulanmaktadır. UV radyasyonunun geçirgenlik derecesi düşük olduğu için depolanmış ürünlerin korunmasında kullanım alanı daha azdır. Fakat UV radyasyonu evde kullanılan besin ürünlerinin korunmasında daha pratik olarak uygulanabilir [56]. UV ışını mikrop öldürücü, böcek cezp edici olarak [57], embriyo fizyolojik çalışmalarda ve böcek yumurtalarının yüzey dezenfeksiyonunda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [58]. Birçok araştırmacı depolanmış ürün zararlılarının gelişmesini baskılamada UV radyasyonunun kullanımını önermişlerdir [59-64].

Dünya genelinde böceklerle mücadelede yaygın bir şekilde kullanılan güvenilir diğer bir metot ise entomopatojenik mikroorganizma olan *Bacillus thuringiensis* (Bt) toksinlerinin kullanılmasıdır [2]. Gram-pozitif bir bakteri olan *Bacillus thuringiensis* (Bt) biyopestisit olarak Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera takımlarına ait zararlılara

karşı dünyanın birçok yerinde uygulanmaktadır. Bt'in insektisidal aktivitesi sporlanma sırasında üretmiş oldukları Cry proteinler veya δ-endotoksinler diye bilinen kristal proteinlerden kaynaklanmaktadır [31]. Bu toksinleri duyarlı böceklerin orta barsak lümenindeki alkali ortamda çözünür ve ardından proteazlar tarafından aktif toksin haline dönüştürülürler. Aktifleşen toksin orta barsak epitelinin fırça kenarlı yüzeyindeki reseptörlere tutunur. Oligomerik toksinler spesifik reseptörlere bağlandıktan sonra membran yapısında porlar oluşturarak bu hücrelerdeki ozmotik dengeyi bozarlar [65, 66]. Sonunda larva beslenmeyi durdurur ve zehirlenme ya da açlık yüzünden ölür [67, 31].

Cry genlerini tespit etmek amacıyla yapılan çalışmada Kayseri'nin çeşitli tarım arazilerinden alınan toprak örneklerinden 60 izolat elde edilmiş ve bunlardan 5 tanesinin Bt olduğu tespit edilmiştir. Laboratuar ortamında bu izolatların *E. kuehniella* ve *P. interpunctella* larvaları üzerinde öldürücü etkileri araştırılmış ve kontrol suşu olan Btk ile kıyaslanmıştır. Bu kapsamda 250, 1000 ve 1500 ppm (µg/ml.) dozlarında spor-kristal karışımı 1ml su içerisinde homojinize edilerek 1 g. ezilmiş fıstığa emdirilmiş ve üçer tekerrür halinde larvalara uygulanmıştır.

Toksisite denemelerinde *E.kuehniella* ve *P. interpunctella* larvaları kullanılmıştır. Bt normal olarak toprakta yaşayan böcek larvaları üzerinde toksik değildir [16], fakat hava ve su ortamında yaşayan larvalar için toksik etki gösterir [68].

Cry1 proteinlerinin Lepidoptera takımına karşı öldürücü etkisinin olduğu bilinmektedir [69]. *E.kuehniella* ve *P. interpunctella* depo zararlılarının ciddi ekonomik kayba neden olduğu bilinmektedir. Bu zararlılara karşı etkili olan Cry1 proteinlerini bulmak ve ışınlanmış larvalar üzerinde bu proteinlerin etkisini gözlemlemek amacıyla, elde ettiğimiz izolatlarda, *cry1C*130 ve *cry1B*367 primerleri kullanılarak PZR yöntemi ile *cry1* geni taşıyan izolatlar tespit edilmiştir. *Cry1C130* primeri ile yapılan DNA amplifikasyonunda U-14-1, U-14-2, ve U-14-5 izolatları kontrol şusu ile birlikte 130 bp büyüklüğünde bant vermiştir (Şekil 4.4.). *cry1B*367 primeri ile yapılan DNA amplifikasyonunda ise U-6-6 izolatı kontrol suşunda olduğu gibi 367 bp büyüklüğünde bant vermiş, ayrıca yaklaşık olarak 1100 bp büyüklüğünde ikinci bir bant daha vermiştir (Şekil.4.4.). U-6-6 izolatı ve Btk'nin birbirine yakın oranda öldürücü etki gösterdiği gözlenmiştir. Fakat U-14-5, U-14-1, U-14-4 izolatları ise *cry1B*367 primeri ile yapılan PZR işleminde yaklaşık olarak 400 bp büyüklüğünde bant vermiştir (Şekil 4.4.). Benzer

şekilde Bravo ve ark.(1998) yaptıkları çalışmada *cry1* primeri ile 65 suşta, *cry3* primeri ile de 25 suşta PZR analizi sonucunda kontrol suşundakinden farklı boyutlarda ürün elde etmişlerdir [28].

U-14-5, U-14-1, U-14-4 izolatları kontrol suşuyla kıyaslandığında öldürücü etkilerinin daha düşük olduğu görülmüştür. Bu durum elde ettiğimiz izolatlarda bant büyüklüklerinin bioaktivite ile paralel olduğunu göstermektedir. Oysa U-6-6 Btk ile benzer büyüklükte bant vermiş ve benzer oranda öldürücü etki göstermiştir.

İncelenen 5 izolattan U-6-6'nın hem *E. kuehniella* hemde *P. interpunctella* larvalarına karşı Btk ile benzer etki gösterdiği, U-14-2'nin ise *E. kuehniella* 'da etkili olup *P. interpunctella*'da ise kayda değer bir etki göstermediği gözlenmiştir. Spor-kristal karışımı uygulanan larvaların kontrol larva grubu ile kıyaslandığında larval gelişim peryodunun belirgin bir şekilde zayıfladığı görülmüştür (sonuçlar gösterilmemiştir). Bazı yazarlar larval gelişimdeki bu tür bir gerilemenin bitki üzerindeki zararı önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir [70,71].

Chak ve ark. (1994) *cry1Aa*, *cry1Ab* ve *cry1A*c genlerini birlikte veya ayrı ayrı taşıyan izolatların bioassay çalışmalarında *Spodoptera* spp. ve *Manduca sexta* türlerine karşı, sadece *cry1C* veya *cry1D* taşıyan izolatlara oranla daha etkili olduğunu göstermişlerdir [72]. Bu çalışmada U-14-1, U-14-5 izolatları hem *cry1C*130 ve hemde *cry1B*367 primeri ile bant vermiş olmasına rağmen öldürücü etkisinin diğer izolatlara göre fazla olmadığı gözlenmiştir.

Faruki ve ark.(2005) yaptıkları çalışmada *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) larvalarında UV radyasyonu uygulamasında doz artışına bağlı olarak larva ölümlerinin arttığını belirtmiş ayrıca UV radyasyonuna bağlı olarak *Bombyx mori* larvalarının ağırlıklarında önemli ölçüde azalma olduğunu ortaya koymuşlardır [73]. İpek böceği larvalarında gama radyasyonu uygulanması sonucunda büyüme ve diğer kantitatif karakterlerin değiştiği belirtilmiştir [74]. Bizim çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. *E. kuehniella* ve *P. İnterpunctella* larvalarına UV uygulamasında artan uygulama süresine bağlı olarak kontrol gurubuna göre larvaların ölüm oranlarında artış olduğu belirlenmiştir.

Gama radyasyonun ve Bt'in farklı doz kombinasyonlarında *C. cautella* larvaları üzerinde ciddi hasarlar oluşturduğu belirtilmiştir [75]. Yapılan diğer bir çalışmada ise UV uygulanmış *C. cautella* larvalarına Bt uygulandığında 24 ve 72 saat sonra larva ölüm oranının arttığı belirtilmiştir [61].

Bu çalışmada yukarda belirtilen mücadele yöntemlerinin etkinliğini artırabilmek amacıyla Kayseri'nin değişik bölgelerindeki tarım arazilerinden izole edilen Bt izolatlarının kristal toksinleri ve UV radyasyonu birlikte uygulanmıştır. Yaptığımız çalışmalar sonucunda *E. kuehniella* ve *P. interpunctella* larvalarına UV radyasyonu uygulaması sonucunda larva ölüm oranını artırdığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra tarım arazilerinden izole edilen U-6-6, U-14-5, U-14-2, U-14-4, U-14-1 izolatlarının *P. interpunctella* larvaları üzerindeki öldürücü etkisinin *E. kuehniella* larvalarına göre daha fazla olduğu görülmüştür. Fakat kontrol suşu olarak kullanılan *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk)'nin ise *E. kuehniella* larvaları üzerindeki öldürücü etkisinin *P. interpunctella* larvaları üzerindeki öldürücü etkisine göre daha fazla olduğu belirlenmiştir.

P. interpunctella larvalarına UV ile birlikte 250 ppm spor-kristal karışımı uygulandığında izolatların ölüm oranını arttırdığı gözlenmiş; UV ile birlikte 1000 ppm spor-kristal karışımı uygulandığında ise U-6-6, U-14-5, U-14-2, U-14-1 ve *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki'*nin ölüm oranını arttırdığı, ancak U-14-4 izolatının ölüm oranını değiştirmediği görülmüştür.

E. kuehniella larvalarına UV ile birlikte 250ppm spor-kristal karışımı uygulandığında U-14-1, U-14-2, U-6-6, izolatlarının ölüm oranını değiştirmediği, U-14-4 izolatının ölüm oranını arttırdığı, U-14-5 izolatı ve *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* uygulamasında ölüm oranının azaldığı görülmüştür. UV ile birlikte 1000 ppm spor-kristal uygulandığında ise izolatlar ve *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 'de ölüm oranının azaldığı gözlenmiştir.

Elde edilen bulgular ve diğer araştırıcıların yapmış oldukları çalışmalardan Bt izolatlarının depo zararlılarının kontrolünde etkili bir biçimde kullanılabileceği anlaşılmaktadır. Yöntemin etkinliğinin arttırılabilmesi için UV radyasyonu veya çeşitli fiziksel mücadele yöntemlerinin birlikte uygulanmalarının daha da olumlu sonuçlar vereceği, kimyasal ilaç uygulamasına alternatif teşkil edeceği ve kimyasal uygulamak gerekse bile kullanımın önemli ölçüde azalacağı görülmektedir. Bu uygulamalar

neticesinde insan ve çevre sağlığı bakımından daha yararlı, güvenilir ve etkili sonuçlar üreteceği bariz bir biçimde anlaşılmaktadır. Bu tip yöntemlerin daha etkili bir biçimde uygulanabilmesi ve geliştirilmesi yaşanabilir bir dünyanın varlığının sürdürülebilmesi bakımından son derece hayati sonuçlar doğuracaktır.

KAYNAKLAR

1. Ayvaz, A., Un Güvesi *Ephestia kuehniella* Zeller., (Lepidoptera: Pyralidae) ve Yumurta Paraziti *Trichogramma evanescens* Westwood., (Hymenoptera: Trichogrammatidae)'in Bazı Biyolojik Özellikleri Üzerine Gamma Radyasyonunun Etkileri, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 2001.

2. Joung, K., Cote J. C., A Review of the Environmental Impacts of the Microbial Insecticide *Bacillus thuringiensis*, Technical Bulletin, Horticultural R & D Centre Research Branch Saint-Jean-sur-Richelieu, Qc, Canada, 29, 1-16, 2000.

3. Meadows, M.P., *Bacillus thuringiensis* in the Environment, Ecology and Risk Assessment, In: *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide, Theory and Practice (Edited by P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs), Wiley, New York, 193-220, 1993.

4. Trevors, J., T., Barkey, T., Bourquin, A.W., Gene Transfer Among Bacteria in Soil and Aquatic Environments, A Review, Can. J. Microbiol., 33, 191-198, 1987.

5. Lacey, L.A., Goettel, M.S., Current Developments in Microbial Control of Insect Pests and Prospects for the Early 1st Century, Entomophaga 40(1), 3-27, 1995.

6. Starnes, R.L., Liu, C.L., Marrone, P.G., History, Use, and Future of Microbial Insecticides, Am. Entomol., 39(2), 83-91, 1993.

7. Bozlağan, İ., Kayseri'den Alınan Toprak Örneklerinden Elde Edilen *Bacillus thuringiensis* Suşlarının İzolasyonu, Tanımlanması ve Bazı Zararlı Böcek Türleri Üzerindeki Toksik Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, 2007.

8. Ishiwata, S., On a kind of severe flacherie (sotto disease)., Dainihon Sanshi Kaiho 114, 1-5, 1901.

9. Berliner, E., Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe.Z. Gesamte Getreidewes. (Berlin) 3, 63–70, 1911.

10. Goldberg, L.H., Margalit, J., A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* . Mosq.News, 37, 355-358, 1977.

11. Krieg, A., Huger, A.M., Langenbruch, G.A. and Schnetter, W., *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis:* ein neuer gegenuber arven von Coleopteren wirksamer athotyp. Z. Ang. Ent., 96, 500–508, 1983.

12. Feitelson, J.S., The *Bacillus thuringiensis* family tree. In: Advanced Engineered Pesticides (Kim, L., Ed.), Marcel Dekker, pp. 63–71, New York, 1993.

13. Höfte, H., Whiteley, H.R., Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev., 53, 242–255, 1989.

14. Lüthy, P., Wolfersberger, M.G., Pathogenisis of *Bacillus thuringiensis* toxins. In: Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application, pp. 167–180,.(Charles, J.F., Delecluse, A. and Nielsen LeRoux, C., Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000.

15. Schwart, J. L., Laprade, R., Membrane Permeabilization by *Bacillus thuringiensis* toxins: protein formation and pore insertion. In:Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application pp.,199-218, (Charles, J.F., Delecluse, A. and Nielsen-LeRoux, C., Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000.

16. Martin, P.A.W., Travers, R.S., Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.,* 55, 2437–2442, 1989.

17. Hansen, B.M., et al., *Bacillus thuringiensis* Ecology and Environmental Effects of its Use for Microbiol Post Control (Environmental Project No. 316)., Copenhagen, Denmark, Ministry of Environment and Energy, Danish Environmental Protection Agency, 1996.

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

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

20. De Barjac, H., Frachon, E., Classification of *Bacillus thuringiensis* Strains, Entomophaga, 35, 233-240, 1990.

21. Lereclus, D., et al., Molecular Relationships among Plasmids of *Bacillus thuringiensis*: Conserved Sequences through 11 Crystalliferous Strains, Mol. Gen. Genet., 186, 391-398, 1982.

22. Lynch, M.J., Baumann, P.,Immunological Comparisons of the Crystal Protein from Strains of *Bacillus thuuingiensis,* J. Invert. Pathol., 46, 47-57, 1985.

23. Frutos, R., Jua Rez Perez, V. M., PCR-Based Approach for Detection of Novel *Bacillus thuringiensis cry* Genes, *Appl. Environ. Microbiol*., 8 (63), 2997-3002, 1997.

24. Carozzi, N.B., et al., Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol*., 57, 3057-3061, 1991.

25. Gleave, A.P., Williams, R., Hedges, R.J., Screening by polymerase chain reaction of *Bacillus thuringiensis* serotypes for the presence of *cryV*-like insecticidal protein genes and characterization of a *cryV* gene cloned from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki. Appl. Environ. Microbiol*., 59, 1683-1687, 1993.

26. Ferrandis, M.D., et al.,Distribution of *cryI, cryII* and *cryV* genes within *Bacillus thuringiensis* isolates from Spain, Syst. Appl. Microbiol., 22, 179-185, 1999.

27. Guerchicoff, A., Ugalde, R.A., Rubinstein, C.P., Identification and characterization of a previously undescribed *cyt* gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*., *Appl. Environ. Microbiol*., 63, 2716-2721, 1997.

28. Bravo, A., et al., Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol*., 64, 4965-4972, 1998.

29. Ejiofor, A.O. and Johnson, T. Physiological and molecular detection of crystalliferous Bacillus thuringiensis strains from habitats in the South Central United States, *J. Indian Microbiol. Biotechnol*., 28, 284-290, 2002.

30. Masson, L., et al., A holistic approach for determining the entomopathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* strains, *Appl. Environ. Microbiol*., 64, 4782-4788, 1998.

31. Schnepf, E., et al., *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins., Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 775-806, 1998.

32. Martínez, C., Biological and Genetic Characterization of *Bacillus thuringiensis* Strains Toxic against *Helicoverpa armigera*, 573 pp., UPNA, Pamplona, 2002.

33. Carlson, C.R., Caugant, D.A., Kolsto, A.B., Genotypic Diversity among *Bacillus creus* and *Bacillus thuringiensis* Strains, *Appl. Environ. Microbiol*., 60, 1719-1725, 1994.

34. Gonzales, J.M. Jr., Dulmage, H.T., Carlton, B.C., Correlation between Spesific Plasmids and δ-endotoksin Production in *Bacillus thuringiensis,* Plasmid, 5, 351-365, 1981.

35. Lereclus, D., Delecluse, A., Lecadet, M.M., 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, 1993.

36. Carlton, B., Development of Genetically Iınproved Strains *of Bacillus ıhuringiensis.*, İn Biotechnology for Crop Protection, Hadin, P., Mann, J., Hollingworth, R., (eds.), American Chemical Society, Washington, D.C., 260-279, 1988.

37. Mahillon, J., Resohazy, R., Hallet, B., IS231 and Other *Bacillus thuringiensis* Transposable Elements, A Review, Genetica, 93, 13-26, 1994.

38. Feitelson, J.S., Payne, J., Kim, L., *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond., Biotechnology., 10, 271–275,1992.

39. Crickmore, N., et al., *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature http:// www. biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html., 1998.

40. Wang, J.H., et al., Characterization of *cry1*, *cry2* and *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. J., Invertebr. Pathol. 82, 63–71, 2003.

41. Li, J., Carroll, J., Euar, D.J., Crystal Structure of the Insecticidal *δ*-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å Resolution, Nature, 353, 815-821, 1991.

42. Rajamohan, F., Lee, M.K. Dean, D.H., *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins: Molecular Mode of Action. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, vol. 60. Academic Press, New York, N. Y., 1998.

43. Beegle, C. C., T. Yamamato,. Invitation paper (C. P. Alexsander Fund): History of *B.thuringiensis* Berliner research and development,. Can. Ent., 124: 587-616. 1992.

44. Tabashnik, et al., Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae).j. Econ. Entmol., 83 (5): 1671-1676, 1990.

45. Gasser, C. S., Fraley, R. T., Genetically engineering plants for crop improvment., Science (Washington, DC),244:1290-1299, 1989.

46. Nordion, World Suppliers of Contract Gamma Proscessing Services., Nordion International, Inc., Canada 1995.

47. Morrison, R. M., An Economic Analysis of Effect of Accelerators and Co-60 for Irradiating Fodd. US. Depertment of Agricalture, Economic Research, Service, Technical Bullutein #1762, June, 1989.

48. Sümer, F., et al., Yumurta Parazitoidi *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae)'in Farklı Biyolojik Dönemleri Üzerine Ultraviyole'nin Etkisi, U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, 21, (2), 49-56, 2007.

49. Mackerness, S. A.H., et al., Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthetic transcripts at different stages of leaf development and light levels in pea (*Pisum sativum* L.): Role of active oxygen species and antioxidant enzymes. *Photochemistry and Photobiology*, 68:88-96. 1998.

50. Travers, R.S., Martin, P.A.W., Reichelderfer, C.F., Selective Process for Efficient Isolation of Soil *Bacillus* spp., *Appl. Environ. Microbiol*., 53, 1263-1266, 1987.

51. Wirtz, R., Eine einfache Art der Sporenfarbung. *Zentralblatt f i r Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. Abteilung 1, Originale* 46, 727-728. 1908.

52. Obeidat, M., Hassawi, D., Ghabeish, I., Characterization of *Bacillus thuringiensis* Strains from Jordan and Their Toxicity to the Lepidoptera, *Ephestia kuehniella* Zeller, African Journal of Biotechnology 3(11), 622-626, 2004.

53. Wilbur D.A, Mills R.B., Stored Grain Insects. In: Pfadt RE, editor. *Fundamentals of Applied Entomology,* 4th edition. pp. 552–576. Macmillan., 1985.

54. Burkholder W.E, Faustini D.L., Biological methods of survey and control. In: Gorham JR, editor. *Ecology and Management of Food Industry Pests.* pp. 361–372. AOAC Press., 1991.

55. Pszczola D.E., 20 ways to market the concept of food irradiation. *Food Technology* 51: 46-48, 1997.

56. Faruki SI.,et al., Effects of ultraviolet (254nm) irradiation on egg hatching and adult emergence of the flour beetles, *Tribolium castaneum*, *T. confusum* and the almond moth, *Cadra cautella*. 6pp. *Journal of Insect Science,* 7:36, 2007.

57. Bruce W.A., Effect of UV-radiation on egg hatch of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Stored Products Research* 11: 243-244, 1975.

58. Guerra A.A, Ouye M.T, Bullock H.R., Effect of ultraviolet irradiation on egg hatch, subsequent larval development and adult longevity of the tobacco budworm and the bollworm. *Journal of Economic Entomology* 61: 541-542, 1968.

59. Calderon M., Navarro S., Effects of ultra-violet irradiation on the eggs of *Ephestia cautella* (Wlk) (Lepidoptera: Phycitidae). *Journal of Stored Products Research* 7: 309-311, 1971.

60. Calderon M., Bruce WA., Leesch LG., Effect of UV-radiation on eggs of *Tribolium castaneum*. *Phytoparasitica* 13: 179-244, 1985.

61. Faruki SI., Khan AR., Potency of UV-radiation on *Carda cautella* (Walker) (Lepidoptera : Phycitidae) larvae treated with *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *University Journal of Zoology, Rajshahi University* 12: 73-79, 1993.

62. Sharma M.K, Dwivedi S.C., Investigation on the effects of ultraviolet and infrared light on the life cycle of *Callosobruchus chinensis* Linn. *Journal of Advanced Zoology* 18: 27-31, 1997.

63. Faruki SI., Effects of UV-radiation on the growth and development of malathion-susceptible and multi-resistant strains of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Bangladesh Journal of Entomology* 25: 55-63, 2005.

64. Faruki SI., Das DR., Khatun S., Effects of UV-radiation on the larvae of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer)(Coleoptera: Tenebrionidae) and their progeny. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 5: 444-448, 2005.

65. Gill, S., Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* toxins. Mem. *Inst. Oswaldo Cruz.* 90, 69–74,1995.

66. Bravo, A., et al., Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis Cry1Ab* pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. Biochim. Biophys. Acta. 1667, 38–46, 2004.

67. Knowles, B., Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal *δ*-endotoxins. *Adv. Insect Physiol.* 24, 275–308, 1994.

68. Wu D., Chang F., Synergism in the msquitocidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *fukuokaensis* crystal proteins, *Appl. Environ. Microbiol.*57:1075-1081, 1985.

69. Vera L.B., Detection of *cry*1 genes ın *Bacıllus thuringienıis* isolates from south of Brazil and actıvıty agaınst *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera:Noctuidae), *Brazilian Journal of Microbiology* 32:105-109, 2001.

70. Morales, L., et al., Suscetibilidade de *Anticarsia gemmatalis* Hüber *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera:Noctuidae), a *Bacillus thuringiensis* (Berliner). *An. Soc. Entomol. Brasil,* 24(3):593-598, 1995.

71. Bohorova, N.; et al., Susceptibility of four tropical Lepidopteran maize pests to *Bacillus thuringiensis cry*1-type inseticiadal toxins. *J. Econ. Entomol.*, 90(2):412-415, 1997.

72. Chak, K.F.; et al., Determination and distribuition of *cry*-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(7):2415-2420, 1994.

73. Faruki, SI., Kundu, PK., Sensitivity of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) larvae to UVirradiation, Short Communication, ISJ 2: 75-81, 2005.

74. Hirobe T., Utilization of gamma-ray effects in the field of silkworm breeding. Indian J. Genet. 34A. Proc. 2nd General Congress SABRAO, New Delhi, 1973, 224-228, 1974.

75. Bhuiya, A. D., et al., Radiation disinfestation of pulses, oilseeds and tobacco leaves. In Insect disinfestation of Food and Agricultural Products by Irradiation. Proc. Final Research Co ordination Meeting Beijing, China, IAEA–RC 273. 3/2, pp. 27–50, 1991.

ÖZGEÇMİŞ

Uğur AZİZOĞLU 1985 yılında Hakkari'de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 2003 yılında Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde öğrenime başladı. 2007 yılında bu bölümden mezun oldu. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı ve halen bu bölümde eğitimine devam etmektedir.

Adres :Mehmet Timuçin Cad.
Vilayet Sok. 8/45
Talas/KAYSERİ
Tel : 0537 596 22 66
E-posta. : azizogluugur@hotmail.com